

Adaptacion y validacion de metodologia para cuantificar las fracciones de nitrógeno organico en suelo

Adaptation and validation of methodology for quantifying organic nitrogen fractions in soil

Cristo Omar Puente-Valenzuela^{1*}, Erika Nava-Reina¹, Rubí García-Arjon²,
Janeth Berenice Carrillo-Castañeda³

¹CENID RASPA INIFAP Km. 6.5 margen derecha Canal de Sacramento, C.P. 35079, Gómez Palacio, Durango.

²Facultad de Ciencias Biológicas de la UJED Universidad S/N, Núcleo Universitario, Filadelfia, 35019 Gómez Palacio, Dgo.

³Laboratorio Sociedad Cooperativa Agropecuaria de la Comarca Lagunera S.C.L. Cuatro Ciénegas SN Parque Industrial Carlos A Herrera Araluce Gómez Palacio Dgo.

*Autor para correspondencia: puente.cristo@inifap.gob.mx

RESUMEN

El fraccionamiento del nitrógeno orgánico en el suelo está relacionado con el contenido de carbono orgánico, ya que cuanto más nitrógeno esté asociado al carbono, mayor será su consumo por microorganismos, lo que da lugar a una distribución en las reservas de carbono orgánico, siguiendo una clasificación de la FAO. La cuantificación de estas reservas se basa en métodos que utilizan la capacidad de oxidación de la mezcla crómica-ácida con variación de la acidez para extraer las reservas de carbono y nitrógeno. Esta información es crucial para evaluar el atractivo energético de los compuestos orgánicos en diferentes fracciones de carbono en el suelo, considerando al nitrógeno como una etiqueta energética que indica la labilidad de las reservas de carbono ante el metabolismo microbiano. Conocer el contenido de nitrógeno en cada reserva de carbono en el suelo es fundamental para comprender la captura de carbono y evaluar las tasas de mineralización de nitrógeno, especialmente en el contexto de la producción agrícola y la mitigación del cambio climático. Se realizaron pruebas para determinar el Límite Óptimo Detectable (LOD) y el Límite Óptimo Cuantificable (LOC) arrojando valores de 0.77 y 2.30, lo que equivale al 0.003% de Nt para el LOD y al 0.0115% de Nt para el LOC, se logró un promedio de recobro de la metodología del 98.7% y un recobro del 99.9 % para el ensayo de fraccionamiento de nitrógeno lo que refleja una alta eficiencia en la cuantificación del nitrógeno en muestras de suelo

Palabras clave: Nitrógeno total, Fraccionamiento, Suelos.

ABSTRACT

The fractionation of organic nitrogen in soil is related to the organic carbon content because the more nitrogen is associated with carbon, the greater its consumption by microorganisms, leading to a distribution in organic carbon reserves, following an FAO classification. The quantification of these reserves is based on methods that use the oxidation capacity of the chromic-acid mixture with acidity variation to extract carbon and nitrogen reserves. This information is crucial for evaluating the energetic attractiveness of organic compounds in different soil carbon fractions, considering nitrogen as an energy label that indicates the lability of carbon reserves to microbial metabolism. Knowing the nitrogen content in each carbon reserve in the soil is essential to understand carbon capture and assess nitrogen mineralization rates, especially in the context of agricultural production and climate change mitigation. Tests were conducted to determine the Limit of Detection (LOD) and the Limit of Quantification (LOQ), resulting in values of 0.77 and 2.30, equivalent to 0.003% of Nt for LOD and 0.0115% of Nt for LOQ. An average recovery rate of 98.7% was achieved for the methodology, and a 99.9% recovery rate for the nitrogen fractionation test, reflecting high efficiency in nitrogen quantification in soil samples.

Keywords: Total nitrogen, Fractionation, Soils

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es el séptimo elemento de la tabla periódica con una masa atómica de $14.0067 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, el cual su principal reserva en el planeta es la atmósfera, representando hasta un 70 por ciento de su composición, en su forma de gas diatómico (N_2). Entre sus características principales es que este puede presentar diferentes estados de oxidación (valencias) que pueden ir desde -3 a $+5$, generando una gama compuestos nitrogenados, los cuales podemos encontrar en las distintas esferas ambientales del planeta. El proceso de fijación de nitrógeno mediada por microorganismos especializados es la principal fuente de nitrógeno para los productores primarios; a nivel de suelo el nitrógeno además de esta fijación puede tener orígenes derivados del proceso de degradación de la materia orgánica, formando parte de una gran gama de biomoléculas como lo son los aminoácidos, bases nitrogenadas, metabolitos secundarios entre otros, esto se debe a que el nitrógeno es capaz de formar enlaces covalentes con los diferentes elementos primarios que constituyen a los seres vivos (Hayashi, 2022; Sardar et al., 2023; Zhang et al., 2022).

