

Práctica 1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA DE UN SUELO

En el suelo el carbono puede hallarse de diferentes formas:

- Compuestos inorgánicos (carbonatos, CO₂, etc.).
- Compuestos orgánicos, restos de animales y plantas más o menos transformados y los productos derivados de ellos, que constituyen el humus.
- Forma elemental (carbón, grafito, etc.).

El conjunto de todas las formas bajo las que se presenta el C representa el carbono total del suelo. No obstante, el análisis que se suele realizar y los datos que corrientemente se manejan se refieren únicamente a la fracción oxidable, que sólo incluye los compuestos orgánicos presentes en el suelo.

El interés de este análisis reside en:

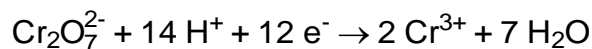
- Obtener una información indirecta acerca de las propiedades físicas del suelo, ya que la M.O. influye en la retención de agua, en la estructuración y aireación del suelo.
- Interpretar aspectos relacionados con la nutrición de las plantas.
- Poder llegar a conocer la relación C/N que da una indicación sobre la velocidad de mineralización de la M.O., es decir, de la actividad de los microorganismos del suelo.
- Efectuar la corrección en los cálculos referentes a los análisis granulométricos, etc.

La determinación cuantitativa de la materia orgánica se realiza analizando el carbono orgánico. Los métodos de análisis para el carbono orgánico se basan en la oxidación de éste. Pueden agruparse en dos clases:

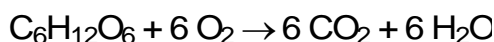
- Métodos por vía seca, basados en la medida del CO₂ desprendido en una combustión o por pérdida de peso de la muestra resultante.
 - El contenido de materia orgánica se obtiene por diferencia de pesada tras una combustión de 5 horas en mufla a 550°C
 - Mediante auto-analizadores que incorporan un proceso de combustión a 950°C y un posterior análisis de los gases generados. Su precisión es mayor que la de otros métodos al poderse acoplar a una determinación de los gases de combustión por cromatografía de gases o celdas de IR. Se obtiene el valor de C total del suelo
- Métodos por vía húmeda, basados en una oxidación parcial con un agente oxidante. El grado de oxidación logrado dependerá de las condiciones en que tenga lugar la reacción, con aporte de calor, o sin él. Si no se trabaja a temperatura controlada (150°C) se hace necesaria la utilización de un factor estadístico, que correlacione el C oxidable determinado con la técnica de oxidación seguida y el C oxidable por vía seca. Este factor no tiene un carácter universal.

El método por vía húmeda se fundamenta en las siguientes reacciones:

- Reducción del Cr^{6+}

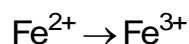


- Oxidación de la materia orgánica.



En ella se considera que la materia orgánica del suelo tiene la fórmula de un hidrato de carbono (glucosa).

- Valoración del exceso de oxidante con una sal ferrosa, la sal de Mohr.



Este método es aplicable a tomas de muestra que contengan menos de 20 mg de C en valor absoluto. La rentabilidad de los resultados es dudosa si el suelo contiene un porcentaje de M.O. superior al 15%. La mínima cantidad de muestra pulverizada a tomar es de 0,0625 g, por debajo de este peso la reproducción de los resultados es baja. En el caso de muestras muy ricas en M.O. es preferible duplicar la cantidad de dicromato potásico y ácido sulfúrico a disminuir excesivamente el peso de muestra. La sensibilidad del método es de 0,3 a 0,8% de materia orgánica.

Material.

- Mortero.
- Balanza.
- Bureta de 50 mL.
- Matracas Erlenmeyer de 250 mL de vidrio Pyrex.
- Matracas aforados de 100 mL y 1000 mL.
- Probeta de 25 mL.
- Vasos de precipitado de 100 mL y 500 mL.

Reactivos.

- R-1. *Dicromato potásico 1 N.* Se disuelven 49,05 g de dicromato potásico previamente seco en estufa a 105 °C, en 900 mL de agua destilada y enrasar a 1 L.
- R-2. *Ácido sulfúrico concentrado* del 96% ($d = 1,84 \text{ g/cm}^3$).
- R-3. *Sal de Mohr 0,5 N.* Disolver 196,1 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sal de Mohr) en 800 mL de agua desmineralizada que contenga 20 mL de H_2SO_4 ; enrasar a 1L.
- R-4. *Solución de difenilamina.* Para ello, 2,50 g del producto se disuelven en 20 mL. de agua destilada y 100 mL de H_2SO_4 concentrado.
- R-5. *Ácido fosfórico (H_3PO_4) concentrado.*

Procedimiento.

