

## EVALUACIÓN DE MÉTODOS PARA DETERMINAR NITRATO EN SUELO

EMILIO BRAMBILLA<sup>1</sup>; NANCI KLOSTER<sup>2\*</sup>; ALFREDO BONO<sup>2</sup> & JOSÉ CAMIÑA<sup>1,3</sup>

Recibido: 03-01-13

Recibido con revisiones: 04-06-13

Aceptado: 06-06-13

### RESUMEN

Según lo establecido por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA), los métodos analíticos usados en el laboratorio deben validarse para garantizar su calidad. Con este objetivo se realizó el estudio de validación de tres métodos utilizados para determinar nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ): 1) Electrodo de Ión Selectivo (EIS), 2) Nitratecheck (NCH) y 3) Ácido Cromotrópico (ACr). Se evaluaron los parámetros veracidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia) e incertidumbre sobre muestras de referencia. Se determinó el límite de detección (LOD), de cuantificación (LOQ), y el rango lineal de cada método. Además se estimó la influencia del pretratamiento, para lo cual se analizaron muestras a temperatura ambiente, freezer y secas a 60 °C. La linealidad se evaluó a partir del coeficiente de determinación, el cual estuvo por encima del criterio de aceptación definido,  $R^2 > 0,985$ , para los tres métodos estudiados. Tanto el método ACr como el EIS presentaron buena sensibilidad, a diferencia del método NCH. Sin embargo, no se observó una adecuada veracidad para el EIS, lo cual podría indicar la presencia de iones que interfirieron en la muestra analizada. Tanto la repetibilidad como la precisión de los tres métodos están por debajo del criterio de aceptación establecido ( $\text{CV} < 15\%$ ). La evaluación del LOQ indica que el NCH no es válido para cuantificar concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  que están muy próximas al valor de concentración recomendado para fertilización. Se concluye que el método ACr es apropiado para el análisis de  $\text{NO}_3^-$  en muestras de suelo pretratadas con secado en estufa, mientras que los métodos EIS y NCH no cumplieron con los criterios de validación.

**Palabras clave.** Precisión, veracidad, incertidumbre, tratamiento de muestra.

## EVALUATION OF DIFFERENT SOIL NITRATE DETERMINATION METHODS

### ABSTRACT

New analytical laboratory methods must be validated to test their quality as established by the Argentine Organism of Approval. In this study, three methods were validated for their ability to determine nitrates in soils: 1) Ion Selective Electrode (EIS), 2) Nitratecheck (NCH) and 3) Chromotropic Acid (ACr). The following parameters were assessed: accuracy, precision (repeatability and intermediate precision) and uncertainty of the reference samples. Also, the limit of detection (LOD), quantification (LOQ), and range of each method were determined. The determination coefficient obtained in all the evaluated methods was above the acceptance criteria ( $R^2 > 0.985$ ). Both EIS and ACr methods showed good sensitivity, unlike the NCH method. However, the accuracy of EIS was not adequate, which could indicate the presence of interfering ions in the sample analyzed. Both the repeatability and intermediate precision of the three methods studied were below the established acceptance criteria ( $\text{CV} < 15\%$ ). LOQ assessment indicated that NCH is not valid to quantify concentrations of  $\text{NO}_3^-$  which are very close to the recommended value for fertilization. Pretreatment methods tested included ambient temperature, frozen and dry samples (to 60 °C). In conclusion, ACr method is suitable for analysis of  $\text{NO}_3^-$  in dried soil samples, while methods NCH and EIS did not achieve the validation criteria.

**Key words.** Precision, accuracy, uncertainty, sample treatment.

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa. Av Uruguay 151 (6300) Santa Rosa, La Pampa.

<sup>2</sup> EEA «Ing. Agr. Guillermo Covas» Anguil, INTA. Ruta Nac. Nº 5 km 580, CC 11 (6326) Anguil, La Pampa.

<sup>3</sup> Instituto de las Ciencias de la Tierra y Ambientales (INCITAP), Av. Uruguay 151 (6300) Santa Rosa, La Pampa.

\* Autor de contacto: kloster.nanci@inta.gob.ar

## INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es uno de los elementos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. El diagnóstico preciso de los requerimientos de nitrógeno realizado a través del análisis de suelo permite mejorar la eficiencia de uso de este nutriente y por lo tanto el balance económico del productor, evitando además posibles riesgos de contaminación de acuíferos por lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  (Videla & Echeverría, 1998). Para realizar un adecuado diagnóstico es necesario contar con métodos de análisis que permitan obtener la concentración correcta del ión en el suelo, para lo cual los métodos deben ser validados. La validación es el procedimiento que permite establecer, por medio de estudios de laboratorio, que un método es adecuado para cumplir con las aplicaciones analíticas requeridas (IRAM301/ISO 17025, 2005). En la Argentina el procedimiento a seguir para realizar la validación es establecido por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA, 2008).

