



Evaluación de la metodología Bray-Kurtz y Olsen para la determinación de fósforo disponible en suelos

Evaluation of the Bray-Kurtz and Olsen methodology for the determination of available phosphorus in soils

Elizabeth YujraTicona y Roberto Miranda Casas

RESUMEN:

El Laboratorio de análisis de suelos y aguas (LAFASA), de la Facultad de Agronomía busca demostrar que los análisis de suelos realizados en este caso de P disponible, utilizando las metodologías espectrofotométricas (Bray-Kurtz y Olsen) generen resultados reproducibles, exactos, confiables y adecuados para la finalidad que se requiere, al mismo tiempo se quiere dar cumplimiento a los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración en base a la Norma Boliviana ISO-IEC 17025:2017 de los puntos 5.4.5 validando métodos no normalizados y modificados por el laboratorio y el punto 5.4.6 estimando la incertidumbre asociada al método de ensayo. Cumpliendo de esta manera con uno de los requisitos para una futura acreditación del laboratorio. En este trabajo se encontró la longitud de onda óptima para las condiciones ambientales del laboratorio, la reducción del método original, se realizó la validación de las metodologías (Bray-Kurtz y Olsen) evaluando los siguientes parámetros linealidad del sistema, linealidad del método, límites de detección, límites de cuantificación, determinación de la exactitud encontrando la repetibilidad, precisión intermedia, sesgo y la estimación de la incertidumbre, encontrado así rangos de lectura en los cuales los valores obtenidos y las condiciones en las cuales la determinación de P es confiable, Además de documentar todos los resultados obtenidos para realizar un control en laboratorio.

PALABRAS CLAVE:

Fósforo, Laboratorio de suelos, Metodologías, Olsen y Bray Kurtz, ISO 17025.

ABSTRACT:

The soil and water analysis laboratory (LAFASA) of the Faculty of Agronomy seeks to demonstrate that soil analyzes carried out, on this case of P available, with the use of spectrophotometric methodologies (Bray-Kurtz and Olsen) to generate results reproducible, exact, reliable and adequate for the purpose that is required, at the same time we want to comply the general requirements for the competence of the testing and calibration laboratories based on the Bolivian Standard ISO-IEC 17025: 2017 of the points 5.4.5 that validate non-standardized methods modified by the laboratory and point 5.4.6 estimating the uncertainty associated to the test method. Fulfilling this way one of the requirements for future laboratory accreditation. On this work, we found the optimal wavelength for environmental conditions of the laboratory, the reduction of the original method, and the validation of the methodologies was carried out (Bray-Kurtz and Olsen) evaluating the following parameters: linearity of the system, linearity of the method, limits of detection, limits of quantification, determination of the accuracy finding the repeatability, intermediate precision, bias and the estimation of the uncertainty, finding this way reading ranges in which the values obtained and the conditions in which the determination of P is reliable, besides to document all the obtained results to perform a control in the laboratory. With the methodologies already validated, the analysis of P in different, acid and basic, soil samples belonging to some of the municipalities of La Paz city was carried out, and a cost analysis was carried out for both methodologies.

KEYWORDS:

Phosphorus, Soil laboratory, Methodologies, Olsen and Bray Kurtz, ISO 17025.

AUTORES:

Elizabeth YujraTicona: Carrera Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés.

Roberto Miranda Casas: Docente Carrera Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés. roberto_neco@hotmail.com

Recibido: 25/01/2019. **Aprobado:** 20/03/2019.



INTRODUCCION

El Fósforo se considera en la agricultura mundial como el elemento nutriente al cual solo sobrepasa en importancia el nitrógeno, e influye en el desarrollo de los vegetales ya que es el responsable del desarrollo normal de sistema radicular, pronta madurez de los cultivos, formación de semillas, incrementa la resistencia de las plantas a las enfermedades. Una deficiencia de dicho elemento

provoca una marcada reducción del crecimiento de la planta y por consiguiente, un bajo rendimiento.

El análisis químico de suelos está orientado hacia el diagnóstico de la fertilidad, es por eso que existen metodologías específicas de extracción para cada nutriente las cuales varían dependiendo de las propiedades químicas de los mismos (pH, mineral arcilloso dominante, contenidos de materia orgánica), razón por la cual es necesario realizar evaluaciones de

metodologías de extracción de elementos en diferentes suelos, para lo cual es necesario contar con métodos de análisis que permitan obtener la concentración correcta en el suelo, por esto los métodos deben ser evaluados por medio de la validación.

