

METODOS ANALITICOS PARA SUELOS ACIDOS Y PLANTAS

0

José G. Salinas y Ramiro García

Suelos - Nutrición de Plantas

Programa Pastos Tropicales

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT)

Apartado Aéreo 67-13 - Telex 05769

Calí - Colombia

1979

TABLA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	1
1.1. PROPOSITOS	1
1.2. PRECISION DE LAS MEDICIONES EN LOS ANALISIS DE SUELOS Y PLANTAS	2
1.3. EXACTITUD DE UNA MEDICION	4
1.4. MEDICION PRECISA DE VALORES VERDADEROS CONSTANTES	4
1.5. NUMERO DE MUESTRAS	4
1.6. TIPOS DE ERRORES	5
1.7. CIFRAS SIGNIFICATIVAS	6
2. RECEPCION, PREPARACION Y ALMACENAJE DE MUESTRAS	8
2.1. RECEPCION DE MUESTRAS	8
2.2. PREPARACION DE MUESTRAS	10
2.2.1. Suelo	10
2.2.2. Tejido Vegetal	11
2.3. ALMACENAJE DE MUESTRAS	11
3. METODOLOGIA ANALITICA PARA SUELOS ACIDOS	13
3.1. SUBMUESTREO EN LABORATORIO	13
3.2. ANALISIS PRELIMINAR DEL SUELO	14
3.2.1. Determinación de pH (Relación Suelo-Agua 1:1)	15
A. Material	15
B. Procedimiento	15
3.2.2. Determinación de la Conductividad Eléctrica	15
A. Material	15
B. Reactivos	15
C. Procedimiento	15
3.2.3. Determinación de la presencia o ausencia de CaCO ₃ Libre. Prueba de Efervescencia	16

3.3.	DETERMINACION DE MATERIA ORGANICA	16
	A. Material	16
	B. Reactivos	16
	C. Procedimiento.....	17
	D. Cálculos	17
3.4.	DETERMINACION DE FOSFORO	18
	3.4.1. Fósforo Extraíble por Fluoruro Diluido-Acido Diluido. (Bray y Kurtz No. 2)	18
	A. Material	18
	B. Reactivos	18
	C. Procedimiento	20
	D. Cálculos	20
	3.4.2. Fósforo Extraíble por Carbonato Acido de Sodio	20
	A. Material	21
	B. Reactivos	21
	C. Procedimiento	22
3.5.	DETERMINACION DE CATIONES CAMBIABLE EN SUELOS CON pH MENOR A 5.4, CON CARGA VARIABLE EN FUNCION DEL pH Y NO CALCAREOS, NO SALINOS	24
	3.5.1. Obtención del Extracto del Suelo	24
	A. Material	24
	B. Reactivos	24
	C. Procedimiento	24
	3.5.2. Acidez Intercambiable (Al + H)	24
	A. Material	24
	B. Reactivos	24
	C. Procedimiento	25
	D. Cálculos	25
	3.5.3. Calcio (Ca)	26
	A. Determinación	26
	B. Preparación del Estándar de Calcio	26

	<u>Página</u>
3.5.4. Magnesio (Mg)	27
A. Determinación	27
B. Preparación del Estándar de Magnesio	27
3.5.5. Manganeso (Mn)	27
A. Determinación	27
B. Preparación de Estándares de Mn	28
3.5.6. Determinación de Potasio (K)	28
A. Material	28
B. Reactivo	28
C. Procedimiento	28
D. Preparación de Estándar de K	29
3.5.7. Parámetros Derivados	29
A. Capacidad de Intercambio Catiónico Efectivo (CICE).	29
B. Porcentaje de Saturación de Aluminio	30
3.6. DETERMINACION DE CATIONES CAMBIABLES EN SUELOS CON pH 5.4 - 7.0, CON CARGA NO DEPENDIENTE DEL pH Y NO CALCAREOS, NO SALINOS	30
3.6.1. Obtención del Extracto de Suelo	30
A. Material	30
B. Reactivos	30
C. Procedimiento	31
3.6.2. Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Potasio (K)	31
A. Determinación	31
B. Preparación de Estándares de Ca, Mg y K	32
3.6.3. Sodio (Na)	32
A. Determinación	32
B. Preparación de Estándares de Sodio	33
3.7. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO (CIC) DE pH MAYOR A 5.4 - 7.0, CON CARGA NO DEPENDIENTE DE pH Y NO CALCAREOS, NO SALINOS	33

	<u>Página</u>
A. Material	33
B. Reactivos	33
C. Procedimiento	33
D. Cálculos	34
3.8. DETERMINACION DE AZUFRE (S)	34
3.8.1. Obtención del Extracto de Suelo	34
A. Materiales	34
B. Reactivos	34
C. Procedimiento	34
3.8.2. Método turbidimétrico para determinar azufre en el extracto de suelo	35
A. Material	35
B. Reactivos	35
C. Procedimiento	35
D. Preparación de Estándares de S	36
E. Cálculos	36
3.9. DETERMINACIONES DE MICRONUTRIMENTOS	36
3.9.1. Boro (B)	36
A. Material	36
B. Reactivos	37
C. Procedimiento	37
D. Cálculos	37
E. Soluciones Estándares de Boro	37
3.9.2. Zinc (Zn), Cobre (Cu), Hierro (Fe)	38
A. Material	38
B. Reactivo	38
C. Procedimiento	38
D. Determinación	38
E. Preparación de Estándares de Elementos Menores	39

	<u>Página</u>
4. METODOLOGIA ANALITICA PARA PLANTAS	40
4.1. OBTENCION DEL EXTRACTO DE TEJIDO VEGETAL	40
A. Material	40
B. Reactivos	40
C. Procedimiento	40
4.2. DETERMINACIONES DE FOSFORO (P), POTASIO (K), CALCIO (Ca) Y MAGNESIO (Mg)	40
4.2.1. Fósforo (P)	40
4.2.2. Potasio (K)	41
A. Determinación	41
B. Estándares de Potasio (K)	41
C. Cálculos	41
4.2.3. Calcio (Ca)	41
4.2.4. Magnesio (Mg)	42
4.3. DETERMINACION DE AZUFRE (S)	42
A. Material	42
B. Reactivos	42
C. Procedimiento	43
D. Preparación de Estándares de Azufre (S)	43
4.4. DETERMINACIONES DE ALUMINIO (Al)	43
A. Material	43
B. Reactivos	44
C. Procedimiento	44
D. Preparación de Estándares de Aluminio (Al)	45
4.5. DETERMINACION DE NITROGENO (N)	45
A. Material	45
B. Reactivos	45
C. Procedimiento	46
D. Cálculos	47

4.6.	DETERMINACION DE MICRONUTRIMENTOS (Zn, Cu, Fe, Mn, Na).....	47
4.6.1.	Obtención del Extracto de Tejido Vegetal	47
	A. Materiales	47
	B. Reactivos	47
	C. Procedimiento y Determinación de Micronutrientos (Zn, Cu, Fe, Mn, Na)	47
4.6.2.	Determinación de Boro (B)	48
	A. Material	48
	B. Reactivos	48
	C. Procedimiento	48
4.7.	DETERMINACION DE SILICE CRUDA	49
	A. Material	49
	B. Reactivo	49
	C. Procedimiento	49
	D. Cálculos	49
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50

1. INTRODUCCION

1.1. PROPOSITOS.

La cuantificación analítica de suelos y tejidos vegetales es un instrumento efectivo para interpretar la existencia de deficiencias o excesos de minerales. Consecuentemente, el uso adecuado de esta información influye significativamente en las recomendaciones de fertilizantes. Sin embargo, debe admitirse que existe conflicto en las fases de cuantificación, interpretación y recomendación debido a la alta variabilidad existente en estas fases. Esta variabilidad, generalmente, es consecuencia de la diversidad de métodos analíticos empleados y de los criterios técnicos adoptados en la interpretación y recomendación de los resultados analíticos en suelos y plantas. Probablemente, resulta utópico tratar de uniformizar las tres fases para todos los suelos existentes en los países así como para todo tejido vegetal. Sin embargo, resulta bastante desventajoso que suelos con propiedades químicas comparables existentes en América Tropical tengan una variabilidad en estas fases y principalmente en la cuantificación analítica. Por esta razón, es necesario uniformizar la metodología analítica.

La mayoría de los métodos y procedimientos descritos en esta publicación se utilizan actualmente en el Laboratorio de Servicios Analíticos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). En muchos casos, los métodos son descritos en forma suficientemente detallada, de tal manera que puedan reproducirse en muchos laboratorios, sin consultar otras fuentes. Sin embargo, en algunos casos será necesario modificarlos para adaptarlos a las condiciones propias de un laboratorio específico, especialmente en cuanto se refiere al material empleado. Por otra parte, los investigadores al necesitar alguna información detallada sobre los principios de la teoría o técnica de un método, deben consultar la literatura pertinente. Con este propósito, se incluyen referencias bibliográficas.

El propósito de esta publicación es describir métodos estandarizados de procedimientos analíticos de suelo y tejido vegetal con el fin de satisfacer por lo menos tres objetivos: (1) Que investigadores en América Tropical estén más enterados de la metodología analítica para suelos y

plantas de esta región; (2) Incrementar entre instituciones nacionales e internacionales el intercambio de métodos empleados en América Tropical para definir y emplear la mejor metodología disponible, y (3) Hacer del análisis de suelos y plantas una parte dinámica de la investigación.

1.2. PRECISION DE LAS MEDICIONES EN LOS ANALISIS DE SUELOS Y PLANTAS.

La precisión de las mediciones en los análisis de suelos y plantas, depende mayormente de la precisión del método, naturaleza de la muestra y del cuidado del laboratorista. La precisión se trata de la dispersión de los datos obtenidos en un análisis. Con mucha dispersión la precisión es baja y con poca dispersión la precisión es alta.

Cuando se dice que un instrumento mide con 100 por ciento de probabilidad hasta la unidad más cercana de 0.1, se puede considerar que el instrumento permite leer con una confianza de ± 0.05 de unidad porque el error máximo en el juicio visual del operador será la mitad de la última unidad legible del instrumento. Si el error máximo legible es igual o mayor que el error máximo del mecanismo del instrumento, entonces la lectura indica el error máximo del instrumento. Si la probabilidad del error máximo del instrumento es 100 por ciento, ésto significa que para varias repeticiones de una lectura con un valor dado, que se puede representar como el promedio de las lecturas, cada lectura tiene 100 por ciento de probabilidad de estar dentro de los siguientes límites de confianza.

$$\text{Promedio } \pm 0.05 \text{ de unidad} \quad [1]$$

El error máximo puede estar expresado en forma absoluta o relativa. La forma absoluta por ejemplo es ± 0.05 de unidad, en cambio la forma relativa sería la siguiente:

$$\frac{\pm 0.05}{\text{Valor de la lectura}} \quad [2]$$

Por ejemplo si se puede medir 10 cm con un error máximo absoluto de ± 0.05 mm, entonces el error máximo relativo sería mayor que cuando se puede leer 300 cm con un error máximo absoluto ± 0.05 mm. El error máximo relativo es de gran importancia para evaluar la medición y general-

mente se expresa en porcentaje. Con base en este principio el tamaño del error máximo relativo se puede controlar variando el valor del error máximo y el tamaño de la muestra de un suelo. Por ejemplo: si se quiere pesar una muestra de suelo hasta un error máximo relativo de 1 por ciento de la masa del suelo, se puede pesar una muestra de 1 g de masa con un error máximo absoluto de ± 0.005 g o una muestra de 10 g de masa con un error máximo absoluto de ± 0.05 g.

Los límites de confianza de una predicción expresados en la ecuación 1 también se puede expresar en forma más general de la manera siguiente (Steel y Torrie, 1960)

$$LC = \text{Promedio} \pm t_{\alpha} s \frac{n+1}{n}^{1/2} \quad [3]$$

Donde:

LC = Límite de confianza de un valor pronosticado.

t_{α} = Valor de t que corresponde a cierta probabilidad con (n-1) grado de libertad.

s = Desviación estándar del valor de una lectura.

n = Número de lecturas.

Al expresar los límites de confianza comúnmente se escoge probabilidades de 95 por ciento o 99 por ciento. Los límites de confianza constituyen una medida de la precisión de un análisis o de un ensayo. La precisión de un análisis trata de la medida de la dispersión de las repeticiones de la lectura de una muestra.

La precisión de un análisis depende de la naturaleza y tamaño de la muestra. En la realidad, un análisis de suelos o plantas comprende la medición de varias muestras. La dispersión en los valores de las lecturas también puede tener su origen en la variabilidad del material de la muestra. La exactitud en los análisis de suelos o plantas ha consistido en mezclar bien una muestra compuesta para reducir la variabilidad en las repeticiones. Además, el tamaño de la muestra para el análisis influye sobre la variabilidad. Por ejemplo, se cree que una muestra de alrededor de 1 g es la muestra mínima para determinar la densidad de los sólidos de un suelo. Por lo tanto, una muestra de 0.01 g de suelo tendrá poca oportu-

nidad de representar un promedio típico de la densidad del suelo de la muestra. La muestra más grande contendrá todos los constituyentes característicos de la distribución de todo el suelo de la muestra.

1.3. EXACTITUD DE UNA MEDICION.

En contraste con la precisión de una medición la cual trata de la dispersión de varias repeticiones del análisis, la exactitud de una medición trata de la desviación del valor de un ensayo en relación con el valor verdadero del sistema o medio que se mide. La exactitud trata, entonces, de un sesgo que existe en el ensayo. En el análisis de laboratorio el sesgo puede controlarse usando calibración y muestras de control. El error debido al sesgo puede ser sistemático (constante) o aleatorio. El error sistemático se discute más adelante. Se puede apreciar entonces, que un método puede tener mucha precisión pero poca exactitud.

1.4. MEDICION PRECISA DE VALORES VERDADEROS CONSTANTES.

En el laboratorio hay muchas mediciones que son precisas, es decir que los mismos valores se esperan dentro de los límites dados de la precisión del análisis. Ej.: Dentro de ± 0.1 g o dentro ± 5 por ciento del valor.

Generalmente para revisar la técnica del análisis se hace ensayos en triplicado y si todos los resultados se ajustan a las especificaciones, se saca un promedio de ellos. Si uno de los valores se desvía más allá del límite de las especificaciones, se saca un promedio de los dos valores conformantes. Si la técnica en el procedimiento se ha controlado, con frecuencia basta hacer duplicados para revisar la técnica.

Muchos ensayos de laboratorio de suelos siguen las normas anteriormente citadas, sin embargo, es necesario mezclar bien la muestra compuesta para poder aplicar dichas normas, porque sabemos que hay mucha variabilidad de muchas de las propiedades de un suelo en distancias muy cortas.

1.5. NUMERO DE MUESTRAS.

Si se tienen dos muestras, se hace referencia al promedio y al intervalo de las muestras. Si se tienen más de dos muestras, se determina el promedio y la desviación estándar, y la desviación estándar del promedio. El estimado de la desviación estándar mejora con un mayor número de muestras.

El número de muestras necesarias para lograr una precisión dada (desviación del promedio) para un nivel de probabilidad es:

$$n = \frac{t_{\alpha}^2 \times s^2}{D^2} \quad [4]$$

Donde:

s = Desviación estándar del promedio.

t_{α} = Valor de t con (n-1) grados de libertad a un nivel dado de probabilidad .

D = Precisión deseada (P = 0.05 ó 0.01)

Se calcula la desviación estándar (s) de las primeras muestras para probar por medio de la ecuación si hace falta tomar más muestras (Peterson y Calvin, 1965). Esta técnica se usa cuando se tiene como fin comparar promedios de diferentes parcelas, siendo dicha técnica útil para estudiar respuestas a tratamientos.

1.6. TIPOS DE ERRORES.

1. Error Aleatorio: Si se realiza un número grande de determinaciones de la misma cantidad (muchas repeticiones) se encuentra que los valores de esta medida varían dentro de ciertos límites. La curva de frecuencia de estos valores determina la precisión de la operación. El rango de los límites de esta distribución puede depender del instrumento o del procedimiento usado. Este tipo de desviación del verdadero valor de la medida se llama error aleatorio. En determinaciones precisas se asume que la distribución tiene un rango muy estrecho, y generalmente se usan muestras duplicadas; la segunda muestra sirve para verificar la técnica del operador.
2. Error Sistemático: Este tipo de error se debe a una falla o a un sesgo en el instrumento, o en la calibración del mismo o en el procedimiento, que aparece constantemente en todos los resultados. Este tipo de error es reproducible y no se puede eliminar mediante el empleo de muchas repeticiones. De tal manera, se pueden obtener

malos resultados aunque haya mucha concordancia entre las repeticiones. En este caso es necesario tomar en cuenta el método o el instrumento para corregir este error.

1.7. CIFRAS SIGNIFICATIVAS.

El número de las cifras significativas dentro de una cantidad, no depende del signo decimal en la cantidad, sino de cuántos dígitos son confiables y característicos de la cantidad considerada. Por ejemplo, si la cantidad es 0.025, los tres números después de la coma decimal son confiables. En cambio, si la cantidad es 25.000 y sabemos que el tercer dígito es confiable, debemos escribir el número como 2.5×10^4 o también 25.000, o también 25.0×10^3 .

En la práctica los registros de datos se hacen con una cifra adicional a la última cifra significativa. Posteriormente en el resultado final, solamente se emplean las cifras significativas.

Generalmente, en los análisis de suelos y plantas se miden varias cantidades a varios niveles de precisión, es decir, hasta un número dado de cifras decimales o hasta tantas cifras significativas.

En los cálculos se combinan cifras a diversos grados de precisión y hay que saber la manera en que estas combinaciones afectan el resultado final.

A este respecto las reglas siguientes son muy útiles:

1. En las sumas y en las restas no se deben retener más cifras decimales que las confiables en la cantidad que tiene el menor número de cifras decimales confiables.
2. En las multiplicaciones y las divisiones no se deben retener más cifras significativas que las cifras confiables en el factor con la menor cantidad de cifras significativas, o en otras palabras, las cantidades que tienen que ser multiplicadas o divididas deben tener el mismo número de cifras significativas. Es recomendable mantener una cifra más de las que las reglas indican hasta cuando se obtenga el resultado final (Minor, 1957).

Generalmente los cálculos incluyen una combinación de las operaciones matemáticas descritas en las reglas. Al realizar un cálculo es necesario

aplicar las reglas para evaluar el efecto total de dicho cálculo. Para mayor información sobre este asunto se puede consultar Minor (1957) y Olson et al. (1956).

2. RECEPCION, PREPARACION Y ALMACENAJE DE MUESTRAS

La determinación cuantitativa del contenido de un mineral específico en una muestra de suelo o planta, requiere en una primera fase, un procedimiento adecuado de muestreo que involucra la toma de la muestra en sí y la adecuada identificación de la misma. En una segunda fase, requiere una preparación apropiada y la aplicación de una metodología adecuada. La primera fase es la más crítica por el hecho de que aunque el análisis sea exacto, los resultados obtenidos no pueden ser mejores que la muestra. Existen procedimientos vigentes para el muestreo de suelos y tejido vegetal, y la aplicación de ellos depende del objetivo del muestreo. Referencias bibliográficas respecto al muestreo de suelos y tejido vegetal en el campo, se incluyen al final del texto. Entre ellos, sobresalen los trabajos de Chapman y Pratt (1961), Cline (1944), Hausenbuiller (1957), Peck y Melsted (1973), y Reed y Rigney (1947). Sin embargo, existen factores comunes a considerar en la recolección de muestras y entre ellos se citan:

1. Obtener una muestra representativa,
2. Evitar la contaminación,
3. Identificar la muestra en forma adecuada, y
4. Embalar y transportar las muestras al laboratorio lo más pronto posible.

En la mayoría de los casos, las muestras de suelo y planta son colocadas en bolsas plásticas (polietileno).

2.1. RECEPCION DE MUESTRAS:

Toda muestra, ya sea de suelo o tejido vegetal, antes del análisis químico o físico, debe pasar por una etapa de recepción. El propósito es identificar y preparar las muestras para dar entrada al laboratorio. En el caso del Laboratorio de Servicios Analíticos del CIAT, el usuario completa inicialmente un formulario de Solicitud de Análisis, similar al que se adjunta en el texto. Un formulario original completo y copia del mismo son anexados a las muestras al entregar a recepción. Es muy importante que el análisis solicitado se concentre específicamente en aquellos elementos que coadyuven en la explicación de los objetivos del trabajo realizado. Una vez realizado el análisis solicitado, el formulario original se devuelve al usuario con los resultados, y la copia se conserva en el laboratorio como récord de análisis.



Laboratorio Servicios Analíticos - CIAT
Solicitud de Análisis *

Programa: _____ No. serial laboratorio: _____
 Fecha muestreo: _____ Fecha entrega laboratorio: _____ Fecha entrega resultado: _____
 Suelo Tejido vegetal Tejido animal
 Procedencia: _____ Enviar resultados a: _____

Número	Descripción muestra	Análisis Solicitado

Observaciones: _____

*Enviar original y una copia con las muestras.

2.2. PREPARACION DE MUESTRAS :

2.2.1. Suelo. Las muestras de suelos debidamente identificadas, se transfieren a bandejas de madera (dimensiones 25 x 50 cms.) con base de anjeo para facilitar el flujo de calor a través de las muestras. Las muestras se secan en cajas diseñadas de tal forma que el aire, calentado por bombillos eléctricos, circule de la parte inferior hacia la parte superior con ayuda de un extractor, eliminando además la humedad de las cajas. La temperatura promedio es de 60°C y el tiempo de secado varía entre 24 y 48 horas, tiempo que depende del grado de humedad de las muestras.

Las muestras secas se someten a una molienda en molinos que tengan el cabezal y las cribas de acero inoxidable, lo que garantiza el análisis de micronutrientes. En la mayoría de los análisis rutinarios de suelos, las cribas corresponden a una malla No.10 (2 mm), con excepción en la determinación de la materia orgánica que se recomienda emplear suelo tamizado por malla No.60 (0.25 mm). El material molido es empacado en cajas de cartón con capacidad de 250 g, y estas cajas luego de identificadas con una numeración seriada, pasan al laboratorio.

Es importante remarcar que este proceso de preparación de las muestras de suelo exige que las muestras pasen inmediatamente al análisis químico y los resultados sean referidos en base a "suelo seco al aire". Caso contrario, cuando las muestras son almacenadas temporalmente, es necesario determinar un factor de humedad para cada muestra al momento del análisis, y los resultados deben ser ajustados por este factor para reducir el error.

Las determinaciones del contenido de humedad se realizan en submuestras de suelo seco al aire (10 g pesados exactamente) y secadas a 105°C por un período mínimo de 12 horas. El cálculo del Factor de Humedad (FH) está dado por:

$$\text{Factor de Humedad (FH)} = \frac{10}{\text{Peso de suelo seco a } 105^{\circ}\text{C}}$$

El contenido de humedad en la muestra de suelo está dado por la relación: % Humedad = 100 (FH-1.00). (Gardner, 1965). De esta manera, los resultados de los análisis son dados en términos de "suelo seco" (105°C).

2.2.2. Tejido Vegetal. Luego del muestreo del tejido vegetal, las muestras son generalmente sometidas a cuatro fases preparativas antes del análisis químico (Jones y Steyn, 1973).

1. Limpieza del material para remover la contaminación superficial.
2. Secado del material con el fin de parar las reacciones enzimáticas y preparar el material para la molienda.
3. Molienda mecánica para reducir el material a una fineza apropiada para el análisis químico.
4. Secado final a peso constante para obtener un valor uniforme en el cual se basan los resultados analíticos.