Numerosos métodos para la determinación de  $\text{NO}_3^-$  en suelo son citados en la literatura nacional e internacional e incluso algunos de ellos han sido validados (Kmecl *et al.*, 2005; Lopez Pazquali *et al.*, 2010). Se incluyen destilación por arrastre de vapor, electrodo específico de ión  $\text{NO}_3^-$ , diversos métodos colorimétricos, cromatográficos e incluso test rápidos para determinación de  $\text{NO}_3^-$  a campo (Mulvaney, 1996; Videla & Echeverría, 1998; Cruz & Martins Loucao, 2002; Heredia, 2005; Marbán, 2005; Maggini *et al.*, 2010). A nivel nacional se han identificado tres métodos comúnmente utilizados en laboratorios para evaluar nitrato con fines de diagnóstico de fertilización: colorimetría del ácido fenoldisulfónico, destilación por arrastre de vapor y método Sneed (Marbán, 2005; Heredia, 2005; PROINSA, 2012). Mientras que el método del ácido cromotrópico (ACr) (West & Ramachandran, 1966) es el más ampliamente usado en los laboratorios del área de influencia de las estaciones experimentales del INTA EEA "Ing. Agr. Guillermo Covas" Anguil y en la EEA Sáenz Peña desde la década del '70 (Fagioli, 1978; Bianconi, 1980). El electrodo específico de ión  $\text{NO}_3^-$  se presenta como una alternativa al uso de métodos colorimétricos debido a su rapidez y menor consumo de reactivos. Sin embargo, se plantea como interrogante cuál es la influencia de otros aniones, tales como cloruros, sulfatos, carbonatos, dado que algunos suelos pueden presentarlos en cantidades suficientes como para interferir en la determinación de  $\text{NO}_3^-$  (Mulvaney, 1996; Marbán, 2005). Además, suele ser recurrente el uso a campo de test rápidos para estimar el contenido de  $\text{NO}_3^-$ , tal como el Nitracheck (NCH) (COPAINS SRL), aún cuando profesionales y productores no tienen certeza de la capacidad del test para arrojar resultados válidos. Videla

& Echeverría (1998) indicaron que éste método de determinación rápida de  $\text{NO}_3^-$  arroja resultados promedio menores que el método del ácido fenoldisulfónico, y que los resultados varían cuando se trabaja sobre muestra húmeda o seca.

Independientemente del método a utilizar, una correcta estimación de los niveles de  $\text{NO}_3^-$  en el suelo, requiere de la obtención de muestras de suelo lo más representativas posible del área a evaluar, así como de una adecuada conservación de dichas muestras inmediatamente después de extraídas (Sheppard & Addison, 2007). Los errores debidos a muestras mal tomadas y/o mal conservadas son generalmente los más significativos, debido a que no pueden corregirse en las fases subsiguientes (Swyngedouw & Lessard, 2007). En la Argentina, la Norma IRAM 29578 (2009) indica el pretratamiento de muestras de suelo de uso agropecuario para análisis físicos y químicos, con alcance a la determinación de parámetros estables y compuestos no volátiles. Esta norma no es aplicable para muestras destinadas al análisis de  $\text{NO}_3^-$ , un compuesto cuya concentración en suelo puede variar por mineralización de nitrógeno orgánico o desnitrificación. En general es mucho más pronunciada la mineralización pudiendo provocar variaciones de hasta un 170% de aumento en el contenido de  $\text{NO}_3^-$  (Griffin *et al.*, 2009). Es por ello que una vez extraída la muestra de suelo debe conservarse en condiciones tales que eviten la actividad microbiana. Para esto pueden utilizarse distintas formas de conservación, por ejemplo, congelar a  $-20^\circ\text{C}$  en freezer ó secar la muestra a  $60^\circ\text{C}$  durante un corto período de tiempo (Zamolinski & Gentilini, 1986). El almacenamiento en freezer presenta como desventaja la necesidad de contar con amplios lugares de conservación en épocas de alta demanda, cuando el ingreso de muestras para análisis de  $\text{NO}_3^-$  supera la capacidad de procesamiento de los laboratorios. Esto último genera un gasto importante de energía, disponibilidad de espacio y mayores tiempos de procesamiento de muestras, dado que se requiere su descongelamiento y tamizado en húmedo. Por el contrario, de emplearse el secado a  $60^\circ\text{C}$ , no existirían los inconvenientes antes citados, debido a que las muestras secas pueden colocarse en recipientes plásticos a temperatura ambiente optimizando el uso del espacio, el tiempo y el gasto eléctrico.