Pulverizar en mortero unos 10 g de muestra del suelo A, de forma que el polvo resultante pase por un tamiz de 0,2 mm. Pesar entre 0,5 de muestra (que contenga menos de 20 mg de C) en matraz erlenmeyer de 250 mL. Añadir 10 mL de solución 1 N de dicromato potásico (R-1), imprimiendo un movimiento de giro al erlenmeyer para asegurar una mezcla íntima. Añadir lentamente y agitando, 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (R-2). Agitar suavemente para asegurar el contacto íntimo de los reactivos con la muestra. Evitar que se adhieran partículas en las paredes del erlenmeyer fuera del contacto de la solución. Dejar el matraz erlenmeyer en reposo durante 20 minutos. Añadir unos 100 mL de agua desmineralizada y dejar enfriar. Añadir 10 mL de ácido fosfórico concentrado (R-5). Añadir unas 5 gotas del indicador (difenilamina) (R-4). Valorar con la solución ferrosa (R-3), anotando el volumen gastado. (Viraje de azul oscuro a verde). Previamente hay que hacer un ensayo en blanco con todos los reactivos menos el suelo.

Cálculos y expresión de resultados.

De acuerdo con el fundamento del método, la valoración por retroceso con la sal ferrosa permite determinar el exceso de dicromato potásico. Por diferencia se calcula el dicromato gastado, equivalente al carbono orgánico contenido en la muestra.

$$\%C - \text{orgánico} = (V_B - V_M) \cdot 10^{-3} \times N_{Fe} \times \frac{12}{4} \times \frac{1}{p} \times \frac{100}{(100 - \%H)} \times f$$

En ella:

V_B = volumen de sal ferrosa gastado en el ensayo en blanco.

V_M = volumen de sal ferrosa gastado con la muestra.

N_{Fe} = normalidad de la sal ferrosa.

p = peso de la muestra en g.

f = factor de recuperación (de acuerdo con la técnica operatoria seguida, en este caso su valor es 1,3).

El factor de recuperación f depende de la intensidad con que tenga lugar la oxidación del carbono orgánico. En el método empleado, sin aporte de calor, se supone una recuperación del 77% de carbono orgánico de la muestra.

Para pasar de carbono orgánico a materia orgánica, se debe multiplicar por el factor de Van Bemmelen, deducido estadísticamente y que supone que la M.O. del suelo contiene un 58% de carbono orgánico.

$$\% \text{ M.O.} = \% \text{ C} \times 1,724$$

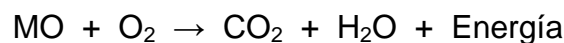
Los resultados se expresan como porcentaje de materia orgánica.

Práctica 2 DETERMINACIÓN DE LA RESPIRACIÓN BASAL DE UN SUELO

En la estimación de la actividad microbiana del suelo se pueden diferenciar dos diferentes tipos de experiencias:

- Experiencias en campo, las cuales requieren largos tiempos de seguimiento y una alta variabilidad por la influencia de las condiciones ambientales (temperatura, humedad, lixiviación)
- Análisis en laboratorio con muestras incubadas a temperatura y humedad controladas y en la que otros factores como la contribución de plantas u otros organismos puede ser excluida

La respiración del suelo es un proceso que refleja la actividad biológica de ese medio y que se puede determinar mediante el seguimiento del desprendimiento de CO₂, o bien mediante el consumo de O₂ como producto del metabolismo de los organismos vivos. En la respiración se produce la oxidación de la materia orgánica siendo el O₂ el aceptor final de electrones, con lo que se obtiene CO₂ y H₂O:



El término respiración del suelo hace referencia a la actividad global de la biota del suelo, lo que incluye microorganismos (bacterias, algas, hongos y protozoos), así como macro-organismos (lombrices, nematodos e insectos). Es por tanto una medida de su salud al reflejar su estado biológico.

También las medidas respirométricas se pueden realizar tanto en campo, como en laboratorio:

- Las medidas en campo o *in situ*, tienen la ventaja de tener el suelo inalterado y obedecer a condiciones naturales. En contrapartida, se tiene una medida global de toda la actividad biológica, no sólo la microbiana. Son los métodos de cámaras estáticas en la que se aísla una porción de suelo de la que se toma una alícuota de la atmósfera en equilibrio para analizar su composición gaseosa a diferentes periodos de tiempo. El análisis se puede realizar por cromatografía de gases o por absorción de radiación IR.