El material vegetal seleccionado para el muestreo está siempre cubierto con una capa fina de polvo. Esta contaminación afecta los resultados del análisis y por lo tanto debe ser removida antes que el material vegetal sea secado. Desde la limpieza con un paño o cepillo de cerdas finas, hasta el lavado con una solución de detergente al 0.1%, son los procedimientos recomendados para eliminar la contaminación del material vegetal (Steyn, 1959; Jones y Steyn, 1973). El proceso de lavado debe ser lo más rápido posible para evitar períodos largos de contacto de la solución con el tejido vegetal, ya que de lo contrario, se tiene el riesgo de lixiviar ciertos nutrimentos tales como K y Ca (Jones y Steyn, 1973).

Una vez realizada la limpieza del material vegetal, las muestras son sometidas al secado a 70 °C durante 24 horas y molidas en molinos tipo Wiley con cribas de acero inoxidable de 1 mm. El tejido vegetal seco y molido se empaca en frascos plásticos con capacidad mínima de 25 g, y deben ser sellados herméticamente para prevenir los cambios de humedad en las muestras durante su análisis. Caso contrario, las muestras deben ser secadas nuevamente antes de ser analizadas. Los frascos deben ser debidamente identificadas con numeración seriada al pasar al laboratorio.

2.3. ALMACENAJE DE MUESTRAS:

Las muestras de suelo y tejido vegetal una vez analizadas, deben ser almacenadas bajo inventario, durante seis meses, como medida de precaución en caso de que el usuario solicite determinaciones adicionales.

Al cabo de este tiempo, las muestras se entregan a los usuarios para su eliminación. El laboratorio debe conservar una serie de muestras de suelo y tejido vegetal para utilizarlas como controles en los análisis de muestras. Toda muestra almacenada debe secarse nuevamente antes de ser sometidas a nuevo análisis y ajustar los resultados en base al factor de humedad.

3. METODOLOGIA ANALITICA PARA SUELOS ACIDOS

3.1. SUBMUESTREO EN LABORATORIO :

Las muestras de suelo que llegan al laboratorio deben ser sometidas a un submuestreo, con el propósito de que la muestra del suelo sometida a análisis químico sea representativa. Para ésto, distribuir el suelo en una hoja de papel limpio y dividir en cuadros de 5 x 5 cm. usando una regla de plástico. El suelo se toma así con una espátula seleccionando por lo menos 10 cuadros. Las submuestras de suelo se colocan en bolsas de plástico inmediatamente después del secado y tamizado.

La cantidad mínima necesaria de muestra de suelo seco al aire para el análisis completo es la siguiente:

1. Suelo seco al aire tamizado con malla No.10 (2 mm).

A. Análisi Preliminar del Suelo :

1. 10 g. para determinación de pH y conductividad eléctrica.
2. 10 g. para determinación de presencia o ausencia de CaCO_3 libre.

B. En Base a la Clasificación del Suelo en el Análisi Preliminar.

B.1. Para suelos muy ácidos, no calcáreos, no salinos.

1. 10 g. para extracto de KCl 1N y determinación de cationes cambiabiles (Ca, Mg, Na), acidez intercambiable (Al, H) y micronutrimientos (Zn, Cu, Fe, Mn).
2. 10 g. para extracto de NH_4Cl 1N y determinación de K.
3. 3 g. para extracto de Bray y Kurtz No.2 y determinación de P.
4. 10 g. para determinación de S.
5. 10 g. para determinación de B.

B.2. Para suelos ácidos no calcáreos, no salinos.

1. 10 g. para extracto de NH_4OAC y determinación de cationes cambiab^les (K, Ca, Mg, Na), Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) y micronutrientos (Zn, Cu, Fe, Mn).
 2. 3 g. para extracto de Olsen y determinación de P.
 3. 10 g. para determinación de S.
 4. 10 g. para determinación de B.
2. Suelo seco al aire tamizado con malla No.60 (0.25 mm). (Para los suelos muy ácidos y ácidos clasificados en el análisis preliminar).
1. 0.5 g. para determinación de materia orgánica.

3.2. ANALISIS PRELIMINAR DEL SUELO :

Con el propósito de clasificar los suelos para la determinación de cationes intercambiables, acidez intercambiable, y capacidad de intercambio catiónico, es necesario realizar un análisis preliminar del suelo determinando el pH, conductividad eléctrica y presencia o ausencia de CaCO_3 libre. Si los suelos son calcáreos y/o salinos es necesario emplear procedimientos diferentes. (Uehara y Keng, 1975).

Los suelos se clasifican de acuerdo al análisis preliminar como sigue:

pH (Suelo- H_2O 1:1)	Conductividad Eléctrica (micromhos/cm) a 25°C.	CaCO_3 Libre (Prueba de Efervescencia)	Clasificación
< 5.4	< 400	Ausente	Muy ácido, no calcáreo, no salino.
5.4-7.0	< 400	Ausente	Acido a neutro, no cal- cáreo, no salino.
> 7.0	< 400	Presente	Calcáreo, no salino
< 7.0	> 400	Ausente	No calcáreo, salino
> 7.0	> 400	Presente	Calcáreo, salino

3.2.1. Determinación de pH (Relación Suelo-Agua 1:1)*

A. Material:

Potenciómetro (pH-metro) provisto de electrodos de vidrio y calomel (solución saturada de KCl). Soluciones amortiguadas de pH conocido, generalmente de pH 4 y 7. Vasos de 50 ml. Agitador y balanza analítica.

B. Procedimiento:

1. Medir 10 ml de suelo seco al aire y transferir a un vaso de 50 ml. Añadir 10 ml de agua doblemente deionizada o destilada.
2. Agitar la suspensión aproximadamente 1 minuto y dejar en reposo por 1 hora.
3. Una vez calibrado el potenciómetro con las soluciones amortiguadas, se procede a determinar el pH de la muestra de suelo previa agitación enérgica de la suspensión.

3.2.2. Determinación de la Conductividad Eléctrica**

La medida de la conductividad eléctrica del extracto de suelo es una guía aproximada pero rápida del grado de salinidad en el suelo.

A. Material:

Vasos de 100 ml, varillas de vidrio, puente de conductividad eléctrica.

B. Reactivos:

Agua doblemente deionizada o destilada.

C. Procedimiento:

Pesar 10 g. de suelo seco al aire y tamizado con malla No.10 (2 mm) en un vaso de 100 ml. Añadir 50 ml de agua doblemente deionizada o destilada y agitar por 30 minutos. Dejar la suspensión en reposo durante la noche y volver a agitar por 15

* Jackson (1964), Peech (1965).

** Richards (1954)

minutos antes de leer la conductividad eléctrica usando un puente de conductividad. Los resultados se expresan en micromhos/cm a 25°C.

3.2.3. Determinación de la presencia o ausencia de CaCO₃ Libre. Prueba de Efervescencia*

La presencia o ausencia de carbonato de calcio puede determinarse rápidamente y en forma cualitativa agregando unas cuantas gotas de HCl a 30% al suelo seco al aire tamizado con malla No.10 (2 mm). La efervescencia debida al desprendimiento de gas carbónico (CO₂) indica la presencia de carbonato.

3.3. DETERMINACION DE MATERIA ORGANICA**

A. Material:

Erlenmeyers de 250 ml, pipeta automática de 25 ml, garrafa plástica de 20 litros (Dicromato de Potasio), buretas graduadas de 50 ml (ácido sulfúrico, sulfato ferroso), balanza de precisión (± 0.01 g.)

B. Reactivos:

1. Solución de Dicromato de Potasio (K₂Cr₂O₇) 0.4N: Secar en una estufa aproximadamente 50 g del reactivo a una temperatura de 110°C durante 1 hora. Luego de enfriar en un desecador pesar 19.583 g y disolver en poca cantidad de agua doblemente deionizada o destilada para luego completar volumen a 1 litro con agua doblemente deionizada o destilada.
2. Acido sulfúrico concentrado (H₂SO₄).
3. Solución de Ferroina 0.025M: Pesar 14.87 g de ortofenantrolina monohidratada (C₁₂H₈N₂.H₂O) y 6.95 g de sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O). Disolverlos en agua doblemente deionizada o destilada y completar volumen a 1 litro con agua doblemente deionizada o destilada.

* Chapman y Pratt (1961)

** Walkley y Black (1934), Allison (1965)

4. Solución de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.4N: Disolver 111.21 g del reactivo en 600 ml de agua doblemente deionizada o destilada, añadir 20 ml de H_2SO_4 concentrado y completar volumen a 1 litro con agua doblemente deionizada o destilada.

C. Procedimiento:

1. Pesar 0.5 g de suelo seco al aire y tamizado con malla No.60 (0.25 mm) en Erlenmeyer de 250 ml.
2. Añadir 25 ml de la solución de dicromato de potasio 0.4N y mezclar el suelo con la solución mediante un giro imprimido al Erlenmeyer.
3. Añadir 25 ml de H_2SO_4 concentrado y mezclar suavemente durante 1 minuto. Dejar la mezcla en reposo durante 20 a 30 minutos.
4. Simultáneamente realizar un ensayo de valoración en blanco (sin suelo) de la misma manera indicada en los párrafos 1, 2 y 3.
5. Diluir la solución a 200 ml con agua doblemente deionizada o destilada y añadir 1 ml de la solución ferroina 0.025M.
6. Titular con la solución de sulfato ferroso 0.4N hasta que el color de la solución-muestra vire de verde a rojo en el punto final.

D. Cálculos:

Reportar el contenido de materia orgánica (M.O.) en base porcentual de acuerdo al siguiente cálculo:

$$\% \text{ M.O.} = 25 (1 - S/B) \times 0.55$$

Donde: S = Valoración de la muestra, ml de solución sulfato ferroso.

B = Valoración en blanco, ml de solución sulfato ferroso.

El factor 0.55 se deriva como sigue:

$$0.4 \times 0.003 \times (1.72/0.75) \times (100/0.5) = 0.55$$

- Donde: 0.4 = Normalidad de la solución de dicromato de potasio.
 0.003 = Peso miliequivalente de carbono.
 1.72 = Factor de Conversión de Carbono a Materia Orgánica.
 0.75 = Factor de recuperación de carbono*
 0.5 = Peso de la muestra (g).

3.4. DETERMINACION DE FOSFORO:

3.4.1. Fósforo Extraíble por Fluoruro Diluido-Acido Diluido. (Bray y Kurtz No.2)**

A. Material:

Vasos de extracción de 50 ml, agitador, pipetas automáticas de 20 ml, papel filtro de 11 cm ϕ (Whatman No.42 o equivalente), frasco de vidrio o plástico para la solución extractora, vaso de 1 litro para la solución de trabajo, diluidor automático, colorímetro con filtro de 660 mu of espectrofotómetro, probetas de 10 y 25 ml para las soluciones A y B para desarrollo de color.

B. Reactivos:

1. Solución extractora (HCl 0.1N + NH₄F 0.03N): Disolver 1.11 g de NH₄F y 16.64 ml de HCl 6N con agua doblemente deionizada o destilada y completar volumen a 1 litro con agua doblemente deionizada o destilada.

2. Soluciones patrones para desarrollo de color***

Solución A: Disolver 60 g de molibdato de amonio [(NH₄)₆ Mo₇O₂₄.4H₂O] en 200 ml de agua doblemente deionizada o destilada. Añadir 1.455 g de tartrato de antimonio y potasio [K(SbO)C₄H₄O₆.1/2 H₂O] y disolver. Agregar lentamente con agitación suave 700 ml de H₂SO₄ concentrado. Enfriar la solución y diluir a volumen de 1 litro con agua doblemente deionizada o destilada.

* Bornemisza et al (1979)

** Bray y Kurtz (1945), Dewis y Freitas (1970), McGaveston y Widdowson (1978)

*** Murphy y Riley (1963).

Solución B: Disolver 132 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) en agua doblemente deionizada o destilada. Completar volumen a 1 litro con agua doblemente deionizada o destilada.

Las soluciones A y B deben almacenarse en un lugar frío y oscuro por ser sensible al calor y a la luz.

3. Solución de Trabajo: Preparar esta solución en el día a partir de las Soluciones A y B del Párrafo 2. Tomar 25 ml de la Solución A y transferir a 800 ml de agua doblemente deionizada o destilada en un vaso de 1 litro. Mezclar y añadir 10 ml de la Solución B llevando luego a volumen con agua doblemente deionizada o destilada.
4. Solución Estándar con Fósforo: Disolver 0.2195 g de fosfato de hidrógeno de potasio cristalizado (KH_2PO_4), previamente seco durante 1 hora a $105^{\circ}C$. Diluir con agua doblemente deionizada o destilada en matraz volumétrico de 1 litro y completar volumen. La solución contendrá 50 ppm P a partir de la cual se preparan las soluciones para la curva patrón de P de la manera indicada en la Tabla 2.

Tabla.2. Concentraciones de las Disoluciones Patrón de Fósforo.

Volumen de la Solución Estándar (50 ppm, P)	Volumen final con H_2O doblemente deionizada o destilada	Concentración de P
ml	ml	ppm
0.0	250	0.0
2.5	250	0.5
5.0	250	1.0
10.0	250	2.0
20.0	250	4.0
30.0	250	6.0
40.0	250	8.0
50.0	250	10.0

C. Procedimiento:

1. Pesar una muestra de 2.85 g de suelo y transferir a un vaso de extracción de 50 ml.
2. Añadir 20 ml de la solución extractora y agitar durante 40 segundos.
3. Filtrar la suspensión con papel filtro Whatman No.42 o equivalente a un vaso de 50 ml. El filtrado constituye el extracto de suelo.
4. Tomar simultáneamente 2 ml del extracto de suelo y 18 ml de la solución de trabajo con ayuda de un "dilutor dispensador" a tubos colorimétricos. Este procedimiento se sigue con las disoluciones patrón de P, de manera que las concentraciones finales de P varían entre 0.05 y 1.0 ppm P.
5. Después de 15 minutos se leen los porcentajes de transmitancia en un espectrofotómetro usando una longitud de onda de 660 mu. Las muestras pueden leerse hasta las 24 horas. Los valores de %T se representan en papel semilogarítmico donde la ordenada (escala logarítmica) representa los porcentajes de transmitancia y la abscisa (escala ordinaria) representa las ppm de P. Construido el gráfico es posible pasar directamente la lectura del colorímetro a partes por millón de P en la solución durante el análisis de la muestra.

D. Cálculos:

$$\text{Factor de Dilución} = \frac{20 \text{ ml de solución extract.}}{1.000 \text{ ml} \times 1.000 / 2.85 \text{ g}} \times \frac{20 \text{ ml de extracto suelo}}{1.000 \text{ ml}} = 70.2$$

$$\text{P disponible en el suelo (ppm)} = \text{ppm en la solución muestra} \times 70.2.$$

3.4.2. Fósforo Extraíble por Carbonato Acido de Sodio *

El empleo de una disolución de carbonato ácido de sodio

* Olsen et al (1954)

(NaHCO_3 0.5N) de pH 8.5 tiene su fundamento en que esta solución regula la cantidad de calcio en solución por intermedio del carbonato cálcico.

A. Material:

Frascos de extracción de 250 ml o Erlenmeyers con tapón de vidrio Corning y resistente a los álcalis. Se han usado también frascos de plástico con buenos resultados. Agitador mecánico, papel de filtro Whatman No.42 de 15 cm ϕ o equivalente, dilutor-dispensador, vaso de 1 litro, colorímetro con filtro de 660 m μ , frasco de polietileno para preparar la solución extractora.

B. Reactivos:

1. Solución Extractora (NaHCO_3 0.5M): Disolver 42 g de carbonato ácido de sodio (NaHCO_3) en 1 litro y ajustar a pH 8.5 con NaOH. La alcalinidad de esta solución tiende a aumentar con el tiempo a no ser que se proteja con una capa de aceite mineral. Verificar periódicamente el pH.
2. Carbón activo: Se usa Darco G-60 o similar al que se purifica de fosfatos lixiviándolo previamente con carbonato ácido de sodio, se lava con agua doblemente deionizada o destilada y se seca.

3. Soluciones patrones para desarrollo de color.

Solución A: Disolver 60 g de molibdato de amonio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ en 200 ml de agua doblemente deionizada o destilada, añadir 1.455 g de tartrato de antimonio y potasio $[\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}]$ y disolver. Agregar lentamente con agitación suave 700 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Enfriar la solución y diluir a volumen de 1 litro con agua doblemente deionizada o destilada.

Solución B: Disolver 132 g de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) en agua doblemente deionizada o destilada. Completar volumen a 1 litro con agua doblemente deionizada o destilada.

4. Solución de Trabajo: Preparar esta solución en el día a partir de las Soluciones A y B del Párrafo 3. Tomar 45 ml de la Solución A y transferir a 800 ml de agua doblemente deionizada o destilada en un vaso de 1 litro, mezclar y añadir 18 ml de la Solución B llevando luego a volumen con agua doblemente deionizada o destilada.
5. Solución Estándar de Fósforo: Disolver 0.2195 g de fosfato dehidrogenado de potasio cristalizado (KH_2PO_4), previamente secado durante 1 hora a 105°C . Diluir con agua doblemente deionizada o destilada en matraz volumétrico de 1 litro y completar volumen. La solución contendrá 50 ppm de P a partir de la cual se preparan las soluciones para la curva patrón de P de la manera indicada en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de las Disoluciones Patrón de Fósforo

Volumen de la Solución Estándar (50 ppm)	Volumen final con H_2O doblemente deionizada o destilada	Concentración de P
ml	ml	ppm
0.0	250	0.0
2.5	250	0.5
5.0	250	1.0
10.0	250	2.0
20.0	250	4.0
30.0	250	6.0
40.0	250	8.0
50.0	250	10.0

C. Procedimiento:

1. Colocar en un frasco de extracción 2.5 g de suelo y adicionar 50 ml de solución extractora de carbonato de sodio (pH 8.5) y aproximadamente 1 g de carbón activado.
3. Agitar por 30 minutos.
4. Filtrar la solución usando papel filtro Whatman No.42 o equivalente. Si el filtrado no es claro, retornar al frasco y

añadir más carbón agitando rápidamente y volviendo a filtrar por el mismo filtro.

Nota: Los extractos de suelo obtenido con carbonato de sodio presentan a menudo coloraciones intensas. Por esta razón se recomienda el método de molibdato azul con ácido ascórbico, ya que éste elimina las interferencias debidas al color. Comparaciones realizadas entre la cantidad de P medido, usando carbón para recuperar el color y sin carbón, han mostrado que hay una diferencia de menos de 1 ppm de P cuando la cantidad extraída es menos de 20 ppm de P.

4. Con un "dilutor dispensador" tomar 2 ml de filtrado, añadir 8 ml de agua doblemente deionizada o destilada y 10 ml de la solución de trabajo (Párrafo 4 de reactivos). Las diluciones patrones de P deben tener el mismo procedimiento que las muestras.
5. Después de 15 minutos, leer los porcentajes de transmitancia (%T) en un espectrofotómetro o colorímetro usando una longitud de onda de 660 mμ.
6. Estos valores de %T se llevan a un gráfico en papel semilogarítmico en cuya abscisa (escala ordinaria) se representan las partes por millón de fósforo en solución (ppm P) y en la ordenada (escala logarítmica) se representan los porcentajes de transmisión de la luz (%T). Los puntos obtenidos se unen por una línea recta y a partir de este gráfico se pueden calcular las ppm de la solución-muestra sin más que leer en el colorímetro el %T correspondiente.

La cantidad de fósforo extraíble por el método del carbonato ácido se puede calcular:

$$\text{Factor de Dilución} = \frac{50 \text{ ml de solución extract.}}{1.000 \text{ ml}} \times \frac{1.000 \text{ g}}{2.5 \text{ g suelo}} \times \frac{20 \text{ ml}}{2 \text{ ml de vol. final}} = 200 \frac{\text{extrac. suelo}}{\text{ppm}}$$

$$\text{P disponible en el suelo (ppm)} = \text{ppm en la solución-muestra} \times 200.$$

3.5. DETERMINACION DE CATIONES CAMBIABLES EN SUELOS CON pH MENOR A 5.4, CON CARGA VARIABLE EN FUNCION DEL pH Y NO CALCAREOS, NO SALINOS*.

3.5.1. Obtención del Extracto del Suelo.

A. Material:

Vasos de extracción de 50 ml, agitador de muestras, balones volumétricos de 100 ml, dispensador de 10 ml, frascos para la solución extractora, pipeta automática de 50 ml, embudos plásticos o de vidrio.

B. Reactivos:

Solución extractora de KCl 1N: Pesar 74.56 g de KCl, disolver en aproximadamente 500 ml de agua doblemente deionizada o destilada y completar volumen a 1 litro.

C. Procedimiento:

1. Pesar 10 g de suelo seco al aire y añadir 50 ml de KCl 1N.
2. Agitar durante 30 minutos y filtrar recibiendo en balones volumétricos de 100 ml. Lavar el suelo con 5 porciones de 10 ml cada una de KCl 1N. Finalizada la filtración completar volumen con KCl 1N y agitar para obtener una mezcla homogénea del filtrado (extracto de suelo en KCl 1N). Este filtrado constituye el extracto de suelo a partir del cual se determinan todos los cationes cambiables con excepción del K.

3.5.2. Acidez Intercambiable (Al + H):

A. Material:

Erlenmeyers de 125 ml, pipeta volumétrica de 50 ml, bureta con frasco para NaOH; frasco gotero para la solución de fenolftaleína.

B. Reactivos:

1. Metil Naranja 0.1% (indicador): Pesar 0.1 g de metil

* Lin y Coleman (1960), Pratt y Bair (1961), Coleman y Thomas (1967).

naranja y disolver con un poco de agua destilada para luego completar volumen a 100 ml con agua destilada.

2. Fenolftaleína 1% (indicador): Pesar 1 g de fenolftaleína y disolver en 70 ml de alcohol etílico para luego completar volumen a 100 ml con alcohol etílico.
3. Solución de NaOH 0.05N: Preparar a partir de una solución de NaOH 0.1N tomando 500 ml de esta solución y completando a volumen de 1 litro con agua doblemente deionizada o destilada.

C. Procedimiento:

1. Acidez Intercambiable: Transferir 50 ml del extracto obtenido con KCl 1N a un Erlenmeyer de 125 ml de capacidad. Agregar 3 gotas de fenolftaleína al 1% y titular con NaOH 0.05N hasta la aparición de un color rosado pálido permanente. Anotar los ml de NaOH empleados en la titulación.
2. Hidrógeno Intercambiable: Transferir 50 ml del extracto obtenido con KCl 1N a un Erlenmeyer de 125 ml de capacidad. Agregar 3 gotas del indicador metil naranja al 0.1% y titular con NaOH 0.05N hasta la aparición de un color amarillo permanente en la solución. Anotar los ml de NaOH empleados en la titulación.

D. Cálculos:

La acidez intercambiable y el hidrógeno intercambiable expresados en miliequivalentes/100 g suelo se calcula por la relación:

$$\text{Acidez Intercambiable o H intercambiable}_{(\text{meq}/100\text{g suelo})} = \text{ml NaOH} \times \underline{N} \text{ NaOH} \times \frac{100}{\text{peso suelo}}$$

$$\text{Acidez Intercambiable o H intercambiable}_{(\text{meq}/100\text{g suelo})} = \text{ml NaOH} \times 0.05 \times \frac{100}{10}$$

$$\text{Acidez Intercambiable o H intercambiable}_{(\text{meq}/100\text{g suelo})} = \text{ml NaOH} \times 0.5$$

$$\text{Al Intercambiable} = \text{Acidez Intercambiable} - \text{H intercambiable.}$$

3.5.3. Calcio (Ca).

A. Determinación:

El calcio se determina en el extracto de KCl 1N tomando 2 ml y diluyendo con una solución de NaCl*. Leer la transmitancia en un espectrofotómetro de absorción atómica, usando estándares de Ca que han recibido el mismo tratamiento que las muestras, de tal forma que el estándar más concentrado sea igual a 5.0 ppm de Ca. Se usa la llama de óxido nitroso acetileno. La cantidad de calcio se determina considerando el factor de dilución (FD) que resulta del producto de:

$$FD = \frac{\text{ppm}}{20 \text{ g}} \times \frac{100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times \frac{20 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} = 0.5$$

$$\text{Ca}(\text{meq}/100 \text{ g}) = \text{ppm Ca en la solución-muestra} \times 0.5$$

B. Preparación del Estándar de Calcio:

Preparar a partir de una solución de 1.000 ppm de Ca (solución preparada comercialmente), estándares de 0, 4, 10, 30, 50 ppm Ca tomando de la solución concentrada las cantidades siguientes: 0, 1, 2.5, 7.5 y 12.5 ml y diluirlas a 250 ml con H₂O doblemente deionizada o destilada. Al momento de utilizarlas en el espectrofotómetro de absorción atómica deben diluirse de la manera siguiente: Tomar 2 ml de cada una por separado y diluirlas a volumen final de 20 ml con la solución de NaCl obteniéndose las siguientes concentraciones: 0, 0.4, 1.0, 3.0 y 5.0 ppm Ca, las cuales se usan para la curva patrón.

* Solución de Sodio: Pesar 50.84 g de cloruro de sodio y disolver por completo en unos 200 ml de H₂O doblemente deionizada o destilada y completar volumen a 1 litro. La concentración que se obtiene es de 20.000 ppm Na. A partir de esta solución se obtiene una solución diluida de Na tomándose 60 ml de la solución de 20.000 ppm y diluyendo a 1 litro. Esta solución se utiliza para diluir las muestras y evitar interferencia en los extractos al usar espectrofotometría de absorción atómica.

3.5.4. Magnesio (Mg).A. Determinación:

Utilizar la misma dilución del extracto de KCl 1N, usada en la determinación de calcio, y leer directamente la transmitancia en un espectrofotómetro de absorción atómica, usando una curva calibrada cuyo estándar más alto sea de 1.5 ppm Mg. Se emplea la llama de aire-acetileno. La cantidad de Mg se calcula considerando un factor de dilución (FD) que resulta de:

$$FD = \frac{\text{ppm}}{12} \times \frac{100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times \frac{20}{2} = 0.83$$

Mg (meq/100 g) = ppm de Mg en la solución-muestra x 0.83.

B. Preparación del Estándar de Magnesio:

Preparar a partir de una solución de 500 ppm de Mg (solución preparada comercialmente). Las concentraciones de los estándares son: 0, 2, 5 y 15 ppm Mg, tomando de la solución concentrada 0, 1, 2.5 y 7.5 ml y llevando a volumen de 250 ml con agua doblemente deionizada o destilada. Al utilizar estas concentraciones deben diluirse tomando 2 ml y completando volumen a 20 ml con la solución de NaCl. Las concentraciones de estas diluciones son: 0, 0.2, 0.5 y 1.5 ppm de Mg, respectivamente, y son las empleadas para calibrar el equipo y obtener la curva patrón de Mg.

3.5.5. Manganeso (Mn).A. Determinación:

Utilizar el extracto de KCl 1N y leer directamente la transmitancia en un espectrofotómetro de absorción atómica, usando una curva calibrada cuyo estándar más alto sea de 20 ppm Mn. Se emplea la llama aire-acetileno. La cantidad de Mn se calcula considerando un factor de dilución (FD) que resulta de:

$$FD = \frac{100 \text{ ml}}{10 \text{ g}} = 10$$

Mn (ppm) = ppm Mn en la solución x 10.

B. Preparación de Estándares de Mn:

Preparar a partir de una solución de 1.000 ppm de Mn (Solución preparada comercialmente) de la manera indicada en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones de las Disoluciones de Manganeso.

Volumen de la Solución Estándar (1000 ppm Mn)	Volumen final con H ₂ O doblemente deionizada o destilada	Concentración de Mn
ml	ml	ppm
0.00	250	0.0
0.25	250	1.0
0.50	250	2.0
1.00	250	4.0
1.50	250	6.0
2.50	250	10.0
5.00	250	20.0

3.5.6. Determinación de Potasio (K).

A. Material:

Erlenmeyer de 125 ml, agitador de muestras, dispensador de 50 ml, frasco para la solución extractora, embudos de plástico o de vidrio, papel filtro de 11 cm ϕ .

B. Reactivo:

Solución extractora de NH₄Cl 1N: Pesar 53,49 g de NH₄Cl, disolver en aproximadamente 500 ml de agua doblemente deionizada o destilada y completar volumen a 1 litro.

C. Procedimiento:

Pesar 2.5 g de suelo seco al aire y tamizado con malla No.10 (2 mm), y agitar durante 30 minutos y filtrar. Este filtrado constituye el extracto de suelo. Leer directamente la transmitancia en un espectrofotómetro de absorción atómica, usando una curva calibrada cuyo estándar más alto sea de 40 ppm K.

Se emplea la llama aire-acetileno. El factor de dilución (FD) a considerar en los cálculos de K intercambiable es el siguiente:

$$FD = \frac{\text{ppm}}{39} \times \frac{50 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ g}}{2.5 \text{ g}} = 0.051$$

$$K \text{ (meq/100 g)} = \text{ppm de K en la solución muestra} \times 0.051.$$

D. Preparación de Estándar de K:

Pesar 1.9069 g de KCl seco, disolver y completar volumen a 1 litro con agua deionizada o destilada. Esta solución tiene 1.000 ppm de K a partir de la cual se preparan soluciones estándar diluidas con las siguientes concentraciones: 0, 2, 4, 10, 20 y 40 ppm de K.

Ej.: Para preparar una solución que contenga 4 ppm de K, se toma 1 ml de la solución de 1000 ppm de K y se diluye en 250 ml de agua doblemente deionizada o destilada.

3.5.7. Parámetros Derivados.

A. Capacidad de Intercambio Catiónico Efectivo (CICE)*:

La capacidad de intercambio catiónico es comúnmente referida a la cantidad de cationes absorbidos por soluciones salinas amortiguadas a pH 7 con acetato de amonio (NH_4OAc) o a pH 8.2 con cloruro de bario-trietanolamina (Ba-TEA). Para suelos de pH 7 u 8.2, estas medidas reflejan en forma adecuada la capacidad de intercambio catiónico. Además, para suelos que tienen poca o ninguna carga variable, estos métodos también son adecuados. En el caso de suelos ácidos, el uso de estos métodos es satisfactorio cuando estos suelos tienen sistemas de capas silicatas con pH de carga no dependiente, tal el caso de suelos montmorilloníticos bajos en materia orgánica. Para suelos con pH menor que 5.5 y con carga variable, tal el caso de algunos Oxisoles y Ultisoles, los métodos indicados sobreestiman la capacidad de intercambio catiónico. En este caso, la medida que

* Coleman y Thomas (1967)

determina más exactamente la carga total al pH actual del suelo es el desplazamiento de cationes por una sal no amortiguada como el KCl, y la suma de cationes cambiabiles ha sido denominada "Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva" (Coleman y Thomas, 1967).

En general, valores de CICE superiores a 4 meq/100 g en suelos ácidos sugieren suficiente CIC para prevenir pérdidas considerables de cationes por lixiviación (Sánchez, 1976).

Capacidad de Intercambio Cationes Efectiva (CICE) = Al + Ca + Mg.

B. Porcentaje de Saturación de Aluminio:

El porcentaje de saturación de aluminio de la capacidad de intercambio catiónico efectiva es otra medida útil de la acidez del suelo. La saturación de Al es la relación entre el Al intercambiable extraído por una sal no amortiguada de KCl y la suma de bases cambiabiles más el Al intercambiable.

$$\% \text{ Saturación de Al} = \frac{\text{Al}}{\text{Al} + \text{Ca} + \text{Mg}} \times 100$$

3.6. DETERMINACION DE CATIONES CAMBIABLES EN SUELOS CON pH 5.4-7.0, CON CARGA NO DEPENDIENTE DEL pH Y NO CALCAREOS, NO SALINOS. *

3.6.1. Obtención del Extracto de Suelo.

A. Material:

Erlenmeyers de 125 ml, bureta automática de 25 ml, frascos volumétricos de 100 ml, papel filtro de 5.5 cm ϕ , embudos Buchner de 6 cm ϕ , gradilla para succionar y bomba de succión, frasco para solución extractora.

B. Reactivos:

1. Acetato de Amonio 1N, pH 7: Pesar 77.08 g de acetato de amonio y disolver por completo en 500 ml de agua doblemente deionizada o destilada y completar volumen a 1 litro.

* Peech et al (1947), Chapman (1965).

2. Solución de Sodio: Pesar 50.84 g de cloruro de sodio y disolver por completo en unos 200 ml de agua doblemente deionizada o destilada y completar volumen a 1 litro. La concentración que se obtiene es de 20.000 ppm Na. A partir de esta solución se obtiene una solución diluida de Na tomándose 60 ml de la solución de 20.000 ppm y diluyendo a 1 litro. Esta solución se utiliza para diluir las muestras y evitar interferencia en los extractos al usar espectrofotometría de absorción atómica.

C. Procedimiento:

1. Pesar 5 g de suelo en un Erlenmeyer de 125 ml y agregar 25 ml de la solución de acetato de amonio 1N. Agitar durante 30 minutos, dejar en reposo 15 minutos y filtrar usando succión. El filtrado se recibe en balón volumétrico de 100 ml, lavando el suelo con pequeñas porciones de la solución de acetato de amonio. Después de terminada la filtración, completar volumen y agitar. Este filtrado constituye el extracto de suelo a partir del cual se determinan los cationes cambiabiles.

3.6.2.. Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Potasio (K).

A. Determinación:

Por medio de un "dilutor dispensador", tomar 2 ml de filtrado (extracto) y 18 ml de una solución de sodio de manera de obtener 1.000 ppm de Na. Leer la transmitancia en espectrofotómetro de absorción atómica usando estándares de Ca que han recibido el mismo tratamiento que las muestras, de tal forma que el estándar más concentrado no exceda de 5 ppm Ca. Se usa la llama óxido nitroso-acetileno para la lectura de Ca.

$$\text{Factor de Dilución(FD)} = \frac{\text{ppm}}{20} \times \frac{100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{5 \text{ g}} \times \frac{20 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} = 1$$

Ca (meq/100 g suelo) = ppm en solución x 1.

Para la determinación de Magnesio, emplear la misma solución diluída indicada en el procedimiento de Ca. Leer la trasmisividad en espectrofotómetro de absorción atómica usando estándares de magnesio que han recibido el mismo tratamiento que las muestras, de tal forma que la concentración más alta no exceda de 1.5 ppm Mg. Se usa la llama aire-acetileno para la lectura de Magnesio.

$$\text{Factor de Dilución(FD)} = \frac{\text{ppm}}{12} \times \frac{100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{5 \text{ g}} \times \frac{20 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} = 1.667$$

$$\text{Mg (meq/100 g suelo)} = \text{ppm de mg en solución} \times 1.667.$$

En el caso de determinación de Potasio, se utiliza el extracto de acetato de amonio que se obtuvo para la determinación de Ca y se lee directamente en el espectrofotómetro de absorción atómica usando estándares de K que cubran un rango entre 0-40 ppm K. Se usa la llama aire-acetileno.

$$\text{Factor de Dilución(FD)} = \frac{\text{ppm}}{39} \times \frac{100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{5 \text{ g}} = 0.051$$

$$\text{K (meq/100 g suelo)} = \text{ppm en solución de K} \times 0.051.$$

B. Preparación de Estándares de Ca, Mg y K:

Seguir el mismo procedimiento indicado para suelos con pH menor a 5.4.

3.6.3. Sodio (Na).

A. Determinación:

Se utiliza el extracto de acetato de amonio y se lee directamente en el espectrofotómetro de absorción atómica usando estándares de Na que cubran un rango entre 0-20 ppm Na. Se utiliza la llama aire-acetileno.

$$\text{Factor de Dilución(FD)} = \frac{\text{ppm}}{22.99} \times \frac{100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{5 \text{ g}} = 0.087$$

$$\text{Na (meq/100 g suelo)} = \text{ppm en solución de Na} \times 0.087.$$

B. Preparación de Estándares de Sodio:

Preparar una solución de 1000 ppm de Na, pesando 2.542 g de NaCl y diluyendo en 1 litro. El NaCl debe ser secado en una estufa a 110°C durante varias horas. De la solución concentrada se preparan estándares cuyas concentraciones finales sean: 0, 1, 2, 5, 10 y 20 ppm de Na. Estos estándares se preparan tomando 0, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5 y 5 ml de la solución 1000 ppm Na y diluyendo a un volumen final de 250 ml con agua doblemente deionizada o destilada.

Nota: La muestra para determinar Na debe tomarse antes de diluir para Ca y Mg para evitar contaminación en la solución de NaCl usada para estos cationes.

3.7. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO (CIC) EN SUELOS DE pH MAYOR A 5.4-7.0, CON CARGA NO DEPENDIENTE DE pH Y NO CALCAREOS, NO SALINOS.**A. Material:**

Erlenmeyers de 125 ml, dispensadores de 10 ml, buretas con frascos.

B. Reactivos:

1. Alcohol etílico a 96%.
2. Solución de NaCl 10%.
3. Solución de Formaldehído 38%.
4. Solución de Fenolftaleína 1%.
5. Solución de NaOH 0.1N.

C. Procedimiento:

El suelo que queda en el embudo después de obtener el extracto de acetato de amonio para determinar cationes cambiables, se lava con 5 porciones de alcohol etílico del 96%, desechándose luego estos lavados. Desplazar el amonio intercambiable mediante 5 lavados con solución de NaCl al 10%, los cuales son recogidos en Erlenmeyers de 125 ml. Después de finalizada la filtración se agregan 10 ml de solución de formaldehído de

de 38% al filtrado anterior, 3 gotas de fenolftaleína y se titula con NaOH 0.1N hasta obtener un color rosado pálido permanente.

D. Cálculos:

$$\text{Factor de Corrección (FC)} = \frac{0.1N \times 1000}{50} = 2$$

$$\text{Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)} = \text{ml NaOH} \times 2.$$

3.8. DETERMINACION DE AZUFRE (S)*

3.8.1. Obtención del Extracto de Suelo.

A. Materiales:

Erlenmeyer de 125 ml, bureta automática de 50 ml, agitador, papel filtro de 15 cm ϕ Whatman No.42 o equivalente, balanza, embudos plásticos o de vidrio, garrafa plástica para la solución extractora.

B. Reactivos:

Fosfato de calcio $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$: Disolver 2.02 g de fosfato de calcio en 1 litro de agua deionizada o destilada. La solución tiene una concentración de 0.008M.

C. Procedimiento:

Pesar 10 g de suelo en un Erlenmeyer de 125 ml y agregar 50 ml de la solución extractora. Agitar durante 30 minutos y después filtrar la suspensión.

Nota: Fox y colaboradores (1964) recomiendan usar fosfato de calcio en suelos con contenidos altos de materiales orgánica, ya que elimina el problema de la turbidez del extracto. El anion fosfato desplaza al anion sulfato adsorbido y el catión calcio retiene la extracción de materia orgánica del suelo, además de eliminar la contaminación que proviene del azufre orgánico.

* Referencias: Fox et al (1964), Ensminger (1954), Bartlett y Weller (1960); Massoumi y Cornfield (1963), Tabatabai y Bremner (1972), The Sulphur Institute - Tec. Bull. 14 (1968).

3.8.2. Método turbidimétrico para determinar azufre en el extracto de suelo:

Obtenido el extracto de suelo, la determinación de S en el suelo sigue un procedimiento de turbidimetría similar.

A. Material:

Colorímetro - tubos colorimétricos, pipetas de 1, 2, 2.5 y 10 ml.

B. Reactivos:

1. Solución de Acido Nítrico al 25% v/v: Mezclar 25 ml de ácido nítrico reactivo puro y 75 ml de agua deionizada o destilada.
2. Solución de Acido Acético-Acido Fosfórico: Mezclar 900 ml de ácido acético con 300 ml de ácido fosfórico.
3. Gelatina - Cloruro de Bario: Disolver 0.3 g de gelatina (Difco Bacto Gelatin - DIFCO Laboratorios Inc. Detroit Mich.) en 100 ml de agua caliente (60-70°C) y enfríe la solución a 4°C. Después de 4 horas llevar el fluido semigelatinoso a la temperatura ambiente y agregar 18 g de Cloruro de Bario ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) grado reactivo y agitar la mezcla hasta que el cloruro de bario esté disuelto. Agregar 1 ml de la solución de 320 ppm S-SO₄, agitar y llevar la solución a la nevera a 4°C por 16 horas. La solución debe estar a la temperatura ambiente por lo menos 2 horas antes de usarla.

C. Procedimiento:

1. Tomar 10 ml del filtrado (extracto de suelo).
2. Agregar 2.5 ml de ácido nítrico 25%.
3. Añadir 2 ml de la mezcla ácido acético - fosfórico, y agitar la muestra hasta que esté completamente homogénea.
4. Agregar 4.5 ml de agua deionizada o destilada.

5. Agregar 1 ml de la mezcla gelatina cloruro de bario y agitar bien hasta que la muestra esté bien homogénea.
6. Dejar en reposo por 70 minutos y luego agitar y leer a los 10 minutos el porcentaje de transmitancia en un colorímetro a 420 mu. Calcular el contenido de S-SO₄ en la alícuota analizada por referencia de una curva calibrada.

D. Preparación de Estándares de S:

Disolver 5.434 g de sulfato de potasio (K₂SO₄) grado reactivo en agua deionizada o destilada y diluir la solución a 1 litro. Un ml de esta solución contiene 1 mg de S-SO₄. Para la preparación de la curva pipetear 0, 8, 16, 32, 48, 64 y 80 ml de solución estándar de sulfato de potasio en volumétricos de 100 ml y ajustar el volumen con agua deionizada o destilada y agitar la mezcla. Las concentraciones son de 0, 80, 60, 320, 480, 640 y 800 ppm S. Luego pipetear alícuotas de 2 ml de los estándares anteriores en volumétricos de 50 ml y completar volumen con la solución extractora. De estas soluciones tomar 10 ml de cada una y seguir el procedimiento de la misma manera que para las muestras. Las concentraciones finales de estas soluciones son de 0, 1.6, 3.2, 6.4, 9.6, 12.8 y 16.0 ppm S.

E. Cálculos:

$$\text{Factor de Dilución (FD)} = \frac{50 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times \frac{20 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 10$$

S disponible en el suelo (ppm) = ppm de S en la solución-muestra x 10.

3.9. DETERMINACIONES DE MICRONUTRIMENTOS.

3.9.1. Boro (B)*

A. Material:

Espectrofotómetro, bureta de 500 ml, pipeta 1 ml, vaso plástico de 250 ml, frascos plásticos de 50 ml, bureta de 50 ml,

* Dible et al (1954), Wear (1965).

plancha caliente, balanza, bomba de succión, embudos Buchner 5.5 cm ϕ , papel filtro 5.5 cm ϕ . Todo el material de vidrio debe ser de bajo o libre contenido de boro.

B. Reactivos:

1. Solución Curcumina-Acido Oxálico: Pesar 0.04 g de curcumina y 5 g de ácido oxálico en 100 ml de etanol del 96%.
2. Alcohol etílico del 96%.

C. Procedimiento:

Pesar 10 g de suelo en un vaso de vidrio libre de boro de 250 ml y agregar 20 ml de agua doblemente deionizada o destilada. Pesar vaso + contenido y colocar sobre plancha caliente por 5 minutos exactos desde el momento en que aparece el primer hervor. Pesar nuevamente y reponer el agua perdida por evaporación. Dejar enfriar y filtrar recibiendo el extracto en frascos plásticos. Tomar 1 ml de este filtrado en vaso plástico de 250 ml y agregar 4 ml de solución curcumina-ácido oxálico y evaporar en estufa $\pm 55^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas aproximadamente. En forma similar proceder con estándares de boro que varían entre 0.2 y 15 ug. A continuación, enfriar el vaso que contiene el residuo seco y añadir 25 ml de etanol del 96%. Agitar, filtrar y leer el color en un espectrofotómetro a 540 mu. Las muestras deben tomarse por triplicado.

D. Cálculos:

$$\text{Factor de Dilución (FD)} = \frac{20 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ g}}{10 \text{ g}} = 2$$

$$\text{Boro (ppm)} = \text{ppm solución} \times 2$$

E. Soluciones Estándares de Boro:

Pesar 0.572 g de ácido bórico (H_3BO_3) y disolver con agua doblemente deionizada o destilada para luego completar volumen a 1 litro con agua doblemente deionizada o destilada. Esta solución contiene 100 ppm de B, a partir de la cual tomar 10

ml y completar a volumen de 100 ml con agua *doblemente* deionizada o destilada, obteniéndose una concentración de 10 ppm de B. De esta solución tomar 1, 2.4, 6.8, 10 y 15 ml, respectivamente, en balones de 50 ml y diluir con agua *doblemente* deionizada o destilada obteniéndose concentraciones de 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 y 3.0 ppm de B de los cuales tomar 1 ml y *continuar con el mismo procedimiento* indicado para una muestra de suelo. El estándar cero debe tomarse por triplicado.

3.9.2. Zinc (Zn), Cobre (Cu), Hierro (Fe)*

A. Material:

Vasos de extracción de 50 ml, agitador, pipeta automática de 20 ml, papel filtro 11 cm ϕ (Whatman No.42 o equivalente), frasco de vidrio para solución extractora.

B. Reactivo:

Solución Extractora (HCl 0.05N + H₂SO₄ 0.025N): Mezclar cuidadosamente 50 ml de HCl 1N y 2.5 ml de H₂SO₄ 10N llevando luego a volumen de 1 litro con agua *doblemente* deionizada o destilada.

C. Procedimiento:

1. Pesar 5 g de suelo seco al aire y tamizado con malla No.10 (2 mm.), transferir a un vaso de 50 ml. Añadir 20 ml de la solución extractora. La relación suelo-extractante es de 1:4.
2. Agitar por 15 minutos y filtrar usando papel filtro Whatman No.42 o equivalente.

D. Determinación:

Leer directamente, en el extracto obtenido, los elementos menores: Cu, Fe y Zn en un espectrofotómetro de absorción atómica. El factor de dilución común para estos microelementos es el siguiente:

$$\text{Factor de Dilución (FD)} = \frac{20 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ g}}{5 \text{ g}} = 4$$

$$\text{Zn, Cu, Fe, Mn (ppm)} = \text{ppm Zn, Cu, Fe, Mn en la solución} \times 4.$$

* Olsen y Dean (1965), Nelson et al. (1953) y Jackson (1964).

E. Preparación de Estándares de Elementos Menores:

Se emplean soluciones concentradas (1000 ppm Zn, Cu, Mn, Fe) ya preparadas comercialmente, a partir de las cuales se hacen soluciones diluidas.

1. Soluciones Estándares para Cobre (Cu) y Zinc (Zn):

ml* de 1000 ppm de Cu y Zn	Volumen final con agua doblemente deionizada o destilada	Concentración de Cu y Zn en ppm
	ml	
0.00	250	0.0
0.25	500	0.5
0.25	250	1.0
0.50	250	2.0
1.00	250	4.0

2. Soluciones Estándares para Hierro (Fe):

ml* de 1000 ppm de Fe y Mn	Volumen final con agua doblemente deionizada o destilada	Concentración de Fe en ppm
	ml	
0.00	250	0.0
0.25	250	1.0
0.50	250	2.0
1.00	250	4.0
1.50	250	6.0
2.50	250	10.0
5.00	250	20.0

* Estos mililitros de las soluciones de 1000 ppm de Cu, An y Fe pueden ir juntos en el mismo volumen.

4. METODOLOGIA ANALITICA PARA PLANTAS*

4.1. OBTENCION DEL EXTRACTO DE TEJIDO VEGETAL:**

El extracto de tejido vegetal resulta de la digestión de la muestra para determinar P, K, Ca, Mg, S y Al.

A. Material:

Tubos graduados de digestión Taylor de 50 ml, bureta con frasco, plancha caliente ubicada en campana con extractor para ácido perclórico.

B. Reactivos:

1. Acido Nítrico (65% analítico - grado reactivo)
2. Acido Perclórico (70% analítico - grado reactivo)
3. Acido Clorhídrico 6M : Tomar 500 ml de HCl concentrado y diluir a 1 litro con agua doblemente deionizada o destilada.

C. Procedimiento:

Pesar 0.25 g de tejido molido y seco en estufa (65°C por 24 horas) en tubos de digestión Taylor. Agregar 3 ml de ácido nítrico (HNO₃) y calentar a baja temperatura (150°C) en una plancha durante 30 minutos. Dejar enfriar durante 15 minutos y agregar 2 ml de ácido perclórico. Continuar el calentamiento a alta temperatura (200°C) durante 1 hora o más, hasta la aparición de humos blancos y obtener un líquido blanco. Dejar enfriar y agregar 3 ml de HCl 6M. Completar volumen a 50 ml con agua doblemente deionizada o destilada y agitar completamente. Esta solución constituye el extracto del tejido vegetal a partir del cual se determinan los elementos: fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre y aluminio.

4.2. DETERMINACIONES DE FOSFORO (P), POTASIO (K), CALCIO (Ca) Y MAGNESIO (Mg).

4.2.1. Fósforo (P):

Determinar colorimétricamente y en forma similar a lo indicado

* Johnson y Ulrich (1959), Sarruge y Haag (1974), Chapman y Pratt (1961), Hunter (1974).

** Sarruge y Haag (1974), Johnson y Ulrich (1959)

para suelos. El factor de dilución (FD) resulta de la siguiente relación:

$$\text{Factor de Dilución (FD)} = \frac{\text{ppm P}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{50 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{0.25 \text{ g}} \times \frac{20}{2} = 0.2$$

$$\% \text{ P} = \text{ppm P solución} \times 0.2.$$

4.2.2. Potasio (K).

A. Determinación:

Se lee directamente en el extracto obtenido usando la técnica de emisión de llama en el espectrofotómetro de absorción atómica usando llama aire-acetileno.

B. Estándares de Potasio (K):

Preparar una solución de 1.000 ppm K a partir de cloruro de potasio (KCl). Para ésto, tomar 10g del reactivo y secar en estufa a 105°C durante 1 hora. Una vez seco y frío pesar 1.91 g, disolver y diluir a 1 litro. A partir de esta solución, tomar alícuotas de 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 y 30 ml diluyendo en 250 ml de agua doblemente deionizada o destilada. Las concentraciones finales serán de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 120 ppm K, respectivamente.

C. Cálculos:

El factor de dilución (FD) resulta de la siguiente relación:

$$\text{FD} = \frac{\text{ppm}}{1000} \times \frac{50 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{0.25 \text{ g}} = 0.02$$

$$\% \text{ K} = \text{ppm K en solución} \times 0.02$$

4.2.3. Calcio (Ca):

Su determinación es similar a la descrita en suelos y el factor de dilución (FD) resulta en este caso de la siguiente relación:

$$FD = \frac{\text{ppm}}{1000} \times \frac{50 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{0.25 \text{ g}} \times \frac{20}{2} = 0.2$$

% Ca = ppm de Ca en solución x 0.2.

4.2.4. Magnesio (Mg):

Su determinación es similar a la descrita en suelos, y el factor de dilución (FD) resulta en este caso de la siguiente relación:

$$FD = \frac{\text{ppm}}{1000} \times \frac{50 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{0.25 \text{ g}} \times \frac{20}{2} = 0.2$$

% Mg = ppm de Mg en solución x 0.2.

4.3 DETERMINACION DE AZUFRE (S),*.

A. Material:

Tubos colorimétricos, pipetas de 10 ml, pipetas de 1 ml, colorímetro.

B. Reactivos:

1. Solución de Gelatina (Difco Bacto Gelatin, DIFCO Laboratories Inc, Detroit Michigan, USA: Disolver 0.6 g de gelatina en 200 ml de agua doblemente deionizada o destilada caliente (60-70°C) y enfriar la solución a 4°C. Después de 4 horas llevar el fluido semigelatinoso a la temperatura ambiente. Agregar 2 g de cloruro de bario de grado reactivo ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y agitar la mezcla hasta que el cloruro de bario esté disuelto. Llevar la solución a la nevera a 4°C por 16 horas antes de usarla. Esta solución puede ser refrigerada y utilizada hasta tres días después de preparada.

* Tabatabai y Bremner (1970), The Sulphur Institute (1968), Fox et al.(1964).

C. Procedimiento:

Tomar 10 ml del extracto de tejido vegetal en tubos colorimétricos, agregar 10 ml de agua deionizada o destilada y mezclar. Agregar 1 ml de la solución de gelatina-cloruro de bario y agitar. Leer el porcentaje de transmitancia en un colorímetro a 420 mμ, después de 80 minutos. El factor de dilución (FD) resulta de:

$$FD = \frac{\text{ppm}}{1000} \times \frac{50 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{0.25 \text{ g}} \times \frac{20}{10} = 0.04$$

$$\% S = \text{ppm de S en solución} \times 0.04.$$

D. Preparación de Estándares de Azufre (S):

Disolver 5.434 g de sulfato de potasio (K_2SO_4) grado reactivo en agua deionizada o destilada y diluir la solución a 1 litro. Un ml de esta solución contiene 1 mg de S-sulfato (1.000 ppm de S- SO_4) a partir de la cual preparar estándares de 0, 40, 80, 160, 240, 320 y 400 ppm de S- SO_4 , tomando alícuotas de 0, 4, 8, 16, 24, 32 y 40 ml y diluyendo en balones de 100 ml con agua doblemente deionizada o destilada. Luego de preparar estos estándares, se toman alícuotas de 2 ml en tubos Taylor, se agregan 3 ml de ácido nítrico y se continúa con el mismo procedimiento empleado para las muestras. La concentración que queda en los tubos Taylor será de 0, 1.6, 3.2, 6.4, 9.6, 12.8 y 16.0 ppm S- SO_4 , respectivamente. Luego se transfieren 10 ml de estos estándares a tubos colorimétricos y se continúa con el mismo procedimiento que para las muestras, teniendo concentraciones finales de 0, 0.8, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8.0 ppm de S- SO_4 , respectivamente.

4.4. DETERMINACIONES DE ALUMINIO (Al).*

A. Material:

Tubos de ensayo graduados de 25 ml, pipetas de 2 ml, pipetas de 1 ml, pipetas de 5 ml, baño de agua hirviendo, colorímetro.

* Chenery (1948), Plant Stress Laboratory, USDA ARS (1975).

B. Reactivos:

1. Fenolftaleina: Disolver 1 g en 60 ml de etanol absoluto y completar a volumen de 100 ml con agua doblemente deionizada o destilada.
2. Hidróxido de Amonio (NH₄OH): Diluir 10 ml de NH₄OH concentrado en 100 ml de agua doblemente deionizada o destilada.
3. Aluminon: En vasos separados disolver 0.1 g del reactivo "Aluminon" (ammonium-aurine tricarboxilate, C₂₂H₂₃N₃O₉), 20 g de goma acacia y, 267 g de acetato de amonio en agua doblemente deionizada o destilada. Cuando estén disueltos, mezclar y agregar 254 ml de HCl concentrado. Filtrar y diluir a 2 litros.
4. Acido Tioglicólico 1%: Tomar 1 ml de ácido tioglicólico de grado reactivo, y diluir con agua doblemente deionizada o destilada hasta 100 ml.

C. Procedimiento:

Transferir 2 ml del extracto a un tubo de ensayo graduado de 25 ml. Agregar 2-3 gotas de fenolftaleina y luego hidróxido de amonio hasta la aparición de un color rosado. Diluir a 10 ml con agua doblemente deionizada o destilada y agregar 1 ml de la solución de ácido tioglicólico al 1%. Mezclar y agregar 5 ml de solución de "aluminon". Mezclar nuevamente y ajustar pH a 4.2 con la solución de NH₄OH. Calentar en un baño de agua hirviendo durante 16 minutos. Enfriar durante hora y media como mínimo y completar a volumen de 25 ml con agua doblemente deionizada o destilada. Mezclar completamente y leer transmitancia a 537 mu. El factor de dilución (FD) resulta de la siguiente relación:

$$FD = \frac{50 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ g}}{0.25 \text{ g}} \times \frac{25 \text{ ml}}{2} = 2500$$

Al (ppm) = ppm Al en la solución x 2500.

D. Preparación de Estándares de Aluminio (Al):

Pesar 8.95 g de cloruro de aluminio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), disolver en agua doblemente deionizada o destilada y completar volumen a 1 litro. Esta solución contiene 1000 ppm Al. A partir de esta solución preparar 2 soluciones conteniendo 50 y 100 ppm de Al. Para ésto, tomar 12,5 y 25 ml de la solución 1000 ppm Al y diluir a 250 ml con agua doblemente deionizada o destilada. De estos nuevos estándares transferir diferentes alícuotas indicadas en la Tabla 5., a tubos Taylor de 50 ml y seguir el procedimiento en forma similar a la muestra.

Tabla 5. Preparación de Estándares de Aluminio.

ml de 50 ppm Al en tubos Taylor de 50ml	ppm de Al en los tubos Taylor	ppm Al tomando 2 ml de digerado en 25 ml
0	0	0
1	1	0.08
2	2	0.16
4	4	0.32
ml de 100 ppm Al en tubos Taylor de 50 ml	ppm de Al en los tubos Taylor	ppm Al tomando 2 ml de digerado en 25 ml
3	6	0.48
4	8	0.64
5	10	0.80

4.5. DETERMINACION DE NITROGENO. *

A. Material:

Tubos de digestión, bloque de digestión a 370°C, microdestilador, bureta con frasco de 50 ml, Erlenmeyers de 125 ml.

B. Reactivos:

1. Hidróxido de Sodio al 50%

* Bremner (1965).

2. Solución de Acido Bórico al 4%, la cual contiene 5 ml de solución de indicador mixto/litro.
3. Indicador Mixto: Pesar 0.5 g del indicador verde bromocresol y 0.1 g del indicador rojo de metilo en 100 ml de alcohol etílico del 96%.
4. HCl 0.02N : Preparar a partir de HCl 1N tomando 20 ml y diluyendo con agua doblemente deionizada o destilada a 1 litro.
5. Acido sulfúrico concentrado.
6. Catalizador: 0.5 g de selenio y 100 g de Na_2SO_4 se mezclan hasta que queden bien compactos.

C. Procedimiento:

1. Pesar 0.1 g de muestra en un tubo de digestión.
2. Agregar una porción del catalizador.
3. Agregar 4 ml de ácido sulfúrico concentrado.
4. Digerir la muestra en bloques a 370°C durante 30 minutos.
5. Dejar enfriar y agregar un poco de agua deionizada.
6. Pasar cuantitativamente el contenido del tubo a un microdestilador enjuagando con agua deionizada o destilada.
7. Agregar 20 ml de la solución de hidróxido de sodio al 50% y destilar recibiendo el destilado en una solución de ácido bórico al 4%.
8. Titular el destilado con HCl 0.02N hasta obtener un color gris claro.

NOTA: Al preparar las soluciones debe incluirse un control que contiene todos los reactivos menos la muestra. Luego de la titulación, los mililitros gastados con este control deben tomarse en cuenta para restarlos a las muestras.

D. Cálculos:

$$\% N = \frac{V-B}{0.1} \times 0.02 \times 0.014 \times \frac{100}{0.1}$$

Donde: V = ml gastados de HCl 0.02N en la muestra

B = ml gastados de HCl 0.02N en el control

0.02 = normalidad del HCl

0.014 = peso equivalente del nitrógeno

$\frac{100}{0.1}$ = $\frac{\text{relación porcentual}}{\text{peso de la muestra}}$

0.1 = peso de la muestra

4.6. DETERMINACION DE MICRONUTRIMENTOS (Zn, Cu, Fe, Mn, Na)*.

4.6.1. Obtención del Extracto de Tejido Vegetal:A. Materiales:

Tubos de digestión Taylor graduados 12.5, 25, 37.5 y 50 ml, buretas de 50 ml con frasco, plancha caliente para tubos.

B. Reactivos:

Mezcla Acido Nitro-Perclórico: Mezclar 1 litro de ácido nítrico (HNO_3) 65% analítico-grado reactivo con 500 ml de ácido perclórico (HClO_4) 70%, la relación entre ácidos es 2:1.

C. Procedimiento y Determinación de Micronutrientos (Zn, Cu, Fe, Mn, Na):

Pesar 0.5 g de tejido vegetal molido y seco en tubos de digestión Taylor y agregar 5 ml de la mezcla ácido nitro-perclórico. Colocar los tubos en un bloque de aluminio y calentar a una tasa tal, que el ácido nítrico sea expelido en 35 a 40 minutos, teniendo en cuenta que la temperatura final no debe exceder 220°C . Luego que el ácido perclórico haya reaccionado y aparezcan humos blancos, retirar los tubos y enfriar. Diluir a 12.5 ml con agua doblemente deionizada o destilada y esta solución constituye el extracto.

* Baker y Smith (1973), Sarruge y Haag (1974), Chapman y Pratt (1961).

Los elementos Zn, Cu, Fe, Mn y Na son determinados en forma similar a la indicada en su determinación en suelos. El factor de dilución (FD) común resulta de la siguiente relación:

$$FD = \frac{12.5 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ g}}{0.5 \text{ g}} = 25$$

Zn, Cu, Fe, Mn, Na (ppm) = ppm Zn,Cu,Fe,Mn,Na en la solución x 25.

4.6.2. Determinación de Boro (B). *

A. Material:

Crisoles de porcelana, mufla, varillas protegidas en su extremo con tubo de goma, embudos, bureta de 100 ml.

B. Reactivos:

Preparar una solución de HCl 0.1N tomando 8.3 ml de HCl concentrado (reactivo puro) y diluyendo en 1 litro. El resto de reactivos son los mismos empleados en suelos.

C. Procedimiento:

Pesar 0.5 g de tejido vegetal molido y seco en crisoles de porcelana e incinerar en una mufla a 550°C durante 2 horas. Enfriar el crisol y contenido y añadir 10 ml de HCl 0.1N triturando el residuo mediante una varilla. Filtrar y proceder tal como se indica en suelos. El factor de dilución (FD) es el siguiente:

$$FD = \frac{10 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ g}}{0.5 \text{ g}} = 20$$

Boro (ppm) = ppm B en solución x 20.

NOTA: Los estándares de boro son los mismos que para suelos.

* Dible et al. (1954).

4.7. DETERMINACION DE SILICE CRUDA.

A. Material:

Tubos Taylor de 50 ml, crisol Gooch de porcelana, planchas para tubos, mufla, asbesto, balanza, vasos de 250 ml, Erlenmeyers de vacío.

B. Reactivo:

Acido nítrico - Acido perclórico en una relación de 2:1.

C. Procedimiento:

1. Pesar 0.5 g de tejido vegetal en tubos Taylor.
2. Agregar 5 ml de ácido nítrico-perclórico relación 2:1.
3. Digerir la muestra en plancha caliente.
4. Transferir la solución digerida a un vaso de 250 ml lavando bien el tubo.
5. Preparar un Erlenmeyer de vacío introduciendo un crisol Gooch de porcelana con capa de asbesto (el crisol debe ser pesado previamente).
6. Tomar el contenido del vaso y filtrar a través del crisol Gooch de porcelana con capa de asbesto y lavar con abundante agua hasta obtener un "test negativo a ácido". Luego incinerar en una mufla a la temperatura de 550°C durante 2 horas. Dejar enfriar y pesar.

D. Cálculos:

$$\% \text{ Silice Cruda} = \frac{\text{Peso de la muestra seca en la mufla}}{0.5 \text{ g} = \text{peso de la muestra}} \times 100$$

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Allison, L.E. 1965. Organic Carbon. pp. 1367-1368. In C.A. Black (ed), Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Amer. Soc. Agr., Madison, Wisconsin.
- Baker, A.S. y R.R. Smith. 1973. Preparation of solutions for atomic absorption analyses of Fe, Mn, Zn, and Cu in plant tissue. J. Agr. Food Chem. 22:103.
- Bartlett, F.D. y J.R. Weller. 1960. Turbidimetric determination of sulfate-sulfur in soil extracts. Soil Sci. 90:201-204.
- Bornemisza, E., M. Constenla, A. Alvarado, E.J. Ortega, y A.J. Vasquez. 1979. Organic carbon determination by the Walkley-Black and Dry Combustion Methods in surface soils and Adept Profiles from Costa Rica. Soil Sci. Soc. Am. J. 43:78.83.
- Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soil. Soil Sci. 59:39-45.
- Bremner, J.M. 1965. Total Nitrogen. pp. 1149-1178. In C.A. Black (ed.), Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Amer. Soc. Agr., Madison, Wisconsin.
- Chapman, H.D. 1965. Cation-Exchange Capacity. pp. 891-901. In C.A. Black (ed.), Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Amer. Soc. Agr., Madison, Wisconsin.
- Chapman, H.D. y P.F. Pratt. 1961. Methods of Analysis for Soils, Plants and Waters. University of California, Division of Agricultural Sciences, Riverside.
- Chenery, E.M. 1948. Thioglycolic acid as an inhibitor for iron in the colorimetric determination of aluminum by means of aluminom. Analyst 73:501-502.
- Coleman, N.T. y G.W. Thomas. 1967. The basic chemistry of soil acidity. Agron. Monogr. 12:1-41.

- Cline, M.G. 1944. Principles of soil sampling. *Soil Sci.* 58:275-288.
- Dewis, J. and F. Freitas. 1970. Physical and chemical methods of soil and water analysis. *FAO Soil Bull.* No.10, Roma.
- Dible, W.T., W. Truog, and K.C. Berger. 1954. Boron determination in soils and plants. Simplified curcumin procedure. *Anal. Chem.* 26:418-421.
- Ensminger, L.E. 1954. Some factors affecting the adsorption of sulfate by Alabama soils. *Soil Sci. Amer. Proc.* 18:259-264.
- Fox, R.L., R.A. Olsen, and H.F. Rhoades. 1964. Evaluating the sulfur status of soils by plant and soil tests. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 28:243-246.
- Gardner, W.H. 1965. Water Content. pp. 82-127. In C.A. Black (ed.) *Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Properties.* Amer. Soc. Agr., Madison, Wisconsin.
- Hausenbuiller, R.L. 1957. Sampling saline and alkaly soils for laboratory analysis. *Washington Agr. Exp. Sta. Cir.* 303. 6 p.
- Hunter, A.H. 1974. Laboratory analysis of plant tissue samples. *International Soil Fertility Evaluation and Improvement*, Raleigh, N.C. 5 p.
- Jackson, M.L. 1964. *Analisis Químico de Suelos.* Omega, Barcelona, España. 662 p.
- Johnson, C.M. and A. Ulrich. 1959. *Analytical Methods.* California Agr. Exp. Sta. Bull. 766.
- Jones, J.B. y W.J.A. Steyn. 1973. Sampling, Handling and Analyzing Plant Tissue Samples. pp. 249-270. In L.M. Walsh y J.D. Beaton (eds.), *Soil Testing and Plant Analysis.* Soil Sci. Amer., Madison, Wisconsin.
- Lin, C. and N.T. Coleman. 1960. The measurement of exchangeable aluminum in soils and clays. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 24:444-446.
- Massoumi, A. and A.H. Cornfield. 1963. A rapid method for determining sulphate in water extracts of soil. *Analist* 88:321-322.

- McGaveston, D.A. and J.P. Widdowson. 1978. Comparison of six extractants for determining available phosphorus in soils from the Kingdom of Tonga. *Trop. Agric. (Trinidad)* 55:141-148.
- Minor, R.S. 1957. Physical measurements. Part I. Berkeley, California. 180 p.
- Murphy, J. and J. Riley. 1963. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta* 27:31-35.
- Nelson, W.L., A. Mehlich, and E. Winters. 1953. The development, evaluation and use of soil tests for phosphorus availability. *Agron.* 4:153-188.
- Olsen, S.R., C.V. Cole, F.S. Watanabe, and L.A. Dean. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *USDA Circular* 939:1-19.
- Olsen, S.R. and L.A. Dean. 1965. Phosphorus. In C.A. Black (ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties.* Amer. Soc. Agr., Madison, Wisconsin.
- Olson, A.R., C.R. Koch y G.C. Pimentel. 1956. *Introductory Quantitative Chemistry.* Freeman & Co., San Francisco. 470 p.
- Peck, T.R. y S.W. Melsted. 1973. Field Sampling for Soil Testing. In Walsh, L.M. y J.D. Beaton (ed.), *Soil Testing and Plant Analysis - Revised Edition.* Soil Sci. Soc. of America, Inc. Madison, Wisconsin, U.S.A. 491 p.
- Peech, M., L.T. Alexander, L.A. Dean and J.F. Reed. 1947. *Methods of Soil Analysis for Soil Fertility Investigations.* USDA Circular 757. 25 p.
- Peech, M. 1965. Hydrogen-Ion Activity, pp.914-926. In C.A. Black (ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties.* Amer. Soc. Agr., Madison, Wisconsin.
- Petersen, R.G. y L.D. Calvin. 1965. Sampling. In C.A. Black et al. (eds.) *Methods of Soil Analysis. Agronomy No.9. Part I.* American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, U.S.A. 770 p.

- Plant Stress Laboratory, USDA-ARS. 1975. The aluminum procedure for determining aluminum in plant tissue. Beltsville, Maryland. 5 pp.
- Pratt, P.F. and F.L. Bair. 1961. A comparison of three reagents for the extraction of aluminum from soils. *Soil Sci.* 91:357-359.
- Reed, J.F. y J.A. Rigney. 1947. Soil sampling from fields of uniform and non-uniform appearance and soil types. *Jour. Amer. Soc. Agron.* 39:26-40.
- Richards, L.A. 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. U.S. Salinity Laboratory, USDA Handbook 60.
- Sanchez, P.A. 1976. Properties and Management of soils in the Tropics. Wiley, New York. pp. 135-160.
- Sarruge, J.R. and H.P. Haag. 1974. Analises químicas em plantas. E.S.A. Luiz de Queiroz, Piracicaba, Sao Paulo, Brasil. 56 p.
- Steel, R.G. y J.H. Torrie. 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill, New York. 481 p.
- Steyn, W.J.A. 1959. Leaf analysis. Errors involved in the preparative phase. *J. Agr. Food Chem.* 7:344-348.
- Tabatabai, M.A. and J.H. Bremner. 1970. A simple turbidimetric method of determining total sulfur in plant materials. *Agr. J.* 62:805-806.
- Tabatabai, M.A. and J.M. Bremner. 1972. Distribution of total and available sulfur in selected soils and soil profiles. *Agr. J.* 64:40-44.
- The Sulphur Institute. 1968. Determination of sulphur in soil and plant material. *Tec. Bull.* 14:36-40.
- Uehara, G. y J. Keng. 1975. Management implications of soil mineralogy in Latin America. pp. 351-363. In E. Bornemisza y A. Alvarado (eds.), Soil Management in Tropical America. North Carolina State University, Raleigh.
- Walkley, A., and I.A. Black. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37:29-38.

Wear, J.I. 1965. Boron. pp. 1059-1063. In C.A. Black (ed.), Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Amer. Soc. Agr. Madison, Wisconsin.