Se plantean como objetivos: 1. realizar la validación de tres métodos de determinación de  $\text{NO}_3^-$ , colorimétrico del ACr, electrodo de ión selectivo de  $\text{NO}_3^-$  y test rápido NCH; 2. evaluar el efecto de diferentes pretratamientos de la muestra de suelo sobre el contenido inicial de  $\text{NO}_3^-$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Análisis químico

El análisis químico para la determinación de  $\text{NO}_3^-$  incluyó dos etapas, la extracción del ión de la muestra de suelo y la cuantificación.

Cada método de análisis, ACr, EIS y NCH, utiliza un extractante y una relación suelo:solución definida. La descripción y principales características de las distintas metodologías de extracción se detallan en la Tabla 1.

Cuantificación método del ACr: para la determinación colorimétrica se midió una alícuota de 4 mL del extracto en un tubo de ensayo al que se agregaron sucesivamente 3,2 mL de solución de antimonio ( $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), 1,6 mL de solución de ácido cromotrópico ( $1,8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y 7,6 mL de ácido sulfúrico concentrado. Los tubos se agitaron por inversión, previo tapado de los mismos. Se dejó reaccionar durante 1 hora para el desarrollo del color amarillo, luego de lo cual se efectuó la lectura de absorbancia a 420 nm. La concentración de  $\text{NO}_3^-$  en los extractos se calculó a partir de una recta de calibración elaborada con 9 niveles de concentración de  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ): 4, 8, 16, 20, 30, 40, 50, 60 y 80.

Cuantificación método del electrodo ión selectivo de  $\text{NO}_3^-$ : para la determinación de  $\text{NO}_3^-$  en los extractos de suelo se tomaron alícuotas de 50 mL a los cuales se agregó 1 mL de solución de sulfato de amonio ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) (ajuste iónico) y se introdujo el electrodo en el extracto para realizar la medida. Diariamente, previo a su uso, el electrodo fue calibrado midiendo cuatro niveles de concentración de soluciones patrón de N- $\text{NO}_3^-$ : 1,

10, 100 y  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Siguiendo el procedimiento de medida, se confeccionó la curva de lectura (mV) vs.  $\log \text{N-NO}_3^-$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y se obtuvo la correspondiente ecuación de la recta para la cuantificación de  $\text{NO}_3^-$  en los extractos de las muestras.

Cuantificación método del Nitracheck: el NCH mediante el uso de bandas reactivas Merck (Merckoquant 1.10020) permite realizar un análisis semicuantitativo de  $\text{NO}_3^-$ . La medida se realiza a partir del color desarrollado por la banda en contacto con el extracto de suelo. El instrumento mide la reflectancia de la banda y expresa la concentración de  $\text{NO}_3^-$  hallada en  $\text{mg L}^{-1}$ . El equipo no emplea una curva de calibración durante su utilización de rutina, sin embargo para evaluar la linealidad del equipo se realizó la lectura de 10 soluciones patrón de  $\text{NO}_3^-$  de concentración 4, 8, 16, 20, 30, 40, 50, 60, 80 y  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , a partir de las cuales se graficó la curva de lectura de  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) por NCH vs.  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en las soluciones patrón.

### Muestras de suelo

Para la determinación de la precisión, veracidad e incertidumbre; se utilizaron 3 muestras de referencia (MR1, MR2 y MR3), una para cada método, debido a su escasa disponibilidad y a que se requiere una importante cantidad de la misma por cada ensayo. Las mismas provienen del Tercer Ensayo de Comparación Interlaboratorios de la Red INTA de Laboratorios de Suelo, Agua y Material Vegetal (Ostinelli & Carreira, 2010), los niveles de analito y su dispersión pueden observarse en la Tabla 2.

Para la evaluación de la influencia del método de conservación se utilizaron 21 muestras de suelos extraídas del predio de la EEA "Ing. Agr. Guillermo Covas" Anguil INTA. Las mues-

Tabla 1. Características de la etapa de extracción para cada método.

Table 1. Description of the extraction steps for each method.

	Método		
	ACr	EIS	NCH
Extractante	Sulfato de calcio $3 \times 10^{-2} \text{ M}$	Sulfato de amonio $4 \times 10^{-2} \text{ M}$	Cloruro de potasio $2 \times 10^{-4} \text{ M}$
Relación suelo-extractante	1:5	1:2	1:1
Tipo de agitación	Mecánica 180 gpm	Mecánica 180 gpm	Manual
Tiempo de agitación	10 min	10 min	2 min

gpm: golpes por minuto

Tabla 2. Concentración de nitrato, pH y conductividad eléctrica en las muestras de referencia utilizadas para cada método.

Table 2. Nitrate concentration, pH and electrical conductivity in reference samples used for each method.

