

4015UY

Determinación de fósforo disponible en suelos



Método espectrofotométrico

Elaborado - A. Bazzano

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. El fósforo disponible en el suelo corresponde a una pequeña fracción del fósforo total contenido en el suelo, reflejando el fósforo en solución y aquella fracción que se encuentra en la fase sólida, susceptibles a ser asimiladas por las plantas.
- 1.2. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de fósforo disponible en suelos con un pH neutro o ácido.
- 1.3. El fósforo disponible en suelo se extrae con una solución de ácido clorhídrico (HCl) y fluoruro de amonio (NH_4F), que luego de centrifugarlo y filtrarlo se determina por una técnica colorimétrica.
- 1.4. Mediante este procedimiento se puede determinar fósforo disponible en un rango de 1,6 mg P/kg (límite de cuantificación) a 50 mg P/kg.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de Mantenimiento y Control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento “Determinación de pH en suelo y residuos.” (1016 UY)
- 2.6. Instructivo de uso de balanza analítica con resolución 0,1 mg (INE 94)
- 2.7. Instructivo de uso de balanza de plato abierto con resolución 0,01 g (INE 16A)
- 2.8. Instructivo de uso de espectrofotómetro (INE 38)
- 2.9. Instructivo de uso de agitador orbital (INE 102)
- 2.10. Instructivo de uso de centrifuga (INE 49)
- 2.11. Instructivo de uso de peachímetro (INE 98)
- 2.12. Ruta de análisis (RFQ 33)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

La técnica consta de dos etapas:

3.1. Extracción

El HCl disuelve principalmente los fosfatos de calcio y algunos de hierro y aluminio, mientras que los fluoruros promueven la desorción de los fosfatos ligados al hierro y al aluminio. El ion fluoruro al disminuir la actividad del Al^{3+} , Ca^{2+} y Fe^{3+} por la formación de complejos, evita la adsorción de los fosfatos solubilizados.

3.2. Determinación espectrofotométrica

El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio, en medio ácido, reaccionan con el ortofosfato para formar ácido fosfomolibdico, el cual es reducido por el ácido ascórbico a un complejo de molibdeno de color azul intenso. La intensidad del color azul es proporcional a la concentración de fósforo reactivo, que se mide en un espectrofotómetro a 882 nm. La concentración se determina a partir de una curva de calibración.

3.3. El resultado se expresa en base seca, secado en estufa a $110\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. El tartrato de antimonio y potasio, y el fluoruro de amonio son sumamente tóxicos por lo que se aconseja leer la hoja que acompaña las especificaciones de dichos reactivos.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. El procedimiento es muy sensible a la proporción suelo-solución extractora, la agitación y el tiempo de agitación.

5.2. El pH del suelo también es un factor a tener en cuenta, ya que este método sólo se puede utilizar para suelos neutros-ácidos; los suelos básicos neutralizan la solución extractora, perdiendo así la capacidad de extraer. Los suelos deben tener un pH < 7,5.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en una bolsa de polietileno con cierre hermético e impermeable. Muestra mínima 500 g; preservar refrigerada a ≤ 6 °C (> 0°C).

6.2. La determinación de pH del suelo y el secado del mismo deben ser realizadas lo antes posible.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro, longitud de onda 882 nm, con camino óptico de 2,5 cm o mayor

7.2. Celda: tubos de 25 ó 50 mL de capacidad y 2,5 cm de diámetro

7.3. Balanza de resolución de 0,01 g

7.4. Balanza de resolución de 0,001 g

7.5. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 1,00 a 10,00 mL

7.6. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 100 a 1000 μ L

7.7. Matraz aforado de 1000 mL

7.8. Material de vidrio graduado de capacidad entre 100 y 1000 mL

7.9. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 250 mL

7.10. Bomba de vacío

7.11. Filtros de membrana de 47 mm de diámetro y 0,45 μ m de diámetro de poro

7.12. Tubos tipo Falcon de 50 mL

7.13. Agitador orbital

7.14. Centrífuga

7.15. Mortero de porcelana

7.16. Estufa de secado 30 °C \pm 5 °C y 110 °C \pm 5 °C

7.17. Placas de Petri

7.18. Tamiz de 2 mm

7.19. Plancha calefactora

7.20. Peachímetro

8. REACTIVOS

8.1. Solución sulfúrico-tartrato-molibdato:

- Calentar a ebullición 200 mL de agua desionizada en un matraz Erlenmeyer de 1 L y agregar 60 g de molibdato de amonio [(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O Nro. CAS 12054-85-2] disolver y dejar enfriar a temperatura ambiente.

- Disolver aproximadamente 1,455 g de tartrato de antimonio y potasio [K(SbO)C₄H₄O₆·½H₂O] Nro. CAS 28300-74-5] en la solución de molibdato.

- Agregar lenta y cuidadosamente con una probeta 700 mL de ácido sulfúrico conc. (H₂SO₄ Nro. CAS 7664-93-9), enfriar y llevar a 1 L con agua desionizada, mantener en la oscuridad y a temperatura de heladera. Solución estable por 6 meses.

8.2. Solución de ácido ascórbico: disolver 6,6 g de ácido ascórbico (C₆H₈O₆ Nro. CAS 50-81-7) en 50 mL de agua desionizada. Preparar la solución al momento de utilizarla.

8.3. Ácido clorhídrico 1 N: colocar 500 mL de agua desionizada en un matraz Erlenmeyer de 1 L, agregar aprox. 83 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl conc. Nro. CAS7647-01-1). Llevar a 1 L. Solución estable por 6 meses.

8.4. Solución extractora Bray No. 1 (0,025 N HCl y 0,03 N NH₄F):

- Pesar aprox. 2,22g de fluoruro de amonio (NH₄F Nro. CAS 12125-01-8) y disolverlos en 1 L de agua desionizada.

- Agregar con una probeta 50 mL de HCl 1N y llevar a 2 L en el recipiente de 2 L de polietileno.



- Trasvasar una alícuota a un vaso de Bohemia y medir el pH.
 - Ajustar el pH de la solución agregando gotas de NH_4OH (hidróxido de amonio Nro. CAS 1336-21-6) y HCl hasta un pH de $2,6 \pm 0,5$. Solución estable por 6 meses.
- 8.5. Solución para desarrollo de color:
- En un matraz de 1 L mezclar 25 mL de solución sulfúrico-tartrato-molibdato con 800 mL de agua desionizada.
 - Agregar 10 mL de solución de ácido ascórbico y llevar a 1 L
 - Esperar 1 hora antes de usar, preparar diariamente.
- 8.6. Solución patrón 100 mg P/L:
- Disolver 0,4394 g de fosfato monobásico de potasio patrón primario anhidro (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0) secado en estufa 2 horas a 110°C en un matraz aforado de 1000 mL, con 800 mL de solución extractora. Disolver y llevar a volumen con solución extractora.
 - Trasvasar a una botella de plástico de 1 L. Guardar a temperatura de heladera. La solución es estable por 1 semana.
- 8.7. Soluciones de trabajo 10 mg P/L: Pesar 10 g de solución patrón 100 mg P/L en matraz Erlenmeyer y llevarlo a 100 g con solución extractora, preparar al momento de utilizarla.
- 8.8. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. No utilizar material de vidrio para almacenar cualquier solución que contenga solución extractora ya que los iones fluoruro en medio ácido reaccionan con el vidrio.
- 9.2. Todo el material debe tener un tratamiento de lavado sin detergente.
- 9.3. El material se almacena lavado, enjuagado y seco.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. A partir de la solución de trabajo de 10 mg P/L, preparar la curva de calibración con las concentraciones sugeridas en la tabla adjunta. Los volúmenes indicados deben ser tomados con pipeta automática de volumen variable 1-10 mL, material aforado o por pesada con precisión 0,01 g registrando toma y volumen final, considerando la densidad del agua 1 g/mL. Se lleva a volumen final con solución extractora.

Volumen de Solución Trabajo	Volumen final	Concentración en mg P/L
0	25	0
0,50	25	0,2
1	25	0,4
2	25	0,8
5	25	2
10	25	4
12,5	25	5

- 10.2. Medir un punto de solución control junto con la curva de calibración.
- 10.3. Realizar el ajuste de cero del instrumento con una celda de lectura conteniendo agua destilada.
- 10.4. Colocar 2 mL de cada dilución en tubos o celda de lectura de 25 mL de capacidad y 2,5 cm camino óptico, y agregar 8 mL de agua desionizada.
- 10.5. Medir la absorbancia de cada solución antes de agregar el reactivo combinado. Esta medida es considerada, Abs inicial.
- 10.6. Agregar 8 mL de solución para desarrollo de color y esperar 20 minutos.
- 10.7. Medir la absorbancia de las soluciones a 882 nm de longitud de onda. Esta medida es considerada Abs final.
- 10.8. Realizar la gráfica de (Abs final – Abs inicial) en función de concentración del estándar en mg P/L.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Medir el pH de la muestra al momento de llegar al laboratorio como indica el procedimiento 1016UY "Determinación de pH en suelo y residuos".

11.2. Secado de la muestra:

- Talar una placa de Petri de unos 15 cm de diámetro y colocar entre 100 y 200 g de la muestra y registrar la masa al gramo, colocar la muestra de modo que tenga la mayor superficie de exposición.
- Colocar la placa en una estufa a $30\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ entre 3 y 7 días hasta masa constante, con concordancia al gramo.
- Alternativamente se puede secar a temperatura ambiente a $24\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$, el proceso de secado debe ser lo más rápido posible para minimizar la posible actividad microbiana.
- En ninguno de los dos casos sobrepasar los 38 °C .

11.3. Relación secado $30\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ - secado $110\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.

- Talar una placa de Petri de unos 15 cm de diámetro y colocar entre 10 y 20 g de suelo ya seco a $30\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$. Registrar esa masa.
- Luego pesar la placa de Petri más la muestra y registrar la masa.
- Secar la muestra en una estufa a $110\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ de 12 a 16 horas.
- Dejar enfriar la placa de Petri en un desecador media hora.
- Repetir el procedimiento hasta peso constante. Registrar la masa final.
- Utilizar la relación entre ambas masas para corregir los datos obtenidos.

11.4. Partículas menores a 2 mm:

- Morterear para aplastar los terrones de modo que puedan pasar un tamiz de 2 mm.
- Colocar un papel sobre la mesada y sobre ese papel colocar un tamiz de malla de 2 mm.
- Pasar la muestra seca y mortereada por el tamiz y quedarse con la fracción recibida en el papel.
- Mover el suelo tamizado en el papel de las esquinas hacia el centro para mezclarlo, repetir el proceso de mezclado 4 veces.

11.5. Preparación de los filtros:

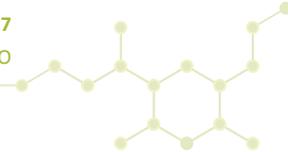
- Utilizar filtros de membrana comerciales preparados, en caso contrario, deben ser lavados antes de ser usados, ya que podrían contribuir con cantidades significativas de fósforo a muestras de bajas concentraciones.

Existen dos formas de preparación de filtros:

- Empapar 50 filtros en 2 L de agua destilada durante 1 hora, luego cambiar el agua y dejarlos por tres horas más.
- Empapar 50 filtros en 2 L de agua destilada durante 24 horas.

11.6. Análisis de la muestra:

- Colocar 2,5 g de muestra de suelo previamente molida y seca hasta masa constante en una estufa a $30\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ o a temperatura ambiente a $24\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ con un diámetro de partícula menor a 2 mm en un tubo Falcon de 50 mL.
- Agregar al tubo 25 g de solución extractora.
- Colocar los tubos en el agitador orbital 15 minutos a 200 oscilaciones por minuto.
- Retirar los tubos del agitador y colocarlos en la centrifuga 10 minutos a 2000 r/min.
- Filtrar al vacío una pequeña alícuota del sobrenadante y enjuagar el recipiente donde se recibe el filtrado, descartar la alícuota, y proceder a filtrar el resto del sobrenadante.
- El desarrollo de color se puede realizar a continuación o pueden guardarse los extractos en heladera a 4 °C y realizar el análisis dentro de las 72 horas.
- Transferir 2 mL del sobrenadante filtrado en un tubo o celda de lectura de 25 mL de capacidad y 2,5 cm camino óptico.
- Agregar 8 mL de agua desionizada y medir la absorbancia a 882 nm en el espectrofotómetro, registrar esa absorbancia como Abs inicial.
- En el mismo tubo o celda de lectura agregar 8 mL de la solución para desarrollo de color y esperar 20 min.
- Medir la absorbancia en el espectrofotómetro y registrarla como Abs final.



12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La curva de calibración es una recta representada por la siguiente ecuación:

$$(\text{Abs final} - \text{Abs inicial}) = a \times (\text{mg P/L}) + b$$

donde:

a y b: corresponden a la pendiente y la ordenada en el origen de la recta respectivamente

Rechazar la curva si el coeficiente de regresión (r^2) es menor a 0,99, repetir el procedimiento de preparación de las soluciones de calibración.

12.2. La concentración de fósforo en la muestra se calcula según:

$$[\text{Psuelo}] \text{ mg P/kg} = \frac{(A - B) \times D}{C \times E}$$

donde:

A: corresponde Abs final – Abs inicial.

B: corresponde a la ordenada en el origen de la curva de calibración.

C: corresponde a la pendiente de la curva de calibración.

D: corresponde a la masa de solución extractora.

E: corresponde a la masa de suelo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Tomar la cantidad necesaria de la solución de “Control de Fósforo” (elaborada por el Responsable de Calidad) en un tubo o celda de lectura; realizar la toma de forma tal que la concentración final resulte en el medio de los valores de la curva de calibración. Analizar esta solución simultáneamente con la curva de calibración. Comparar el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de todas las muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de rangos correspondientes (según Manual de Control de Calidad Analítico). La precisión puede ser evaluada tanto por desviación estándar relativa como por rangos. Se aceptan rangos normalizados menores a 20 %, hasta que se cuente con los suficientes datos para generar un gráfico de control según PGC 05.

13.3. **Control de efecto matriz:** realizar el fortificado de todas las muestras con una solución de concentración conocida. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Se aceptan % de recuperación entre 75 – 125 %, hasta que se cuente con los suficientes datos para generar un gráfico de control según PGC 13. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service Soil Survey Laboratory Methods Manual, Soil Survey Investigations Report No. 51 Version 1.0, pág. 1.022-23 85-88

14.2. United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service Soil Survey Laboratory Methods Manual, Soil Survey Investigations Report No. 42 Version 4.0, pág. 231-234