

LA DETERMINACION DE TRAZAS DE HIERRO EN LA SOLUCION DEL SUELO EN UN CULTIVO DE ARROZ BAJO INUNDACION INOCULADO CON NITRIFICADORES UTILIZANDO UN METODO RADIOISOTOPICO

Dolly Carpio (1) y A. H. Merzari (2)

RESUMEN

Los autores determinan cuantitativamente trazas de hierro en la solución de un suelo cultivado con arroz bajo inundación, en atención a las distintas variables de un experimento en invernáculo basado en la difusión de O_2 en el suelo proveniente del sistema radical, la incorporación de sulfato de amonio, superfosfato de calcio y la inoculación con nitrificadores.

Recurren para ello al análisis por dilución isotópica y separación subestequiométrica utilizando ^{59}Fe y determinando cantidades del orden de 10^{-3} ppm. Dichas cantidades sufren modificaciones significativas como resultado de las distintas variables consideradas las que pueden dar lugar a la aparición de distintos sistemas de potencial de óxido reducción.

SUMMARY

Traces of iron in the soil solution of soil in which rice was growing under flooded conditions were quantitatively determined, applying the substoichiometric isotopic dilution analysis using ^{59}Fe to determine amounts in the order of 10^{-3} ppm Fe. This technique was applied to a greenhouse experiment in which the variables (addition of ammonium sulphate, calcium superphosphate and inoculation with nitrifiers) were designed to alter the rate of O_2 diffusion in the rhizosphere of the root system.

The amount of Fe in the soil solution was significantly modified by the different treatments and these changes were related to the appearance of different redox potentials.

INTRODUCCION

Van Raalte (1941) estableció claramente la existencia de un transporte de oxígeno desde el tallo a la zona radical del arroz que permite a las raíces funcionar aeróbicamente en un medio anaerobio y que, al difundirse también al suelo circundante, determina la formación de óxido férrico alrededor de las raíces, según se demostró posteriormente (Ponnamperuma, 1955). Esto implica la existencia de un estado oxidado a nivel rizosférico con el desarrollo de microorganismos aerobios, lo que puede ser confirmado mediante un experimento muy simple, consis-

tente en la transferencia de una plántula de arroz desde una atmósfera reducida a un medio con agar y agregado de leucoazul de metileno; a las pocas horas, en la zona de la rizosfera se hace bien visible el color azul resultante de la oxidación del leuco producto inicial.

Sobre la base de estos antecedentes, Merzari y Broeshart (1968), incorporaron la inoculación con nitrificadores a nivel rizosférico como nuevo parámetro en el estudio de la fertilización nitrogenada del cultivo de arroz bajo inundación. Con esta línea de trabajo, Merzari *et al.* (1975), demostraron que en esas condiciones las variables inoculadas con

(1) y (2) Investigadora y Director del Centro de Radiobiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, Capital Federal.

nitrificadores tenían, a nivel rizosférico, un potencial redox ubicado dentro del sistema nitrato-nitrito aumentando el rendimiento en materia seca. Este último aspecto, en relación a la cantidad de hierro soluble y la determinación cuantitativa de ácidos grasos volátiles en la solución del suelo fue estudiado por Merzari y Carpio (1979).

A su vez, Yoshida y Ancajas (1973), demostraron fijación de nitrógeno molecular, con claro efecto rizosférico, en arroz creciendo en condiciones de inundación debida a la acción de microorganismos aerobios, tales como el *Azotobacter*, lo que confirma lo sostenido por Van Raalte y avala la hipótesis de trabajo de Merzari y Broeshart y los posteriores trabajos de Merzari y colaboradores.

Dentro de este panorama derivado de la difusión de oxígeno a nivel radical en cultivos bajo inundación, el elemento hierro de mucha importancia como sustancia nutritiva para la planta de arroz, es afectado por las condiciones generadas por la inundación dando lugar a la entrada de notables cantidades de hierro soluble al estado ferroso. En este proceso de reducción intervienen activamente microorganismos del suelo. Sin embargo, en Ponnampuruma (1955) se hace notar que la difusión de O_2 por las raíces del arroz, modifica esta situación, generalmente expuesta con sentido muy amplio, produciendo deposición de óxido férrico según dos variantes:

a) Raíces jóvenes, sin deposición de óxido férrico, pues la mayor difusión del O_2 hace que el compuesto oxidado precipite fuera de la superficie radical.

b) Raíces viejas, cuyos tejidos de suberina y lignina retardan la difusión del oxígeno produciéndose la precipitación sobre las raíces, las que adquieren así un color castaño rojizo bien característico.