Muestra	Método en el que fue utilizada	NitratoX $\pm$ DE ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	pH	CE ( $\text{mS cm}^{-1}$ )
MR1	ACr	60,2 $\pm$ 8,5	6,1	0,2
MR2	EIS	96,2 $\pm$ 3,3	6,0	0,2
MR3	NCH	69,6 $\pm$ 11,5	5,7	0,2

tras corresponden a suelos de tipo Haplustol Éntico, de textura arenosa, y Ustipsament Típico, de textura franco arenosa. Inmediatamente después del muestreo cada muestra se sometió a los siguientes tratamientos:

1. Muestra sin tratamiento: analizada inmediatamente luego de extraída. Este procedimiento se consideró como testigo, dado que con él se esperan obtener mínimas variaciones del contenido de  $\text{NO}_3^-$ ;
2. Muestra T° ambiente: se simula inadecuada condición de almacenamiento antes del análisis, dejando la muestra en una bolsa de polietileno por 2 semanas a temperatura ambiente;
3. Muestra seca a 60 °C: la muestra se coloca en estufa de circulación forzada a 60 °C, en una capa de 1 cm de espesor, durante 2 horas con el fin de eliminar rápidamente la humedad e inhibir la actividad microbiana;
4. Muestra en freezer: se congela la muestra a -20 °C hasta su análisis (plazo no mayor a 30 días), de modo de inhibir o minimizar la acción de los microorganismos.

Las muestras fueron tamizadas a 2 mm. Se determinó la humedad gravimétrica en los tratamientos que conservan la muestra húmeda. El análisis estadístico de los métodos de conservación se efectuó por comparación de medias de las muestras analizadas por duplicado con el método ACr, mediante test ANOVA. Las diferencias entre medias de tratamientos fueron determinadas mediante el test de Tukey ( $p < 0,05$ ). Se utilizó el programa InfoStat (2004).

### Validación

Se realizó la validación de los métodos de análisis siguiendo la guía para validación de métodos de ensayo del OAA (2008) y la guía EURACHEM (1998). La cuál *consiste de tres pasos*:

1. *Establecimiento de los **criterios de aceptación** del método (es decir el valor numérico contra el cual se contrasta el resultado).*

2. *Determinación de los **parámetros estadísticos***

3. *Evaluación de la validación por comparación de los resultados obtenidos para los parámetros estadísticos, con los criterios de aceptación establecidos.* Los parámetros estadísticos determinados fueron: linealidad, sensibilidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), veracidad, precisión, rango lineal e incertidumbre ( $U_{rel}$ ). La linealidad se estudió a partir del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el cual refleja el ajuste de la calibración a una recta a partir de la regresión lineal; mientras que la sensibilidad de los métodos se calculó a través de la pendiente de la recta y de su desvío estándar. Para esto se utilizaron soluciones patrón de  $\text{NO}_3^-$  preparadas a partir de  $\text{NaNO}_3$  de calidad pro análisis. El LOD y el LOQ se analizaron midiendo la señal generada por un blanco y el desvío estándar que tiene dicha medida, los blancos se analizaron por sextuplicado. Luego se define el LOD como la

concentración de  $\text{NO}_3^-$  que proporciona una señal igual a la señal del blanco más 3,3 veces el desvío estándar del blanco, mientras que el LOQ se define como la concentración igual a la señal del blanco más 10 veces su desvío estándar (EURACHEM, 1998). La veracidad se estudió a partir de la diferencia relativa porcentual (DRP) obtenida con la muestra de referencia y además comparando los valores obtenidos con los nominales de referencia mediante un ensayo de hipótesis ( $p < 0,05$ ). Para ello las muestras de referencia se analizaron por sextuplicado, una para cada método tal como se indicó previamente. La precisión de cada método se determinó a partir del coeficiente de variación de la repetibilidad, es decir el análisis sextuplicado dentro de un día ( $CV_r\%$ ) y a partir del coeficiente de variación de la precisión intermedia, analizando resultados triplicados en tres días sucesivos de análisis ( $CV_R\%$ ). La evaluación de incertidumbre se realizó empleando el modelo propuesto por Reyes & Cerezo (2009) el cual considera la veracidad y la precisión intermedia para el cálculo de la incertidumbre relativa expandida porcentual,  $U_{rel}$  (%) tal como lo indica la ecuación:

$$U_{rel}(\%) = 2 * \sqrt{\left(\frac{CV\%}{\sqrt{n_{\text{día}}}}\right)^2 + \left(\frac{V\%}{\sqrt{3}}\right)^2}$$

donde: CV % es el coeficiente de variación porcentual entre días (precisión intermedia);  $n_{\text{día}}$  es el número de días en los que se analiza la precisión intermedia y V % es la veracidad porcentual. El rango lineal surge del intervalo de concentraciones desde el LOQ hasta la solución patrón de concentración más alta durante la investigación cuya señal se ajusta a una ecuación de calibración lineal y fue evaluado a partir de las curvas de calibración.