El fraccionamiento de nitrógeno orgánico en el suelo obedece al atractivo energético que podrá tener el carbono orgánico en el suelo, de manera que entre más nitrógeno se encuentre asociado al carbono mayor será el consumo de este por efecto de los microorganismos por su contenido de nitrógeno, de esta manera el contenido de nitrógeno en las reservas de carbono orgánico deberá ser mayor en la reserva rápida, seguido por la intermedia y finalmente la tardía, de acuerdo a la clasificación de la FAO (Lefèvre et al., 2017). Con respecto al fraccionamiento o cuantificación de las reservas de carbono orgánico en el suelo, existen una serie de trabajos y metodologías las cuales se basan principalmente en el poder de oxidación de la mezcla crómica – ácida con variación del nivel de acidez para extraer las reservas de carbono; Rovira y colaboradores proponen una metodología para la extracción de las fracciones de carbono orgánico y de nitrógeno, con el objeto de evaluar la calidad de la materia orgánica presente en el suelo, la cual se basa en la capacidad de extracción del ácido sulfúrico a diferente normalidad para obtener las distintas reservas de carbono orgánico y con ello el nitrógeno asociado a cada reserva (McLaughlan & Hobbie, 2004; Rovira & Ramón Vallejo, 2002, 2007).

El objeto de evaluar el fraccionamiento de nitrógeno en la materia orgánica del suelo es generar un índice o relación que permita evaluar cuanto es el atractivo energético de los compuestos orgánicos de las distintas fracciones de carbono, considerando a la presencia del nitrógeno como una etiqueta energética la cual indicaría que aún puede extraerse energía del compuesto orgánico de manera que entre más nitrógeno tenga una reserva de carbono mayor será su labilidad ante el metabolismo microbiano del suelo (Gunina & Kuzyakov, 2022). El conocer el contenido de nitrógeno que tiene cada reserva de carbono en suelo, permitirá poder elucidar procesos de captura de carbono, evaluar tasas de mineralización de nitrógeno (rápidas – intermedias) esto con fines de producción en la agricultura y con ello contribuir a mitigar el cambio climático y la disminución de la contaminación por uso excesivo de contaminantes nitrogenados (Deng et al., 2021; Lu et al., 2021; Tang et al., 2023). En el presente trabajo tiene por objeto establecer una metodología que permita la extracción de las fracciones de nitrógeno y su cuantificación, basados en los trabajos de Rovira y colaboradores, además de la adaptación colorimétrica de la cuantificación de nitrógeno, esto para hacer del ensayo una determinación accesible, rápida y reproducible para una práctica rutinaria del que hacer de un laboratorio de suelos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de laboratorio se realizó dentro de las instalaciones del laboratorio de suelos del CENID RASPA INIFAP. Para la evaluación de la precisión, recobro y exactitud de la adaptación metodológica se utilizaron los siguientes materiales de referencia: el set de 7 estándares de suelos de Elemental Microanalysis® (B2196), estándares Ieco® para suelos (502-962, 502-697) Con los valores de nitrógeno total expresados en la Tabla 1. La mezcla catalítica estuvo constituida de la siguiente manera: 100 g de sulfato de potasio, 20 g de sulfato de cobre pentahidratado, 12 g de ácido salicílico y 2 gramos de selenio, perfectamente homogenizada y molida a una malla de 400 micras; para la reacción colorimétrica se empleó una solución del 21.5 por ciento de ácido salicílico y 0.15 por ciento de nitroprusiato de sodio disueltos en hidróxido de sodio al 5 N y una solución al 0.2 por ciento de dicloroisocianurato de sodio disuelto en agua destilada; con las cuales se prepara una solución de trabajo con una relación 1:5 entre la solución de dicloroisocianurato y la

solución de ácido salicílico, la cual fue preparada al momento del análisis (para todos los casos de reactivos se empleó grado ACS).

Para el análisis se emplea una masa de 0.2 g de muestra y/o estándar, digiriendo con 0.6 g de mezcla catalítica y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, calentadas sobre plato caliente a 350 °C hasta el aclaramiento de la muestra y/o la formación de un color azul en los digeridos, para la adición de 10 gotas de peróxido de hidrógeno al 30 por ciento por las paredes del contenedor y calentar por 10 minutos más. Los digeridos son enfriados y aforados con agua destilada a 10 mL para su análisis colorimétrico. Para la reacción colorimétrica se emplearon 100 microlitros de digerido y/o estándar, mezclados con 3 mL de solución de trabajo, dejando reaccionar por 15 minutos a temperatura ambiente y leer frente a blanco reactivo a 640 nm en espectrofotómetro uv-vis Genesis®20, interpolando en curva de adiciones con un rango de trabajo de 4 a 64 mg/L de N-NH₄.

Para el fraccionamiento de nitrógeno se emplearon 0.4 g de muestra/estándar los cuales fueron sometidos de forma secuencial a extracciones ácidas con ácido sulfúrico con normalidades de 6, 24 y 36 N, obteniendo el sobrenadante de cada extracción por centrifugación a 3500 rpm por 10 min, en el primer extractante con una incubación a 90°C por 60 min, en la segunda extracción a 40°C por 18 h y una hora a 90°C y la última por una incubación de 3 h a 90°C. en todos los casos recuperando 8 ml del extractante el cual fue sometido a la digestión y colorimetría descrita en párrafos anteriores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el cálculo del límite óptimo detectable (LOD) y límite óptimo cuantificable (LOC) se realizó un análisis de una n = 5 curvas adicionadas de calibración en un rango de trabajo de 4 – 64 mg/L de N-NH₄, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.99996 con la siguiente ecuación de recta: $Y = 0.008926 \cdot X - 0.004194$ (ver figura 1), para la estimación de LOD y LOC se empleó el método de Miller & Miller obteniendo los siguientes valores 0.77 y 2.30 respectivamente, lo cual es equivalente a 0.003 % Nt de LOD y 0.0115 % Nt de LOC.

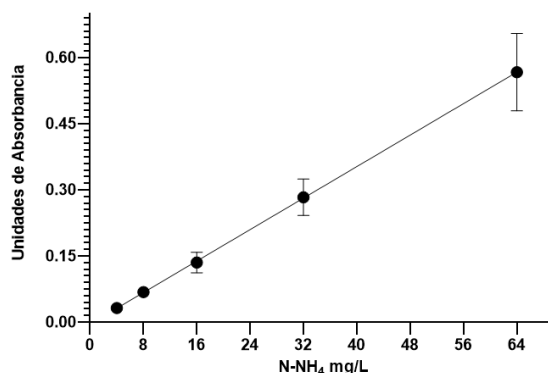


Figura 1. Curva de calibración para la cuantificación de nitrógeno

se muestra la curva de calibración de adiciones estándar resultante de una n = 6 repeticiones con un rango de trabajo de 4 – 64 mg/L, obteniendo la ecuación $Y = 0.008926 \cdot X - 0.004194$, con un coeficiente de correlación de $r = 0.99996$

En la Tabla 1, pueden observarse los recobros obtenidos para cada estándar ensayado, obteniendo un promedio general de 98.7 por ciento para la matriz de suelo, para la cuantificación colorimétrica de nitrógeno total en suelo.

Tabla 1. Serie de material de referencia certificado analizados con valores de recuperación.

Tipo de estándar	Nt Rep (%) ± Incertidumbre	Nt Rec ± SD / % Rec
Arcilla (B2196)	0.230 ± 0.010	0.236 ± 0.016 / 102.68
Arcilloso (B2196)	0.270 ± 0.010	0.256 ± 0.020 / 95.110
Arenoso (B2196)	0.043 ± 0.010	0.037 ± 0.005 / 87.740
Calcáreo (B2196)	0.320 ± 0.010	0.299 ± 0.021 / 93.460
Limoso (B2196)	0.182 ± 0.010	0.182 ± 0.050 / 100.40
Mineral (B2196)	0.027 ± 0.002	0.026 ± 0.008 / 97.920
Turboso (B2196)	1.240 ± 0.040	1.234 ± 0.208 / 99.570
LECO 01 (502-962)	0.101 ± 0.009	0.104 ± 0.019 / 102.98
LECO 02 (502-697)	0.328 ± 0.083	0.350 ± 0.015 / 106.80

Nt Rep (%): valor de nitrógeno total contenido en el material de referencia; Nt Rec (%): valor de nitrógeno total ensayado bajo la técnica citada, SD: Desviación estándar; % Rec: por ciento de recuperación = $(Nt Rec \% / Nt Rep \%) \cdot 100$

Con respecto al fraccionamiento se han analizado los estándares de Arcilloso, Arenoso y Leco 2, de manera estratégica por los contenidos reportados, valor bajo, medio y alto en los certificados, obteniéndose las recuperaciones y fracciones reportadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Fraccionamiento y recobros de estándares certificados.

Fracción	Calcáreo (B2196)	Arenoso (B2196)	LECO 02 (502-697)
F1 (%)	0.142	0.009	0.055
F2 (%)	0.161	0.022	0.135
F3 (%)	0.071	0.012	0.057
Nt (%)	0.374	0.043	0.247
Rec	116.8	100.8	82.2

F1. fracción rápida, F2 fracción intermedia, F3 fracción tardía de nitrógeno orgánico en suelo, Nt valor de nitrógeno total recuperado y Rec porciento de nitrógeno

Si bien no se han ensayado por completo la serie de estándares certificados el fraccionamiento del nitrógeno bajo las condiciones experimentales ensayadas es viable para el resto de los estándares, cumpliendo con los estándares de calidad de las validaciones de los ensayos en las determinaciones analíticas, los datos de fraccionamiento obtenidos con en los estándares con coincidentes con los reportados por Rovira (Rovira & Ramón Vallejo, 2002, 2007).

CONCLUSIONES

El fraccionamiento de nitrógeno orgánico en suelos es una metodología reproducible y con límites de detección y cuantificación aceptables de acuerdo a lo establecido en la normativa internacional, así como sus recuperaciones y exactitud.

LITERATURA CITADA

- Deng, L., Peng, C., Kim, D. G., Li, J., Liu, Y., Hai, X., Liu, Q., Huang, C., Shanguan, Z., & Kuzyakov, Y. (2021). Drought effects on soil carbon and nitrogen dynamics in global natural ecosystems. In *Earth-Science Reviews* (Vol. 214). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2020.103501>
- Gunina, A., & Kuzyakov, Y. (2022). From energy to (soil organic) matter. *Global Change Biology*, 28(7), 2169–2182. <https://doi.org/10.1111/gcb.16071>
- Hayashi, K. (2022). Nitrogen cycling and management focusing on the central role

of soils: a review. In *Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 68, Issues 5–6, pp. 514–525). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/00380768.2022.2125789>

- Lefèvre, C., Rekik, F., Alcantara, V., & Wiese, L. (2017). CARBONO ORGÁNICO DEL SUELO el potencial oculto.
- Lu, X., Vitousek, P. M., Mao, Q., Gilliam, F. S., Luo, Y., Turner, B. L., Zhou, G., & Mo, J. (2021). Nitrogen deposition accelerates soil carbon sequestration in tropical forests. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020790118/-/DCSupplemental>
- McLauchlan, K. K., & Hobbie, S. E. (2004). Comparison of Labile Soil Organic Matter Fractionation Techniques. *Soil Science Society of America Journal*, 68(5), 1616–1625. <https://doi.org/10.2136/sssaj2004.1616>
- Rovira, P., & Ramón Vallejo, V. (2002). Labile and recalcitrant pools of carbon and nitrogen in organic matter decomposing at different depths in soil: an acid hydrolysis approach. In *geoderma* (Vol. 107). www.elsevier.com/locate/
- Rovira, P., & Ramón Vallejo, V. (2007). Labile, recalcitrant, and inert organic matter in Mediterranean forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 202–215. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.07.021>
- Sardar, M. F., Younas, F., Farooqi, Z. U. R., & Li, Y. (2023). Soil nitrogen dynamics in natural forest ecosystem: a review. In *Frontiers in Forests and Global Change* (Vol. 6). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2023.1144930>
- Tang, B., Rocci, K. S., Lehmann, A., & Rillig, M. C. (2023). Nitrogen increases soil organic carbon accrual and alters its functionality. *Global Change Biology*, 29(7), 1971–1983. <https://doi.org/10.1111/gcb.16588>
- Zhang, L., Xiong, K., Wang, X., & Wan, P. (2022). Study of Soil Nitrogen in Karst Rocky Desertification Areas: a Literature Review. In *Polish Journal of Environmental Studies* (Vol. 31, Issue 6, pp. 5533–5547). HARD Publishing Company. <https://doi.org/10.15244/pjoes/152450>