La importancia del hierro como elemento nutritivo de la planta de arroz, la utilización de la inoculación con nitrificadores y la práctica de fertilización de cultivos en suelos

inundados, hace necesario estudiar las posibles modificaciones en la cantidad de hierro existente en la solución del suelo según las distintas variables utilizadas. La bibliografía consultada señala las dificultades analíticas cuantitativas para dicha determinación, por tratarse en todos los casos de trazas, de allí que se optara por un método analítico por dilución isotópica y subestequiometría ensayado sólo una vez en el país (Merzari y Carpio, 1971).

El método analítico por dilución isotópica fue sugerido independientemente por Hevesy y Hobbie (1932) y por Starik (1933), pero su uso generalizado para análisis orgánicos e inorgánicos data de 1961, año en el cual aparecen más de 150 trabajos, luego de haberse sugerido modificaciones al método original (Keston *et al.*, 1949; Mayor y Collins, 1951; Alimarin y Bilomovitz, 1960).

A su vez, el principio subestequiométrico aplicado a métodos analíticos basados en la dilución isotópica, fue motivo de varios trabajos que llevaban por fin la posibilidad de determinar trazas de metales en cantidades del orden de 10^{-10} gramos (Zimakov y Rozhauski, 1958; Suzuki, 1959; Ruzicka y Stary, 1961, 1964 a y b). Estos últimos autores proponen el análisis por doble dilución isotópica y separación subestequiométrica aplicando la fórmula de Landgrebe (Landgrebe *et al.*, 1964).

El principio subestequiométrico posibilita el aumento de la sensibilidad analítica de la metodología por dilución isotópica dentro de rangos que permiten la determinación de trazas.

Se parte de la ecuación de Landgrebe:

$$y = y_s \left(\frac{S_s}{S} - 1 \right) \quad (I)$$

Esta metodología, tradicional para las determinaciones analíticas por dilución isotópica directa está imposibilitada *per se* para la detección de trazas, pues la determinación de la actividad específica en la misma requie-

re la separación de cantidades tales de la sustancia, para que puedan ser determinadas por pesada o por algún método físico-químico.

En (I)

y = elemento inactivo a determinar.

y_s = radioisótopo estándar.

S_s = actividad específica original del radioisótopo estándar.

S = actividad específica resultante de la dilución isotópica.

En esta fórmula,

$$S_s = \frac{a_s}{m_s} \quad \text{es la actividad medida en cpm en}$$

relación a la unidad de masa y $S = \frac{a}{m}$

Si se separan de ambas soluciones iguales cantidades de peso del elemento a ser determinado ($m = m_s$) su contenido y en la muestra analizada es la resultante de la medición de sus actividades.

Reemplazando en (I) S_s y S por sus dos iguales

$$y = y_s \left(\frac{\frac{a_s}{m_s}}{\frac{a}{m}} - 1 \right) \quad \text{pero si } m = m_s$$

$$y = y_s \left(\frac{a_s}{a} - 1 \right) \quad \text{(II)}$$

Con este método es utilizable la dilución isotópica directa para determinar trazas de elementos pues siempre se puede medir la actividad de cantidades muy pequeñas de radioisótopos. Además, el análisis no requiere que el componente a ser determinado deba ser separado cuantitativamente de la muestra a analizar, lo cual significa una gran ventaja. No hay inconveniente en aplicar idéntico principio en dilución isotópica indirecta.

Ahora bien, para llevar a cabo un análisis de trazas en la forma descripta, es necesario separar exactamente cantidades iguales del elemento a ser determinado ($m = m_s$) de las soluciones muy diluidas que contienen el

elemento ensayado en distintas cantidades. Para ello puede utilizarse la extracción por solventes o el intercambio iónico, que permiten determinaciones por dilución isotópica de cantidades de metales del orden de 10^{-10} gramos.

Se pone énfasis en la teoría del intercambio iónico, que se basa en la utilización de agentes complejantes capaces de formar complejos cargados negativamente con el ión a ser determinado. Estos complejos son separados a su vez del exceso de ión metálico por medio de intercambiadores de cationes.

A veces es importante, para obviar las reacciones laterales que pueden ocurrir en una muestra desconocida, utilizar un doble análisis subestequiométrico por dilución isotópica. Para ello se parte de dos pesos diferentes pero conocidos del elemento a ser analizado, los cuales son agregados a alícuotas iguales de la muestra que contiene un peso X del elemento junto a un peso Y del mismo en el trazador radioactivo. Pesos iguales del elemento se separan de las soluciones resultantes mediante el uso de una cantidad subestequiométrica de reactivo y las actividades en cuentas por minuto (cpm) se determinan como en el análisis simple.

En este caso y cuando $Y \ll Z_1, Z_2$ se aplica la fórmula de Landgrebe (Landgrebe *et al.*, 1964).

$$X = \frac{a'_2 Z_2 - a'_1 Z_1}{a'_1 - a'_2} \cdot Y \quad \text{(III)}$$

a'_1 y a'_2 = actividad de los pares comparados.

Z_1 y Z_2 = cantidades de portadores agregados.

X = cantidad a determinar en la muestra.

Y = cantidad del elemento en la solución radioactiva.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó un suelo de Perkins, provincia

de Buenos Aires, con las siguientes características:

pH (1 : 1) : 7,15

Fósforo s/Bray y Kurtz N° 1 : 3,58 mg P/100 g de suelo.

Materia Orgánica: 3,75%.

Se agregó superfosfato de calcio en proporción de 59,5 mg por kg de suelo lo que equivale a unos 70 kg de P_2O_5 /ha por haber utilizado un superfosfato de 47% de P_2O_5 .

En lo que hace al sulfato de amonio, su incorporación se hizo a razón de 235 mg/kg de suelo lo que significa aproximadamente 100 kg de nitrógeno por hectárea.

Las especies de nitrificadores utilizadas se obtuvieron del mismo suelo mediante cultivos de enriquecimiento.

El ensayo, realizado en invernáculo, consistió en las siguientes variables:

- 1) Testigo (suelo + planta).
- 2) Suelo + planta + superfosfato.
- 3) Suelo + planta + superfosfato + nitrificadores.
- 4) Suelo + planta + superfosfato + sulfato de amonio + nitrificadores.
- 5) Suelo + planta + superfosfato + sulfato de amonio.
- 6) Suelo + planta + sulfato de amonio + nitrificadores.
- 7) Suelo + planta + sulfato de amonio.

Se utilizaron 26 recipientes de vidrio cada uno con 1 kg de tierra, cubiertos externamente con cartulina negra, donde se ubicaron 10 semillas tratadas según la variable a considerar.

Durante el ensayo los recipientes con las plantas recibieron luz complementaria y fueron rotados diariamente en su ubicación.

La cosecha de la parte aérea se efectuó a los 32 días y, al mismo tiempo, de cada una de las variables se hizo una extracción de la solución del suelo partiendo del suelo saturado. La extracción se realizó mediante una prensa con membrana, durante 24 horas y a 15 atmósferas. Las muestras así obtenidas se colocaron en heladera con el agregado de ti-

mol para su conservación y su volumen se relacionó con el peso del suelo seco al aire.

El análisis de las muestras de la solución del suelo se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

- a) Se colocaron 5 ml de la solución extraída en cada uno de 4 erlenmeyers de 25 ml.
- b) Se agregó luego, en cada uno de ellos, 1 ml de solución de Cl_3Fe de las diluciones siguientes: 1 ppm, 10^{-1} ppm, 10^{-2} ppm, 10^{-3} ppm.
- c) Se colocó en cada erlenmeyer 1 ml de la solución de $Cl_3^{59}Fe$.
- d) Se dejó en reposo durante 1 hora para facilitar el intercambio isotópico.
- e) Luego se agregó 1 ml de EDTA de la siguiente forma: 10^{-5} M a 1 ppm; 10^{-6} M a 10^{-1} ppm; 10^{-7} M a 10^{-2} ppm; 10^{-7} M a 10^{-3} ppm.
- f) Se acidificó la solución con HCl diluido hasta pH 3, gota a gota.

A los fines de permitir la reacción Fe-EDTA los recipientes se colocaron en baño maría a 50°C durante 30 minutos.

h) Se dejó enfriar la solución y se transfirió a columnas de resina de intercambio iónico (catiónico) DOWEX 50 Wx4, 200-400 mesh. La dimensión de cada columna fue de 10 cm de largo por 1 cm de diámetro.

i) Se eluyó hasta 15 ml mediante lavados repetidos con agua destilada.

j) Del eluido se tomaron alícuotas de 2 ml previa homogeneización.

k) Se midió la actividad en un espectrómetro de centelleo utilizando un contador de pozo.

l) De cada una de las muestras a analizar se efectuaron 4 lecturas correspondientes a 1 ppm; 10^{-1} ppm; 10^{-2} ppm y 10^{-3} ppm y se compararon de a pares aplicando la fórmula de Landgrebe.

Es importante destacar que la resina de intercambio utilizada para el llenado de las columnas fue previamente tratada en repetidas ocasiones con HCl 6M a fin de extraerle todo vestigio de hierro, lavándose finalmente muy cuidadosamente con agua desmineralizada hasta total eliminación de cloruros. Con

la resina en condiciones de uso se procedió a llenar las columnas respectivas hasta 1 cm de su extremo superior las que luego de utilizarse se reactivaron con HCl 3M

Tratándose de la determinación de cantidades muy pequeñas, se debe insistir sobre la calidad de las drogas y el agua a utilizar como asimismo sobre la necesidad de una correcta limpieza del material de vidrio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados analíticos obtenidos pueden apreciarse en el Cuadro 1 y el análisis estadístico realizado permite concluir:

1. Existen diferencias significativas entre la variable 1 (Testigo) y todas las restantes.
2. De las restantes todas difieren significativamente, salvo las variables 2 y 3.

El exudado de oxígeno molecular por las raíces del arroz permitió la utilización de variables que implican la inoculación con nitrificadores. Procesos de este tipo, que generan energía a través de la oxidación del amoníaco y los nitritos pueden:

- a) Ser la etapa previa de un proceso reductivo posterior.
- b) Posibilitar una disminución del pH si no existiesen suficientes iones Ca^{++} para su neutralización.
- c) Inhibir el proceso reductivo por la formación de nitratos.

En este experimento, los resultados correspondientes a las variables 1 2 y 3 pueden explicarse por una paulatina disminución del potencial redox regulada por la excreción de O_2 por el sistema radical. La no diferencia significativa entre 2 y 3 surge claramente del no agregado de sulfato de amonio que actúa como fuente energética de los nitrificadores. Las variables 4 y 5, donde se ha incorporado superfosfato de calcio y sulfato de amonio, con y sin inoculación de nitrificadores, dan lugar a la determinación de las mayores cantidades de hierro soluble, lo que puede justificarse en virtud de:

- 1) Consumo del O_2 excretado a través del sistema radical por las bacterias de la nitrificación, inoculadas o preexistentes en el suelo.
- 2) Inmediato consumo del NO_3^- producido en el proceso anterior por la planta de arroz.
- 3) Creación por lo tanto, de condiciones de reducción que facilitan la formación de hierro soluble.

En cuanto a las variables 6 y 7, donde se ha incorporado sulfato de amonio con y sin inoculación de nitrificadores, los datos consignados en el Cuadro 1 son cuantitativamente menores y los mismos podrían explicarse en virtud de:

- 1) Incorporación del ión SO_4^- al suelo a través del sulfato de amonio.
- 2) No incorporación de iones Ca^{++} al no agregarse superfosfato de calcio.

CUADRO 1: Resultados obtenidos en la determinación de trazas de Fe en la solución de un cultivo de arroz bajo inundación (en $\mu\text{g/g}$ de suelo).

| Muestra | REPETICIONES | | | |
|---------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | I | II | III | IV |
| 1 | $1,07 \cdot 10^{-3}$ | $1,16 \cdot 10^{-3}$ | — | — |
| 2 | $1,60 \cdot 10^{-3}$ | $1,55 \cdot 10^{-3}$ | $1,52 \cdot 10^{-3}$ | $1,56 \cdot 10^{-3}$ |
| 3 | $1,75 \cdot 10^{-3}$ | $1,62 \cdot 10^{-3}$ | $1,60 \cdot 10^{-3}$ | $1,67 \cdot 10^{-3}$ |
| 4 | $2,54 \cdot 10^{-3}$ | $2,61 \cdot 10^{-3}$ | $2,62 \cdot 10^{-3}$ | $2,56 \cdot 10^{-3}$ |
| 5 | $3,56 \cdot 10^{-3}$ | $3,84 \cdot 10^{-3}$ | $3,60 \cdot 10^{-3}$ | $3,74 \cdot 10^{-3}$ |
| 6 | $0,70 \cdot 10^{-3}$ | $0,67 \cdot 10^{-3}$ | $0,70 \cdot 10^{-3}$ | $0,70 \cdot 10^{-3}$ |
| 7 | $0,35 \cdot 10^{-3}$ | $0,33 \cdot 10^{-3}$ | $0,35 \cdot 10^{-3}$ | $0,36 \cdot 10^{-3}$ |

3) Consumo de O_2 como resultado de la acción de los nitrificadores y reducción del ión SO_4^{--} a S^{--} con precipitación del Fe como SFe .

CONCLUSIONES

- 1) El método utilizado se demuestra conveniente para la determinación de trazas de hierro en la solución del suelo de un cultivo de arroz bajo inundación.
- 2) Las determinaciones cuantitativas realizadas dieron resultados del orden de 10^{-3} ppm y dentro de los mismos es posible detectar diferencias significativas entre las variables.
- 3) En presencia de superfosfato de calcio, la incorporación de sulfato de amonio y la inoculación con nitrificadores o la acción de los propios nitrificadores existentes en el suelo utilizado, generan las condiciones donde se obtienen los máximos valores de hierro soluble.

AGRADECIMIENTO

Los autores quieren dejar expresa constancia de su agradecimiento al Profesor Adjunto Roberto De Francesco por la interpretación estadística de los datos de este ensayo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Alimarin, I. P. and Bilimovitz, G. V. - 1960 - The isotopic dilution method and its application to analysis of inorganic systems. *Int. J. Appl. Rad. Isotopes*, 7, 169.
- 2) Hevesy, G.V. y Hobbie, R. - 1932 - Uber die Ermittlung des Blei ehaltes von Gestein. *Z. Analyst. Chem.*, 88, 1.
- 3) Keston, A. S., Underfriend, S. and Canaan, R. K. - 1949 - A method for determination of organic compounds in the form of isotopic derivatives. *J. Amer. Chem. Soc.*, 71, 249.
- 4) Landgrebe, A.R., Mc Clendon, L.T. and Devoe, J.R. - 1964 - Substoichiometric radiometric analysis: determination of trace amounts of cobalt. *Radiochem. Method of Analysis, Proc. of Symp.*, Salzburg, Vol. II.
- 5) Mayor, A.H. and Collins, C.J. - 1951 - Use of double dilution for the simultaneous determination of yield and activity of radioactive compounds. *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 471.
- 6) Merzari, A. H. and Broeshart, H. - 1968 - The utilization by rice of nitrogen from ammonium fertilizers as affected by fertilizer placement and microbiological activity. *Isotopes Studies on the Nitrogen Chain, Proc. of Symp.*, IAEA, Vienna, Austria, 79-87.
- 7) Merzari, A.H. y Carpio, D. - 1971 - Uso del ^{15}N , ^{32}P y ^{59}Fe en estudios relacionados con la influencia de la inoculación con nitrificadores en cultivos de arroz en sumergencia. II Congr. Arg. Biol. Medic. Nuclear, San Martín de los Andes, Argentina. (Inédito).
- 8) Merzari, A.H., Mársico, A.D. y Carpio, D. - 1975 - Modificación del potencial redox en un cultivo de arroz en sumergencia inoculado con nitrificadores. *Anales Soc. Cient. Arg.*, T. CC, Entregas I-VI, 43-48.
- 9) Merzari, A.H. y Carpio, D. - 1979 - Influencia de la inoculación con nitrificadores en un cultivo de arroz bajo sumergencia. III, Relación del rendimiento en materia seca con las determinaciones de hierro y ácidos grasos volátiles en la solución del suelo. *Actas III Reunión Nac. Fertil. y Fertiliz.* 28 nov. - 1º dic., 1977, Buenos Aires.
- 10) Ponnampuruma, F.N. - 1955 - The chemistry of submerged soils in relation to the growth and yield of rice. Thesis, Cornell Univ.
- 11) Ruzicka, J. and Sary, J. - 1961 - Isotopic dilution analysis by solvent extraction. III. Highly selective determination of trace amounts of mercury. *Talanta*, 8, 535.
- 12) Ruzicka, J. and Sary, J. - 1964a - Isotopic dilution analysis by ion exchange. II. Substoichiometric determination of traces of indium. *Talanta*, 11, 691.
- 13) Ruzicka, J. and Sary, J. 1964b - Substoichiometric in radiochemical analysis. *Atomic Energy Review*, 2 (4). IAEA, Vienna, Austria.
- 14) Starik, I.E. - 1933 - *Probl. sovietic. Geol.*, 3, 70. Citado por J. Ruzicka and J. Sary en Substoichiometric in radiochemical analysis, 1964b.
- 15) Suzuki, N. - 1959 - Determination of silver in plant materials by quantitative isotopic dilution analysis. *Nippon Kagaku Zasshi*, 80, 370. Citado por Ruzicka y Sary, 1964b.
- 16) Van Raalte, M.H. - 1941 - On the oxygen supply of rice roots. *Ann. Bot. Gdn. Buitenz.*, 51(1), 43-57.
- 17) Yoshida, T.H. and Ancajas, R. - 1973 - Nitrogen-fixing activity in upland and flooded rice fields. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 37, 42-46.
- 18) Zimakov, I.E. and Rozhauski, G.S. - 1958 - Determination of small amounts of impurities by multiple isotopic dilution. *Trudy Kom. Analit. Him. Akad. Nauk.*, S.S.S.R., 9 (12), 231. Citado por Ruzicka and Sary (1964b).