Se establecieron los criterios de aceptación contra los cuales se contrastaron los resultados de los parámetros estadísticos obtenidos para cada método. Los criterios de aceptación de un método para la determinación de  $\text{NO}_3^-$  en suelo no están establecidos por alguna instancia oficial. Es por ello que los mismos se establecieron de manera confiable y científica, teniendo en cuenta los requerimientos de los clientes del laboratorio que emplean la determinación de este ión para definir prácticas de fertilización, tal como lo sugiere el OAA para aquellos casos en los cuales no existen criterios oficiales preestablecidos. Los criterios de aceptación establecidos fueron:

1. Coeficiente de determinación  $> 0,985$
2. Desviación estándar relativa de la pendiente  $< 3\%$
3. Veracidad  $< 10\%$  y valor t calculado  $< t_{\text{crítico}}(0,05; 5)$
4. Coeficientes de Variación de repetibilidad y precisión intermedia  $< 15\%$
5. Límite de detección  $< 3 \text{ ppm}$
6. Límite de cuantificación  $< 9 \text{ ppm}$
7. Incertidumbre  $< 20\%$

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Validación de métodos de cuantificación**

Los resultados de cada parámetro estadístico evaluados para cada método de cuantificación se observan en la Tabla 3. Estos resultados fueron contrastados con los criterios de aceptación para definir la aptitud de los métodos para el análisis de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Las funciones de regresión lineal a partir de las cuales se evaluó la linealidad y sensibilidad de cada método se observan en la Figura 1. Los coeficientes de determinación obtenidos fueron superiores al criterio de aceptación e indican un buen ajuste lineal en los rangos de concentraciones utilizados: 0 a 80 mg L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> para ACr; 0 a 1000 mg L<sup>-1</sup> N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> para EIS y 0 a 100 mg L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> para NCH. Sin embargo, en los métodos espectrofotométricos, tal como el ACr, es

Tabla 3. Parámetros estadísticos analizados, criterios de aceptación y resultados obtenidos para cada método.

Table 3. Statistical parameters and acceptance criteria obtained for each method.

Parámetro	Criterio	Resultados por método		
		ACr	EIS	NCH
Linealidad	R <sup>2</sup> > 0,985	0,996	0,994 - 1*	0,988
Sensibilidad	DER <sub>pend</sub> <3%	2,1	0,3 - 3,0*	3,9
Veracidad	V <10%	5,2	18,8	1,6
	t <sub>calc</sub>	2,55	6,60	0,86
	t <sub>crit(0,05;5)</sub>	2,57		
Repetibilidad	CV <15%	6,2	2,4	2,4
Precisión intermedia	CV <15%	11,7	10,1	3,5
Límite de detección	<3 ppm	2,7	0,6	6,5
Límite de cuantificación	<9 ppm	8,2	1,8	19,5
Rango lineal		8,2 - 80	1,8 - 1000	19,5 - 100
Incertidumbre	U <sub>rel</sub> <20%	14,8	24,7	4,5

\* Rango de valores en función de la calibración diaria.

DER<sub>pend</sub>: desviación estándar relativa de la pendiente de la recta de calibración.

V: veracidad.

t<sub>calc</sub>: valor t calculado.

t<sub>crit</sub>: valor t crítico obtenido de tabla.

CV: coeficiente de variación.

U<sub>rel</sub>: incertidumbre relativa.

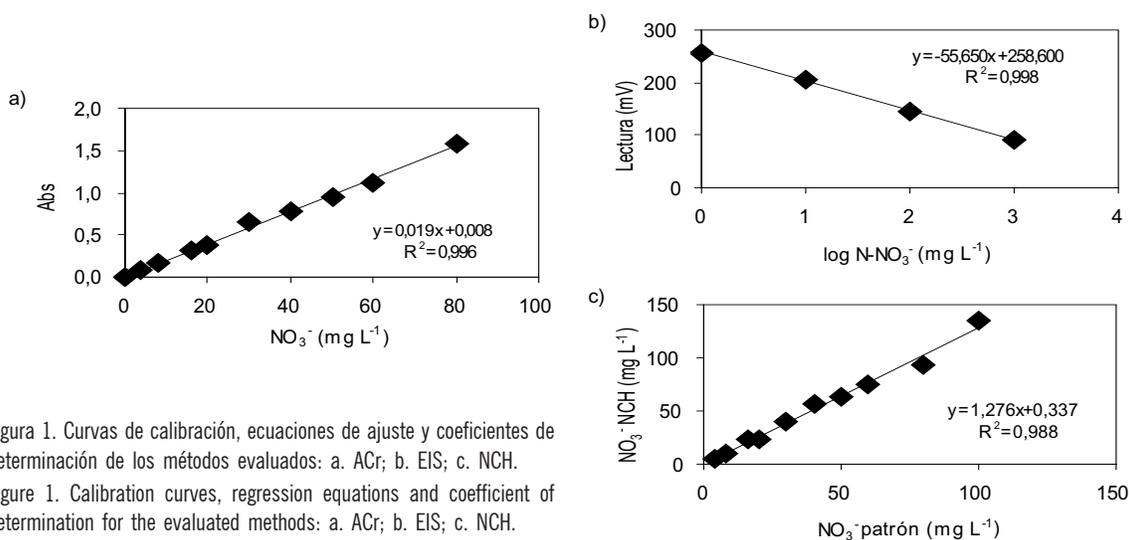


Figura 1. Curvas de calibración, ecuaciones de ajuste y coeficientes de determinación de los métodos evaluados: a. ACr; b. EIS; c. NCH.

Figure 1. Calibration curves, regression equations and coefficient of determination for the evaluated methods: a. ACr; b. EIS; c. NCH.

recomendable medir la absorbancia en el rango de menor error fotométrico, generalmente entre 0,1 y 1,0 unidades de absorbancia (Skoog *et al.*, 2001), por lo que la calibración del método no debería superar la concentración de  $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ . Para el caso del NCH, el ajuste lineal coincide con el publicado por Videla & Echeverría (1998). El método del ACr presentó una desviación estándar relativa de la pendiente ( $DER_{\text{pend}}$ ) menor al 3%, por debajo del criterio de aceptación al igual que el EIS. En el caso del método NCH la  $DER_{\text{pend}}$  no se ajustó a dicho criterio.

Tanto el método ACr como el NCH alcanzaron un valor de veracidad dentro del criterio de aceptación establecido (veracidad < 10%), y sin diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), mientras que el método EIS estuvo por encima del mismo. Esto último podría asociarse al contenido salino del suelo, principalmente debido a la presencia de iones cloruros, que pueden provocar interferencias, generando resultados erróneos en la medidas, hecho indicado por Pulgarín & Pérez (2005). Estos iones podrían ser eliminados por agregado de un reactivo precipitante como el sulfato de plata junto con el extractante, como lo sugiere Onken & Sunderman (1970). En este último caso sería importante evaluar el incremento en el costo de análisis por la incorporación de este reactivo. La precisión de cada método evaluada a partir del cálculo de la repetibilidad dentro del día ( $CV\%_r$ ) y la precisión intermedia entre días ( $CV\%_p$ ), presentó en los tres casos un  $CV\%_r$  y  $CV\%_p$  inferior al preestablecido ( $CV\% < 15\%$ ).

Los resultados para los límites de detección y cuantificación indican que tanto el método ACr como el EIS cumplen con los criterios de aceptación ( $LOD < 3 \text{ mg L}^{-1}$  y  $LOQ < 9 \text{ mg L}^{-1}$ ), mientras que no es así para el método NCH. Este último permite cuantificar concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  que están muy próximas al valor recomendado para fertilización, que en líneas generales, es de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  en la capa superficial de suelo (0-20 cm) (Bono & Romano, 2007; Bono & Alvarez, 2007). Puede observarse en la Tabla 3 que los métodos ACr y NCH tienen una  $U_{\text{rel}}$  inferior al 20% (parámetro de aceptación), mientras que ésta es mayor para el método EIS. Esto último podría asociarse a la sobreestimación del resultado por presencia de iones que interfieren en el análisis, tal como se indicó para la determinación de veracidad.

#### Influencia del método de conservación de muestras

El análisis de la varianza demostró que las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  en las muestras secadas a  $60^\circ \text{C}$  durante una hora y en freezer a  $-20^\circ \text{C}$ , no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de las concentraciones obtenidas para las muestras analizadas inmediatamente posterior al muestreo. Las pérdidas de nitrógeno bajo formas volátiles mediante el secado en estufa son inferiores al 7%, lo cual coincide con Nelson & Bremner (1972) quienes indicaron que las pérdidas de  $\text{NO}_3^-$  por volatilización durante el secado en estufa a  $55^\circ \text{C}$  son inferiores al 10% del contenido inicial. Asimismo, las muestras conservadas en freezer indican un

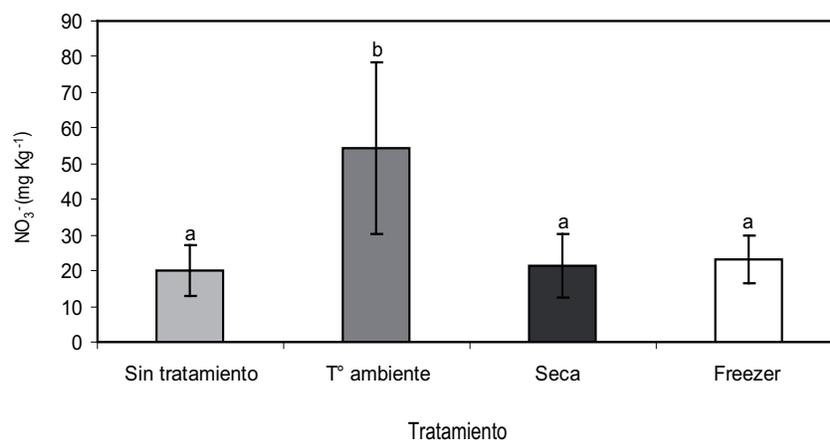


Figura 2. Valores medios de  $\text{NO}_3^-$  obtenidos para 21 muestras de suelo sometidas a diferentes métodos de conservación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos. Las barras indican el desvío estándar de la media.

Figure 2. Mean values of  $\text{NO}_3^-$  obtained for 21 samples subjected to different preservation methods. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) among treatments. The bars indicate the standard deviation of the mean.

incremento del 15% respecto del contenido inicial de  $\text{NO}_3^-$  en las muestras, lo cual concuerda con lo indicado por Zamolinski & Gentilini (1986). Estos autores consideran este sistema de conservación satisfactorio en suelos clasificados como Hapludoles Thaptoárgicos. Sin embargo, como se mencionó este método de conservación presenta desventajas, tales como mayor laboriosidad, mayores tiempos de procesamiento, necesidad de contar con varios freezer para el guardado de muestras en épocas de alta demanda, además de provocar la lisis microbiana, lo que afecta otras determinaciones como por ejemplo el contenido de amonio.

Se observaron diferencias entre estos tres tratamientos y las muestras conservadas a temperatura ambiente, las cuales presentaron valores de  $\text{NO}_3^-$  significativamente superiores. Los altos valores de  $\text{NO}_3^-$  podrían asociarse a la actividad microbiana que ocurre durante el almacenamiento a temperatura ambiente con la humedad inicial, tal como lo señalan Barberis *et al.* (1977) y Griffin *et al.* (2009). Dichos resultados indicarían que este tratamiento no es adecuado para la conservación de las muestras de suelo previo al análisis de  $\text{NO}_3^-$ . Estos resultados resaltan la importancia de la conservación refrigerada y del rápido envío de las muestras al laboratorio para el análisis, como así también el tratamiento o análisis tan inmediato como sea posible.

## CONCLUSIONES

1. El método ACr resulta apto para el análisis de  $\text{NO}_3^-$  en muestras de suelos.
2. El método EIS no arrojó resultados satisfactorios debido a que no cumple con los criterios de aceptación establecidos para los parámetros veracidad e incertidumbre, por sobreestimación de la concentración de  $\text{NO}_3^-$ .
3. El método NCH no es aplicable para la determinación de  $\text{NO}_3^-$  en recomendaciones de fertilización debido a su elevado límite de cuantificación.
4. El secado de las muestras de suelo a 60 °C podría ser el método de pretratamiento más apropiado para la conservación de muestras destinadas a la determinación de  $\text{NO}_3^-$ .

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa, al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, EEA Anguil) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber facilitado el apoyo económico e infraestructura para realizar el presente trabajo. El mismo es parte de la tesina desarrollada por Emilio Brambilla para acceder al grado de Licenciado en Química.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barberis, L; D Zouradakis & D Sundue. 1977. Influencia de las técnicas de muestreo y acondicionamiento en la determinación de nitratos en suelo. III Reunión Nacional de Fertilidad y Fertilizantes. Buenos Aires.
- Bianconi, AE. 1980. Determinación de nitratos en dos series de suelos de la región algodonera centro chaqueña. Actas IX Reunión Argentina de la Ciencia del Suelo. Tomo 2: 439-441.
- Bono, A & R Álvarez. 2007. Estimación de nitratos en profundidad en suelos de la región semiárida y subhúmeda pampeana. *Informaciones Agronómicas* N°33. IPNI.
- Bono, A & N Romano. 2007. Nitrógeno. En: Quiroga, A; Bono, A (ed.). Manual de fertilidad y evaluación de suelos. 1ra edn Pp. 60-64. Ediciones INTA. EEA Anguil. Publicación Técnica N° 71.
- Copains SRL. Nitrachek: consejos de utilización. [http://www.copains.com.ar/pdf/med\\_nitrachek.pdf](http://www.copains.com.ar/pdf/med_nitrachek.pdf). Fecha de último acceso: 23/02/2012.
- Cruz, C & MA Martins Loucao. 2002. Comparison of methodologies for nitrate determination in plants and soils. *Journal of Plant Nutrition* 25(6): 1185-1211.
- Eurachem Guide. 1998. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. LGC (Teddington) Ltd. ISBN 0-948926-12-0.
- Fagjoli, M. 1978. Determinación de nitratos en suelos de la región semiárida pampeana: variabilidad de las muestras y profundidad de muestreo. Boletín de divulgación técnica N° 18. Estación Experimental Regional Agropecuaria, INTA.
- Griffin, G; W Jokela; D Ross; D Pettenelli; T Morris & A Wolf. 2009. Recommended soil nitrate-N test. Chapter 4. In: Sims, T and A Wolf (eds.). Cooperative Bulletin N°. 493. pp 27-38.
- Heredia, O. 2005. Capítulo 2: Métodos de extracción y determinación de nitratos en suelos, parte I. En: Marbán L & S Ratto (eds.). Tecnologías en análisis de suelos. Pp 123-130. AACs.
- InfoStat. 2004. Versión 1.1. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC).
- IRAM 301/ISO 17025. 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- Kmecl, V; J Susin & L Zupancic Kralj. 2005. Validation of analytical methods used for determination of nitrate in soil. *Accred. Qual. Assur.* 10: 172-176.

- Lopez Pasquali, CE; A Gallego Picó; P Fernández Hernando; M Velasco & JS Durand Alegria. 2010. Two rapid and sensitive automated methods for the determination of nitrite and nitrate in soil samples. *Microchemical Journal* 94(1): 79-82.
- Maggini, R; G Carmassi; L Incrocci & A Pardossi. 2010. Evaluation of quick test kits for the determination of nitrate, ammonium and phosphate in soil and hydroponic nutrient solutions. *Agrochimica* 54(6): 331-341.
- Marbán, L. 2005. Capítulo 3: Métodos de extracción y determinación de nitratos en suelos, parte II. *En: Marbán L & S Ratto (eds.)*. Tecnologías en análisis de suelos. Pp 131-138. AACs.
- Mulvaney, RL. 1996. Chapter 38: Nitrogen-Inorganic forms. *In: JM Bartels (ed.)* Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods. Pp 1123-1178. SSSA and ASA. Madison, WI.
- Nelson, DW & JM Bremner. 1972. Preservation of soil samples for inorganic nitrogen analysis. *Agron. J.* 64: 196-199.
- Onken, AB & HD Sunderman. 1970. Use of nitrate electrode for determination of nitrate in soils. *Soil Sci Plant Anal.* 1: 155-161.
- Organismo Argentino de Acreditación. 2008. Guía para la validación de métodos de ensayo. Código: DC-LE-05. Versión: 2. Pp: 7
- Ostinelli, M & D Carreira. 2010. 3° Ensayo de Comparación Interlaboratorios de Suelos. RILSAV. PE AERN 295531. INTA.
- PROINSA. 2012. Informe final Ronda interlaboratorio para análisis de suelos agropecuarios. MACyP. Pp: 49.
- Pulgarín, AG & NJC Pérez. 2005. Determinación de Nitratos y amonio en muestras de suelo mediante el uso de electrodos selectivos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía- Medellín.* 58(1).
- Reyes M & MJ Cerezo. 2009. Consideraciones sobre la evaluación de la incertidumbre. V Congreso Virtual Iberoamericano. Gestión de Calidad en Laboratorios. <http://www.iberolab.org/opencms/opencms/comunicaciones/Comunicaciones/>. Fecha de último acceso: 18/02/13.
- Sheppard, SC & JA Addison. 2007. Chapter 4: Soil sample handling and storage. *En: Carter MR & EG Gregorich (eds.)*. Soil sampling and methods of analysis. 2da edn Pp: 39-50. Taylor & Francis.
- Skoog, DA; DM West & J Holler. (eds.). 2001. Introducción a los métodos espectroscópicos de análisis. *En: Fundamentos de química analítica Vol. 2* Pp:508-531. Reverte. Barcelona, España.
- Swyngedouw, C & R Lessard. 2007. Chapter 5: Quality Control in soil chemical analysis. *En: Carter MR & EG Gregorich (eds.)*. Soil sampling and methods of analysis. 2da edn Pp: 51-69. Taylor & Francis.
- Videla, C & H Echeverría. 1998. Métodos rápidos para la determinación de nitrato en suelos. *Ciencia del suelo* 16: 131-133.
- West, PW & TP Ramachandran. 1966. Spectrophotometric determination of nitrate using chromotropic acid. *Anal Chim Acta.* 35: 317-324.
- Zamolinski, A & TH Gentilini. 1986. Acondicionamiento de la muestra de suelo para la determinación postergada de nitratos. Publicación Técnica N° 6. EEA INTA Villegas INTA.