De acuerdo a la norma NB-ISO/IEC 17025:2017 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración) validación, es la confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para la utilización específica prevista. Si esta definición la llevamos al campo de los laboratorios de análisis químicos, validar un método de ensayo consiste en demostrar, mediante una serie de experimentos, que el método es idóneo para el uso que se pretende hacer del mismo, manteniendo su eficacia a lo largo del tiempo y cumpliendo unos requisitos de calidad previamente establecidos. Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza. Así, el desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado. La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna y fácil de interpretar. En este trabajo se evaluó las metodologías Bray-Kurtz y Olsen a partir de la validación para la determinación de fósforo disponible en el suelo, en las instalaciones del Laboratorio de la Facultad de Agronomía de Suelos y Aguas (LAFASA).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue realizado en el Laboratorio de suelos de la Facultad de Agronomía, los suelos en los cuales se realizaron las pruebas provinieron de diferentes comunidades de los Municipio del departamento de La Paz. los materiales utilizados fueron los de laboratorio, un espectrofotómetro UV-Visible Cole-Parmer 83057-0,1 V 2.0, agitador magnético, agitador de mesa destiladora de agua, balanza analítica OHAUS, pH-metro OAKTON

micro pipeta de: 10 ml-5 ml-1 ml Hidrómetro de Bouyoucos entre otros.

Para la elección de la longitud de onda óptima, se realizó un barrido espectral utilizando soluciones de patrón a partir del estándar de Fosfato dihidrógeno de potasio: (KH_2PO_4), a concentración 0.2 y 0,4 ppm, (Bray-Kurtz y Olsen respectivamente). Para fines estratégicos y económicos del laboratorio se realizó algunas modificaciones, estos cambios se realizaron de acuerdo a la relación; Suelo-Extractante; Solución Filtrada-Aforo, Solución Stock-aforo y la longitud de onda.

Se realizó la validación de las metodologías en base a la evaluación de los siguientes parámetros: linealidad del sistema, linealidad del método, intervalo de trabajo, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación e incertidumbre, todos estos parámetros fueron evaluados en base a criterios de aceptación, descrito de acuerdo a lo que establece el Instituto Boliviano de Metrología, Guía de Validación de Métodos analíticos del Instituto de Salud Pública de Chile y la Guía Eurachem de México debido a que se adecuan al método desarrollado que además tienen como lineamientos la NB-ISO/IEC 17025:2017.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Elección de la longitud de onda óptima

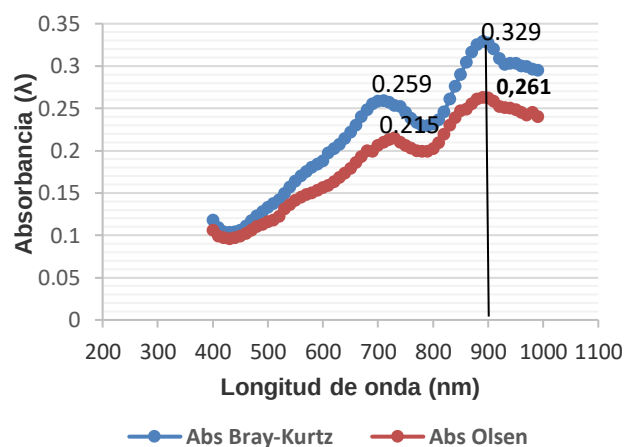
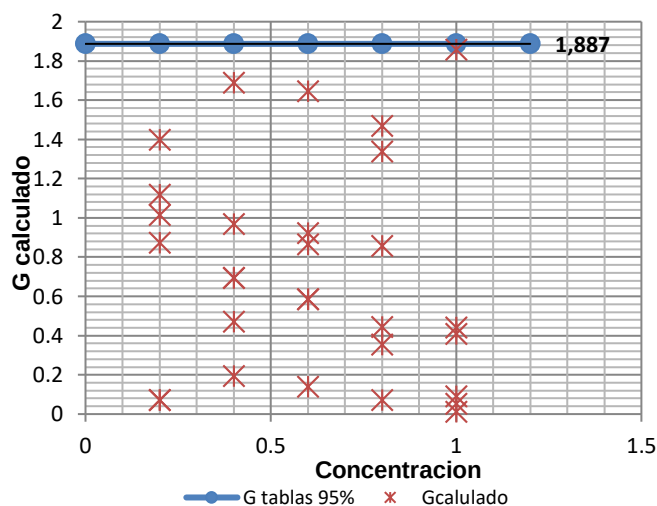


Figura 1. Espectro de máxima absorción de fósforo

En la Figura 1, podemos observar claramente que el espectro de máxima absorbancia (λ) se encuentra a dos longitudes de onda de máxima absorción las cuales se dan a 710 y otro a 900nm para ambos métodos.

Reducción de la metodología original

Realizado el análisis estadístico se determinó que no existen diferencias significativas entre los métodos de Olsen y Bray Kurtz. Por tanto podemos mencionar que al realizar los análisis con el método modificado (10ml) se obtendrá valores que no son significativamente diferentes del método original (50ml).



Validación de los métodos Bray-Kurtz y Olsen

Linealidad

El descarte de datos anómalos por medio del Tests de Grubbs a un 95% de probabilidad, de acuerdo a la Figura 2, podemos observar que los valores de G_{cal} para las concentraciones (0,2-0,4-0,6-0,8 y 1) y (0,2-0,3-0,4-0,4 y 0,5) para cada método respectivamente, no sobrepasa el valor de G_{tab} que es de 1,887, en base a esta evaluación estadística se acepta los valores experimentales, por lo que ningún valor fue descartado cumpliendo así con lo establecido por el Instituto Boliviano de Metrología (2018).

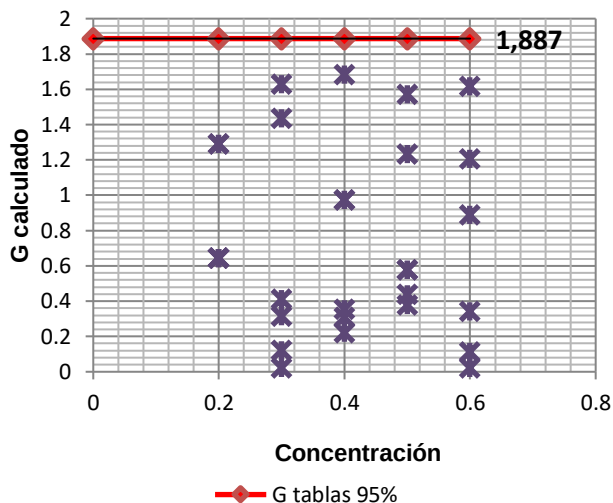


Figura 2. Evaluación de los datos para el método Bray-Kurtz y Olsen.

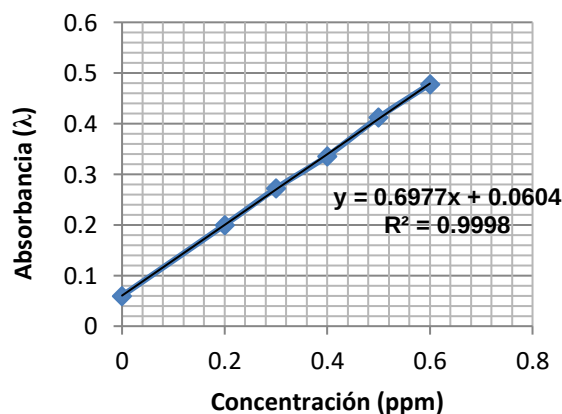
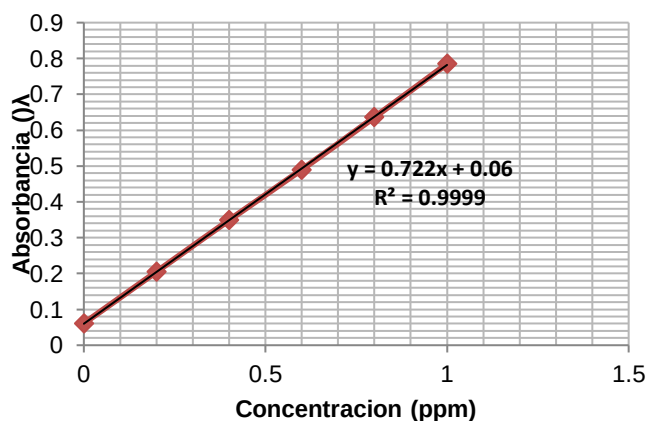


Figura 3. Linealidad del método Bray-Kurtz y Olsen.

En la Figura 3, se observa que la linealidad para el método Bray-Kurtz y el método Olsen por lo que podemos mencionar que existe un alto grado de correlación entre la absorbancia (λ) y la concentración (ppm), cumpliendo así la condición de proporcionalidad indicada por la Ley de Lamber Beer además que los indicadores de linealidad calculados cumplen con los criterios de aceptación establecido por la guía de validación (Eurachem, 2005), de esta manera indicamos que los métodos de Bray-Kurtz y Olsen dan resultados lineales para la determinación de P en el intervalo de 0 a 1 ppm para el método Bray-Kurtz y de 0 a 0.5 ppm para el método Olsen. Además se establece estas concentraciones para realizar la curva de calibración que se realizará en el espectrofotómetro antes de leer las muestras de suelo.

Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección para el método Bray-Kurtz es 0,066 (λ) para el método Olsen 0,062 (λ) siendo estas las cantidades mínimas de analito en la muestra de suelo que pueden ser detectables pero no cuantificables.

En la Figura 4, podemos observar que el LOQ (Límite de cuantificación) para el método

Bray-Kurtz es de 0,073 (λ) y para el método Olsen es de 0,069 (λ), determinando así que estos métodos son capaces de cuantificar en forma confiable cantidades mínimas de fósforo en el suelo que tengan absorbancias (λ) iguales o mayores a los ya mencionados si hubieran casos en los que las absorbancias fueran menores a los límites de cuantificación se procederá a realizar el análisis con mayor cantidad de la solución filtrada (mayor alícuota), de igual forma si una muestra obtiene absorbancias mayores se procederá a disminuir la alícuota de la solución filtrada, para así realizar el analizar las muestras de suelo dentro del intervalo de trabajo establecido.

El criterio de aceptación para los Límites de Detección y el Límite de Cuantificación es que sean menores al límite crítico (0.065) definido por el (Instituto de Salud Pública, 2010), ($LC < LOD \ll LOQ$), siendo los valores para el método Bray-Kurtz ($0.065 < 0.066 \ll 0.073$), para el método Olsen ($0.061 < 0.062 \ll 0.069$), cumpliendo así con el criterio de aceptación.

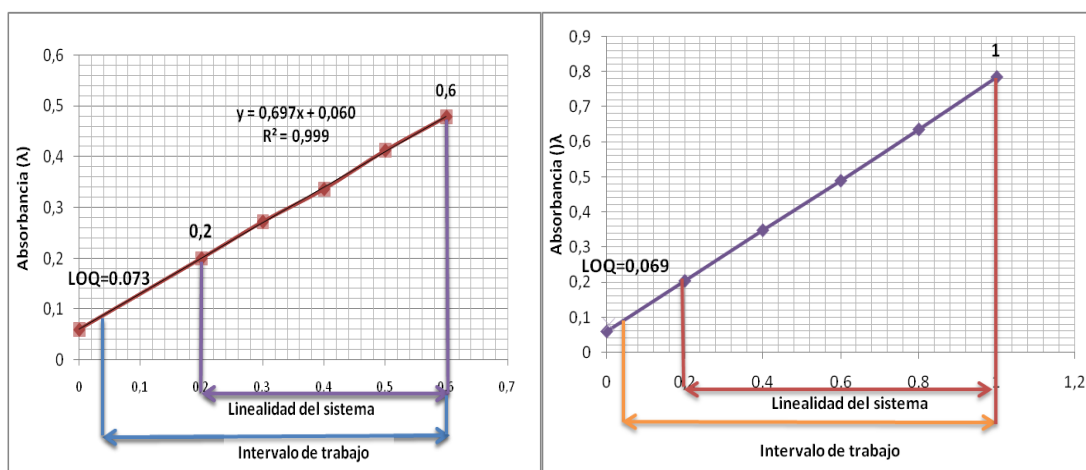


Figura 4. Límites del método Bray-Kurtz y Olsen.

Repetibilidad

En la Tabla 1, se observa valor más alto de %CV= 1,369 para Bray-Kurtz %CV= 1,167 para

Olsen, presentando así la mayor dispersión entre sus datos, pero aun así no se encuentran por fuera de los criterios de aceptación. Por lo tanto podemos decir

que los métodos son repetibles, ya que las medidas realizadas por un mismo analista, mismo equipo (espectrofotómetro), mismos reactivos, se encuentran en óptimas condiciones y que las variaciones en las condiciones ambientales del laboratorio no influyen

en los resultados, entonces los métodos son repetibles cumpliendo así con el criterio de aceptación $\%CV \leq 2$ consideradas aceptables para los métodos espectrofotométricos según lo establecido por CODEX (2009).

Tabla 1. Repetibilidad para los métodos de Olsen y Bray Kurtz.

Parámetro	Olsen		Bray Kurtz		Criterio de aceptación
	Concentración (P)	Resultado % CVr	Concentración (P)	Resultado % CVr	
Repetibilidad	0,2	0,493	0,2	1,167	$\leq 2\%$
	0,4	1,923	0,3	1,37	
	0,6	1,329	0,4	0,822	
	0,8	1,796	0,5	0,583	
	1	0,278	0,6	0,606	

Reproducibilidad intermedia

Los resultados obtenidos para el segundo analista se muestran en la Tabla 2, para este parámetro se determinó su aceptación por medio del coeficiente de variación de *Horwitz* y luego se determinó el índice de *HorRat*, el cual de acuerdo al (Instituto de Salud Pública, 2010), establece que el valor de *HorRat* para 1 ppm (rango de trabajo) no debe ser mayor de 2%, por lo tanto ese será el valor

de aceptación que los valores calculados. Como se observa el valor más alto de Factor *HorRat* = 0,177 para método Bray-Kurtz y para el método Olsen el Factor *HorRat* = 0,116 estos valores representan la mayor dispersión entre sus datos, pero aun así no se encuentran por fuera de los criterios de aceptación. Lo que demuestra que la técnica es totalmente reproducible.

Tabla 2. Reproducibilidad intermedia Método Olsen y Bray-Kurtz.

Parámetro	Olsen			Bray Kurtz			Criterio de aceptación
	Concentración (P)	resultado % CVH	Facto HorRat	Concentración (P)	resultado % CVH	Factor HorRat	
Reproducibilidad Intermedia	0.2	16	0.177	0.2	16	0.074	$\leq 2\%$
	0.4	16	0.113	0.3	16	0.116	
	0.6	16	0.165	0.4	16	0.062	
	0.8	16	0.180	0.5	16	0.049	
	1.0	16	0.022	0.6	16	0.047	

Exactitud - Sesgo

En la Tabla 3, se muestran los resultados de los ensayos para la determinación del sesgo entre el valor de referencia (MRC) y valor obtenido empleando las respectivas metodologías.

Para la evaluación del sesgo, se realizó la prueba *t*, en la cual el *tcalc* es menor a *tcrit* para un nivel de confianza de 95%, por lo que podemos decir que las metodologías empleadas reportan resultados exactos.

Tabla 3. Datos obtenidos para el Sesgo método Bray-Kurtz y Olsen.

Nivel	Olsen			Bray Kurtz			ttab $\alpha = 005$
	Muestra pp P	Sesgo	tcal	Muestra ppm(P)	Sesgo	tcal	
1	0.2	0.0011	0.159	0.2	0.0001	0.088	2,262
2	0.4	0.0019	0.14	0.3	0.0040	0.274	
3	0.6	0.0033	0.252	0.4	0.0060	0.630	
4	0.8	0.0027	0.273	0.5	0.0030	0.197	
5	1.0	0.0018	0.279	0.6	0.0400	0.382	

Recuperación (%)

Respecto a la recuperación del analito de interés (suelo), se observaron valores satisfactorios como se muestran en la Tabla 8. En promedio, la recuperación más alta de las muestras naturales fortificadas para el método Bray-Kurtz fue 101,1%, 102,4%, 99,3% y para el método Olsen de 101,1%, 102,4%, 99,3% para los niveles bajo, medio y alto respectivamente, como se observa en los Gráficos 15

y 16, estos valores cumplen con lo establecido por la ecuación de Horwitz (Instituto de Salud Pública, 2010), que menciona que el % de recuperación esperado debe encontrarse entre 80% y 120%, cumpliendo de esta manera el criterio de aceptación.

Por lo tanto, podemos decir que el método Bray-Kurtz y el método Olsen son método exactos en cuanto a la extracción de la cantidad de analito existente en la muestra.

Tabla 4. Valores obtenidos en % recuperación para ambos métodos.

Nº	Código	% R Bray-Kurtz			% R Olsen		
		Nivel bajo 0,2	Nivel medio 0,4	Nivel alto 0,6	Nivel bajo 0,2	Nivel medio 0,3	Nivel alto 0,4
1	MRI-1	101.5	106.25	98.83	86	81.3	91.0
2	MRI-2	101.0	104.50	99.50	91	87.0	85.0
3	MRI-3	102.0	103.25	100.83	90	87.7	86.3
4	MRI-4	98.5	102.50	99.17	86	84.3	86.5
5	MRI-5	102.0	95753.00	99.17	96	86.3	89.5
6	MRI-6	101.5	102.25	98.33	100	90.7	90.8
	Yi	101.1	102.40	99.30	91	86.2	88.2

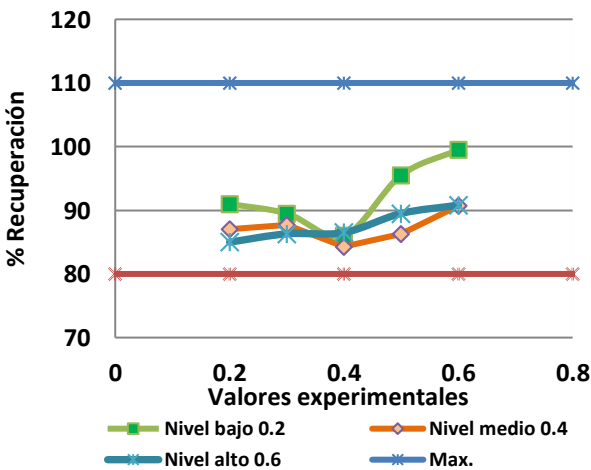
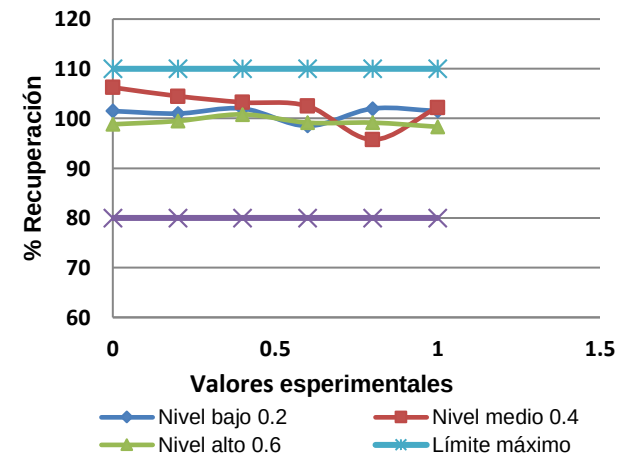


Figura 5. Porcentaje de Recuperación método Bray-Kurtz y Olsen.

Con los datos obtenidos en la Tabla 4, se realizó el gráfico control de recuperación donde se observa que los valores obtenidos de los tres niveles de % R se encuentra dentro de los niveles máximos y mínimos para cada método, por lo cual podemos mencionar que el rendimiento de ambos métodos analíticos son aceptables en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra de suelo.

Incertidumbre

En la Figura 6, podemos observar la contribución de las fuentes de incertidumbre estimadas, se puede apreciar que la mayor contribución corresponde a la determinación de la concentración de fósforo obtenido del factor de dilución de 10 ml lo que se demuestra que ésta es la operación que es necesario mejorar para aumentar la calidad de los resultados de este ensayo. La masa molar prácticamente no contribuye con incertidumbre, en tanto que la pureza del (KH_2PO_4), la masa del (KH_2PO_4). Nuestra incertidumbre estándar nos da un valor de $\pm 0,576$, por lo tanto este es valor que va acompañado al resultado del análisis de P.

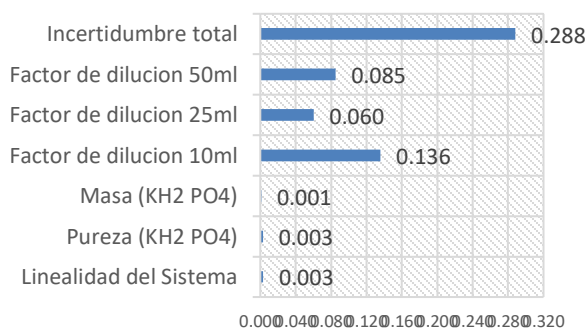


Figura 6. Incertidumbre relativa para el método Bray-Kurtz y Olsen.

CONCLUSIONES

Las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto desempeño se determinó una longitud de 889 nm para los métodos espectrofotométricos Bray-Kurtz y Olsen, este valor fue determinado para las condiciones ambientales de temperatura y humedad del laboratorio.

En cuanto a la modificación de la metodología original en relación: suelos-Extractante; Solución filtrada-Aforo, Solución Stock-aforo demuestran que el método modificado (10ml) se obtiene valores que no son significativamente diferentes del método original (50ml).

Se comprobó el cumplimiento de la linealidad del sistema y la linealidad del método en el intervalo de concentraciones que se estudiaron por su elevado valor del coeficiente de correlación alcanzado que es 0,9999 para ambos métodos.

A partir de los ensayos realizados se determinó el límite de cuantificación para los métodos Bray-Kurtz y Olsen fue 0,073 y 0,069 de absorbancia (λ), estos valores corresponde a la más baja cantidad de fósforo que puede determinarse cuantitativamente con los métodos ya mencionados.

La exactitud del método analítico cumple con los parámetros y los criterios de aceptación (%R= 80-120), concluyendo que los resultados de la prueba obtenida mediante el procedimiento establecido bajo condiciones descritas demostrando así que el método es exacto.

El método analítico para la cuantificación de P en el suelo es preciso dentro del ensayo al ser efectuado cualquier día, diferente analista y cualquier muestra a diferentes concentraciones. Es un procedimiento analítico preciso ya que posee un grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente en el laboratorio. Los resultados en la precisión mostraron que los coeficientes de variación fueron $\leq 2\%$, lo que demuestra la buena repetibilidad de los métodos de cuantificación. No se observaron diferencias significativas entre las medias de ambos analistas y ambos días por lo tanto los métodos analítico fue reproducible por ambos analistas.

Los resultados de ambos métodos (Bray-Kurtz y Olsen), permite concluir que estos métodos analíticos para la cuantificación de P en suelos ácidos y básicos, presentan resultados de linealidad del

sistema, linealidad del método, precisión y exactitud son satisfactorios que permiten obtener resultados seguros y confiables en la detección y cuantificación de P, además de contar con el dato de incertidumbre que debe ir acompañado al resultado cumpliendo así el proceso de validación para ambos métodos bajo los lineamientos de la NB-ISO/IEC 17025:2017, en los numerales 5.4.5 y 5.4.6.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Avellaneda, M.O. (1980). Fósforo disponible en el suelo: su evaluación. IX Reunión Argentina de la Ciencia del Suelo. Actas: 123-159.p.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas. En UNDOC.
- Benier, R. (2003). Técnicas de muestreo de Suelo para el Análisis de la Fertilidad. osorno.
- Biabati, G. (s./f.). El Fósforo en la planta y el suelo.
- Bonomelli, C. (2003). Disponibilidad de Fósforo en un andisol, con distintas fuentes de dosis de fosforo, en condiciones controladas. Ciencia e investigacion agraria , 3.
- Cañez. (2015). Validación de un Método Analítico para la Determinación de Fósforo por Espectrofotometría. Revista de Ciencias Biológicas y de Salud. Vol. XVII (1) , 32-39 p.
- Conti. (1998). Principios de Edafología. Fauba.
- CODEX. (2009). Directrices sobre la terminología analítica (CAC/GL 72-2009).
- Chilon, E. (1996). Manual de Edafología, practica de campo y laboratorio. La Paz – Bolivia. Editado en la facultad de Agronomía UMSA. 65 – 66 p.
- Duffauet. (2010). Validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. En Aspectos generales de la Validación. Chile.
- EURACHEM/CITAC. (2005). Guide Traceability in Chemical Measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement. This Guide was in part supported under contract with the UK Department of Trade and Industry as part of the National Measurement System Valid Analytical Measurement (VAM) Program.
- Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNER. (2012). Determinación de P extraíble en suelos por el método Bray y Kurtz. En L. E. Boschetti.
- Fernández, L. C. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos*. Mexico, D.F.
- INSTITUTO BOLIVIANO DE METROLOGIA. (2018). Curso de validación.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). En Validación de métodos y Determinación de la incertidumbre de la medición : "Aspectos Generales sobre Validación de métodos". Santiago de Chile.
- Miranda, R.; Caballero, A. 2015. Métodos y análisis del suelo. La Paz. Bolivia. UDIC. UMSA. 84 p.