- Los métodos de laboratorio tienen la desventaja de alterar la estructura del suelo, por lo que el intercambio gaseoso no es el que se produce realmente en el suelo. Sin embargo, el control de otros parámetros como humedad y temperatura permite una gran precisión.

Uno de los métodos más sencillos es la utilización de frascos de cierre hermético en los que se introduce una muestra de suelo y un vial con una disolución de álcali donde se absorbe el CO_2 emitido. La valoración de esta disolución al cabo de un tiempo de incubación en oscuridad, permite la determinación de la respiración basal del suelo.

Métodos más sofisticados son los que determinan el flujo en continuo de los gases emitidos, bien por variaciones de presión como los sistemas Oxitop, la absorción del CO_2 en una celda electrolítica o la determinación en continuo mediante una celda de IR.



Material.

- Frascos de conserva de cierre hermético de 1 L de capacidad.
- Estufa de incubación con rango de temperatura entre 25-30°C.
- Bureta de 50 mL.
- Viales desechables de 50 mL

Reactivos.

- R-1. *Disolución de NaOH 0,5 N.* Se disuelven 19,99 g de NaOH en 800 mL de agua destilada y se enrasa a 1 L en matraz aforado
- R-2. *Disolución de HCl 0,5 N.* Se diluyen 41,4 mL de HCl concentrado en 800 mL de agua destilada y se enrasa a 1 L en matraz aforado
- R-3. *Disolución de BaCl_2 0,5 M.* Se disuelven 122,14 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua destilada
- R-4. *Disolución indicadora de fenolftaleína.* Se disuelve 0,1 g de fenolftaleína en 100 mL de etanol al 60% (v:v)

Procedimiento

Sobre una muestra de suelo secada al aire y tamizada a 2 mm, se toma una porción de 200 g en una bolsa de plástico. Se añade agua destilada hasta alcanzar el 60% de su capacidad de retención hídrica (aproximadamente 30%

humedad en peso). Se deja la muestra incubar a temperatura ambiente durante al menos 3 días hasta estabilizar la actividad biológica.

Se pesan 65 g de suelo húmedo pre-incubado en un vial de 50 mL y se coloca en el frasco de cierre hermético. En otro vial de 20 mL se introducen 10 mL de la solución de NaOH 0,5 M (R-1). Se cierra el frasco herméticamente y se incuba a 25°C durante 24 horas en oscuridad.

En paralelo se debe preparar un blanco sin suelo que sirve como control de la concentración de CO₂ atmosférico.

A los viales con la solución de NaOH (muestra y blanco) se añaden 5 mL de la solución de BaCl₂ (R-3), unas gotas de indicador ácido-base (R-4) y se valora con la disolución de HCl 0,5 N (R-2) hasta el viraje de rosa a incoloro.

Cálculos y expresión de los resultados

Los valores de respiración expresados en mg C-CO₂ kg⁻¹ suelo seco día⁻¹ se calculan mediante la expresión:

$$C - CO_2(\text{mg kg}^{-1} \text{ suelo seco día}^{-1}) = \frac{(B - S) \times M \times 6}{g \times t}$$

En ella:

- B** = volumen de HCl empleado en la determinación de los blancos
- S** = volumen de HCl empleado en la determinación de la muestra de suelo
- M** = molaridad exacta del HCl
- 6** = factor de conversión considerando que 1 mL de NaOH equivalen a 6 mg de C-CO₂
- g** = cantidad de suelo seco
- t** = tiempo de incubación en días

La experiencia se puede repetir en días sucesivos midiendo la respiración del suelo en un intervalo de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 días. Con ello se puede representar la evolución de los valores de respiración con el tiempo de incubación y también, sumando dichos valores, la curva de respiración acumulada.

Dicha curva de CO₂ acumulado se puede ajustar a un modelo cinético de primer orden mediante la ecuación:

$$C_{min}(\text{mg kg}^{-1} \text{ suelo seco}) = C_0(1 - e^{-kt})$$

En ella:

- C_{min}** = carbono mineralizable en mg kg⁻¹ suelo seco
- C₀** = carbono potencialmente mineralizable en mg kg⁻¹ suelo seco
- k** = constante de mineralización no lineal en días⁻¹

Aquí se muestran ejemplos obtenidos de una incubación en nuestro laboratorio:

