

Agrovoc descriptors: soil, nitrogen, nitrogen content, soil chemistry, soil fertility, fertilizer application soil testing, analytical methods, chemical composition

Agris category code: P33, P35, F04

Kmetijski inštitut Slovenije
Centralni laboratorij

COBISS koda 1.02

Vpeljava in ovrednotenje metode določevanja mineralnega dušika v tleh

Veronika KMECL¹, Lucija ZUPANČIČ-KRALJ²

Delo je prispelo 27. decembra 2004; sprejeto 12. maja 2005

Received: December 27, 2004; accepted : May 12, 2005

IZVLEČEK

Ugotavljanje vsebnosti anorganskega oz. mineralnega dušika (N_{min}), ki ga ekstrahiramo iz zemlje z 0,01 M razt. $CaCl_2$, omogoča izboljšanje napovedovanja gnojenja z dušikom. V ta namen smo razvili analitske metode določevanja amonijevih, nitratnih in nitritnih ionov v zemlji. Metode smo verificirali; določili smo točnost, natančnost, mejo zaznavnosti (LOD) in mejo kvantitativne določitve (LOQ). Točnost meritev smo dokazali z uspešnim sodelovanjem laboratorija v mednarodni medlaboratorijski primerjalni shemi WEPAL (Wageningen Evaluating Programme for Analytical Laboratories, Nizozemska). Natančnost meritev (ponovljivost in obnovljivost) smo izrazili z relativnim standardnim odklikom (RSD), ki je bil v vseh primerih pod 2%. Vrednosti LOD in LOQ za nitratni dušik sta bili 0,05 mg/kg oz. 0,18 mg/kg in za amonijski dušik 0,09 mg/kg oz. 0,31 mg/kg.

Ključne besede: mineralni dušik (N_{min}), analize tal, segmentirani pretočni analizator, ovrednotenje.

ABSTRACT

INTRODUCTION AND VERIFICATION OF METHODS USED FOR DETERMINATION OF MINERAL NITROGEN IN SOIL

Determination of inorganic or mineral nitrogen content (N_{min}), extracted from the soil with the 0.01 M $CaCl_2$ solution, enables improvements of fertilization recommendations with nitrogen. For this purpose we have developed analytical methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite ions in the soil. The methods were verified; trueness, precision, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined. The trueness of measurements was proofed by successful participation of our laboratory in the international interlaboratory exchange programme WEPAL (Wageningen Evaluating Programme for Analytical Laboratories, Netherland). The precision of measurements (repeatability and

¹ mag., univ. dipl. inž. kem., Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

² prof., dr., univ. dipl. kem., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Aškerčeva 5, SI-1000 Ljubljana,

reproducibility) was expressed as relative standard deviation (RSD) which was under 2% in all cases. The values of LOD and LOQ were 0,05 mg/kg and 0,18 mg/kg respectively for nitrate nitrogen and 0,09 mg/kg or 0,31 mg/kg for ammonium nitrogen.

Key words: mineral nitrogen (N_{min}), soil analyses, segmented flow analyser, verification

1 UVOD

Dušik v tleh se nahaja v različnih kemijskih oblikah. Zelo grobo se deli v organski in anorganski dušik. Skoraj 95% vsega dušika v tleh je vezanega v razne organske kemijske spojine v rastlinski ali živalski biomasi. Anorganski dušik oz. mineralni dušik (NO₂⁻-N, NO₃⁻-N, NH₄⁺-N) zajema le majhen delež celotnega dušika v zemlji (približno 1-2%) (Wilson in sod., 1999). Okoljevarstveni vidiki izpiranja mineralnega dušika iz zemlje, kot tudi pomembnost amonijevih in nitratnih ionov v prehrani rastlin so vzpodbudili številne raziskovalce k študijam anorganskega oz. mineralnega dušika (N_{min}) v tleh (Groot in Houba, 1995, Harper, 1984, Mengel, 1985, Scharph in Wehrmann, 1975).

Poraba dušika je zaradi nestrokovnega gnojenja marsikdaj nesmotrna. Včasih poljščine gnojijo z večjo količino dušika, kot ga zares potrebujejo. Velik del tega dušika je mobilan v zemlji (NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻) in se lahko prenese v podtalnico, kar lahko pomeni onesnaženje pitne vode ali pa večjo vsebnost dušika v pridelkih. Po drugi strani pa lahko popolna opustitev mineralnega gnojenja z dušikom že v prvem letu zmanjša pridelek. Zato je poznavanje vsebnosti dušika v tleh pomembno.

V več letnih poskusih smo na Kmetijskem inštitutu Slovenije ugotavljali vpliv dušika v zemlji na rast poljščin (Briški in sod., 1996, Sušin in sod. 1999). V ta namen smo vpeljali in ovrednotili metode določevanja mineralnega oz. anorganskega dušika v tleh.

2 METODE DELA IN MATERIALI

2.1 Priprava vzorca

Vse vzorce zemlje, ki smo jih analizirali, smo homogenizirali, nato pa v približno 300 ml plastične steklenice zatehtali 50 g svežega vzorca, prelili z 200 ml 0,01 M razt. CaCl₂. Plastične steklenice z vzorcem smo stresali na stresalniku 1 uro. Ekstrakt smo filtrirali preko filter papirja (Schleicher & Schuell 589³). Preostanek je bila raztopina, ki smo jo analizirali (Hoffmann, 1991, Houba in sod., 1999).

Vsebnost anorganskega oz. mineralnega dušika v vzorcih smo ugotovili z merjenjem absorbanca na segmentiranem pretočnem analizatorju – SFA (Bran+Luebbe, Alfa Laval).

2.2 Določanje anorganskega oz. mineralnega dušika s segmentiranim pretočnim analizatorjem

2.2.1 Opis inštrumenta - segmentirani pretočni analizator (Segmented Flow Analyser)

Inštrument deluje na principu črpanja tekočine skozi sistem cevk, s točno določenim premerom. Tekočina, ki potuje skozi cevke, je zaradi boljše separacije dveh zaporednih vzorcev ter zaradi enakomernega pretoka skozi sistem, ločena z zračnimi mehurčki. Intenziteto barve, ki jo daje iskana komponenta v vzorcu s potrebnimi dodanimi reagenti, merimo fotometrično. Inštrument omogoča analizo serij vzorcev. Med dvema zaporednima vzorcema se sistem izpira z vodo; s tem preprečimo mešanje dveh vzorcev (Crompton, 1996).

Segmentirani pretočni analizator je sestavljen iz:

- ❖ avtomatskega vzorčevalnika
- ❖ peristaltične črpalke
- ❖ analitske enote
- ❖ detektorja (enokanalni fotometer, dvožarkovni princip)
- ❖ vmesnika
- ❖ računalnika

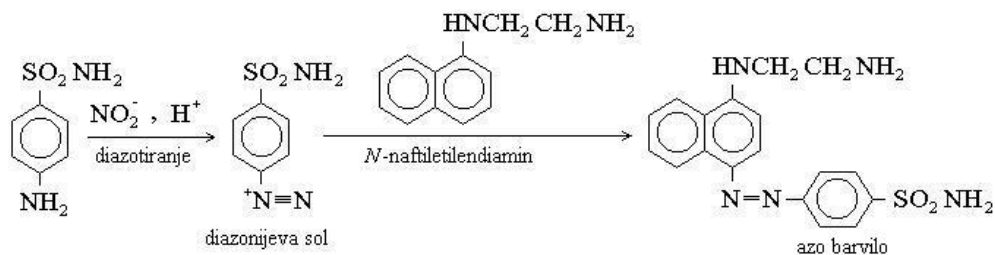
2.2.2 Določanje anorganskega oz. mineralnega dušika

2.2.2.1 Določanje nitratnega in nitritnega dušika

Princip:

Nitrat se reducira s hidrazinijevim sulfatom v nitrit. Nitrit določamo fotometrično s tvorbo rdečega azo-barvila. Poteče diazotiranje aminske skupine (-NH_2) na sulfanilamidu v prisotnosti nitritnega iona (NO_2^-) v kislem mediju. Nastala diazonijeva sol se veže na *N*-naftiletilen diamin (NEDD) na mesto 4, pri čemer nastane rdeče azo-barvilo, ki ima maksimalni absorpcijski vrh pri valovni dolžini 520 nm (ISO/DIS 14255).

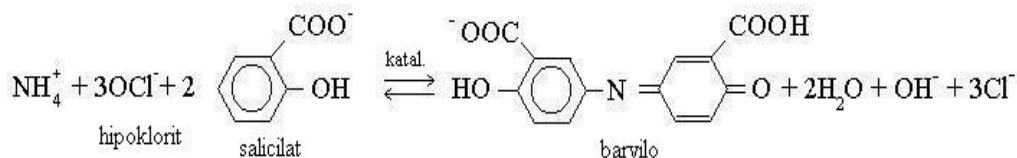
Rezultat je vsota nitratnega in nitritnega dušika. Če želimo izraziti samo nitratni dušik, moramo odšteti predhodno določeni nitritni dušik, ki pa je v zemlji v zanemarljivo majhni količini – pod mejo zaznavnosti (LOD).



2.2.2.2. Določanje amonijevega dušika

Princip:

Določanje amonijevega iona temelji na Berthelotovi reakciji, kjer tvori fenolni derivat (salicilat) v prisotnosti amonijevega iona in hipoklorita, z nitroprusidom kot katalizatorjem barvilo. V alkalnem mediju je nastali indofenolni derivat modro-zeleno obarvan in ima maksimalni absorpcijski vrh pri valovni dolžini 660 nm.

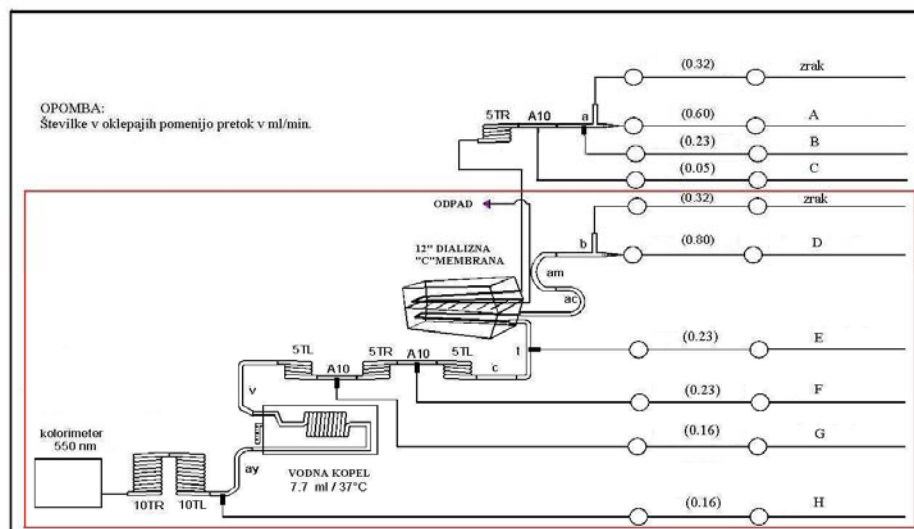


Mesto vstopa posameznih raztopin v analitsko enoto segmentiranega pretočnega analizatorja (SFA) in procesno shemo za določanje nitratnega, nitritnega in amonijevega dušika prikazujeta preglednica 1 in slika 1.

Preglednica 1: Mesto vstopa raztopin v analitsko enoto segmentiranega pretočnega analizatorja pri določanju NO_3^- -N, NO_2^- -N in NH_4^+ -N

Table 1: The entrance of the solutions into SFA - analytical chamber (determination of NO_3^- -N, NO_2^- -N in NH_4^+ -N)

Cevka	A	B	C	D	E	F	G	H	Filter
Pretok ml/min	0.6	0.23	0.05	0.8	0.23	0.23	0.16	0.16	
NO_3^- -N 0-2 (mg/l)	brij	brij	brij	puffer (NH_4Cl)	brij	vzorec	hidrazin sulfat	sulfani lamid/ NEDD	520 nm
NO_2^- -N 0-2 (mg/l)	brij	brij	brij	brij	brij	vzorec	brij	sulfani lamid/ NEDD	520 nm
NH_4^+ -N 0.2 - 10 (mg/l)	vzorec	puffer (citrat)	puffer (citrat)	puffer (citrat)	brij	hipokl.	salicilat	brij	660 nm



Slika 1: Procesna shema za določanje NO_3^- -N, NO_2^- -N in NH_4^+ -N s SFA tehniko
Figure 1: Flow diagram for determination of NO_3^- -N, NO_2^- -N and NH_4^+ -N by SFA

2.3 Ovrednotenje analitskih metod

Ovrednotenje metod določanja mineralnega dušika smo opravili na vzorcu tal, ki smo ga posušili pri $T = 40^\circ\text{C}$, nato pa presejali skozi 5 milimetrsko sito. Ovrednotili smo metodo za

določanje nitratnega (NO_3^- -N) in amonijevega dušika (NH_4^+ -N). Vsebnost nitritnega dušika (NO_2^- -N) je v zemlji v zanemarljivo majhni količini - pod mejo zaznavnosti, zato te metode nismo ovrednotili.

Ovrednotenje analitske metode zajema ugotavljanje točnosti, natančnosti (ponovljivost in obnovljivost meritev) ter mejo zaznavnosti (LOD) in mejo kvantitativne določitve (LOQ) (Miller in Miller, 1988).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Vpeljava in ovrednotenje metod za določanje mineralnega dušika v tleh

3.1.1. Vpeljava metod

Metode mineralnega dušika (NO_3^- -N, NO_2^- -N in NH_4^+ -N) smo vpeljali glede na standard »International Organisation for Standardisation - ISO/DIS 14255, Soil quality – determination of soluble nitrogen fractions».

3.1.2. Ovrednotenje metod

Točnost rezultatov analiz nitratnega in amonijevega dušika (NO_3^- -N in NH_4^+ -N) smo preverili z analizo vzorcev iz mednarodne medlaboratorijske primerjalne sheme WEPAL (Wageningen Evaluating Programme for Analytical Laboratories, Nizozemska) (van Dijk in Houba, 2000).

Preglednica 2: Točnost rezultatov analiz NO_3^- -N in NH_4^+ -N

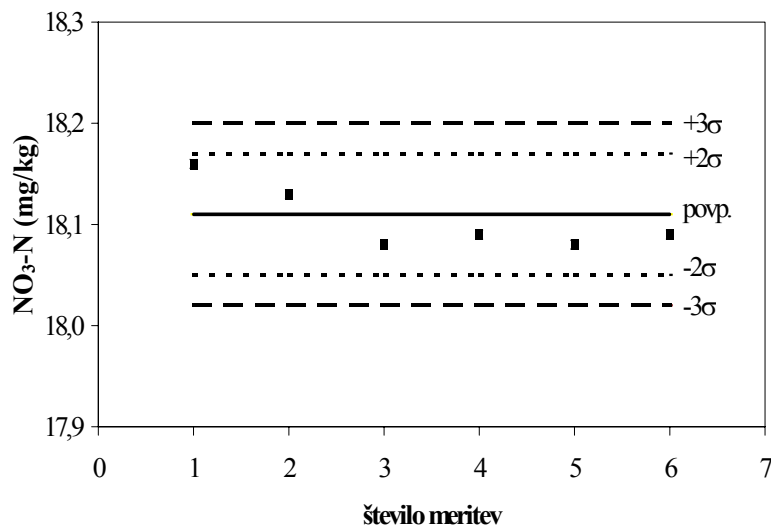
Table 2: The trueness of the results of NO_3^- -N and NH_4^+ -N

Mednarodna shema WEPAL (vzorec)	Povprečna vrednost (X) (mg NO_3^- -N/kg)	Standardni odmik (σ) (mg NO_3^- -N/kg)	X - 2 σ (mg NO_3^- -N/kg)	Rezultat KIS (mg NO_3^- -N/kg)	X + 2 σ (mg NO_3^- -N/kg)	Točnost analize
1	5,4	0,2	4,9	5,6	5,8	DA
2	1,3	0,6	0,0	1,3	2,6	DA
3	57	2,8	51	58	63	DA
4	8,0	0,5	6,9	7,7	9,1	DA
5	4,8	0,2	4,3	5,0	5,3	DA
6	56	0,4	55	56	57	DA
7	4,7	0,7	3,2	4,4	6,2	DA
8	6,2	1,1	4,0	5,6	8,5	DA

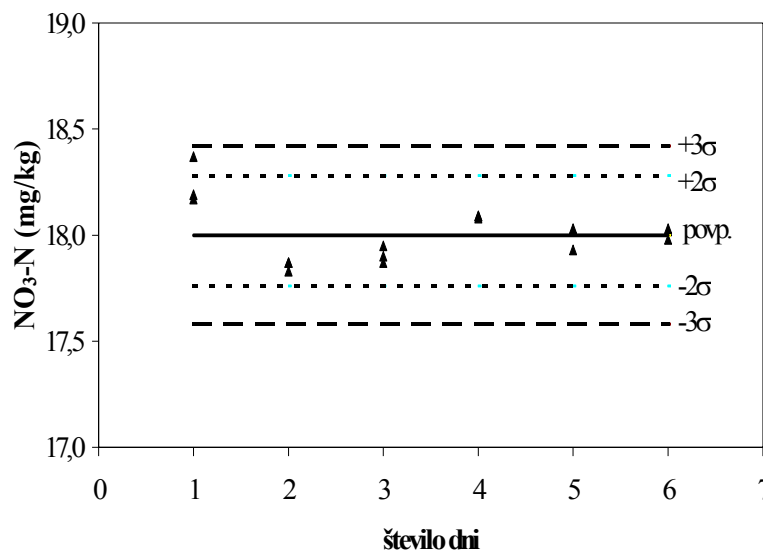
Mednarodna shema WEPAL (vzorec)	Povprečna vrednost (X) (mg NH_4^+ -N/kg)	Standardni odmik (σ) (mg NH_4^+ -N/kg)	X - 2 σ (mg NH_4^+ -N/kg)	Rezultat KIS (mg NH_4^+ -N/kg)	X + 2 σ (mg NH_4^+ -N/kg)	Točnost analize
1	30,5	8,61	13,3	24,3	47,7	DA
2	21,9	2,86	16,2	19,0	27,6	DA
3	8,03	1,14	5,75	7,85	10,3	DA
4	3,73	1,44	0,85	6,16	6,61	DA
5	92,3	12,8	66,7	102	117,9	DA
6	4,78	0,86	3,06	4,18	6,50	DA
7	2,72	1,13	0,46	2,16	4,98	DA
8	10,2	1,80	6,62	12,8	13,8	DA

Vse analizirane vrednosti so bile v okviru dveh standardnih odklovov (2σ) glede na povprečno vrednost meritev (\bar{X}) vseh sodelujočih laboratorijev. S tem smo potrdili točnost naših analiz.

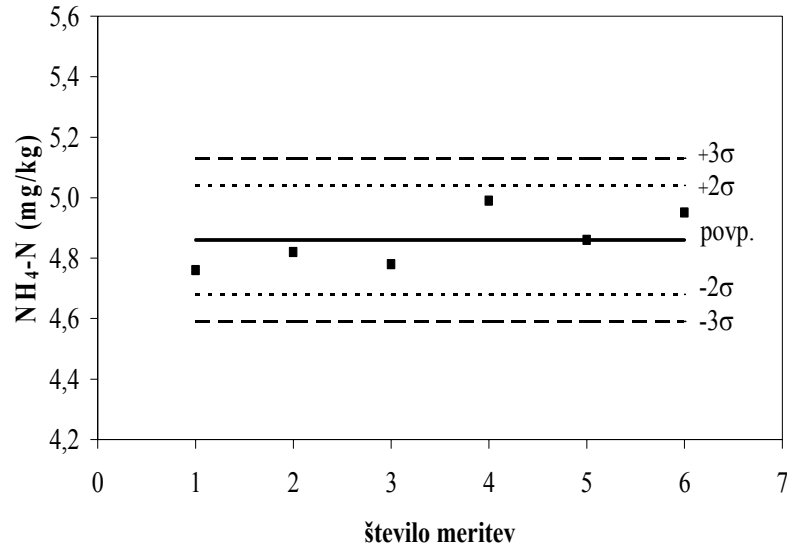
Za določitev *natančnosti* metod (ponovljivosti in obnovljivost meritev) smo analizirali posušeni in homogenizirani vzorec zemlje. Ponorljivost smo preverili z analizo homogeniziranega vzorca zemlje v šestih ponovitvah, analiziranih v enem dnevu (slika 2, 4). Obnovljivost smo preverili z analizo vzorca v treh ponovitvah, ki smo jih analizirali šest dni zaporedoma (slika 3, 5).



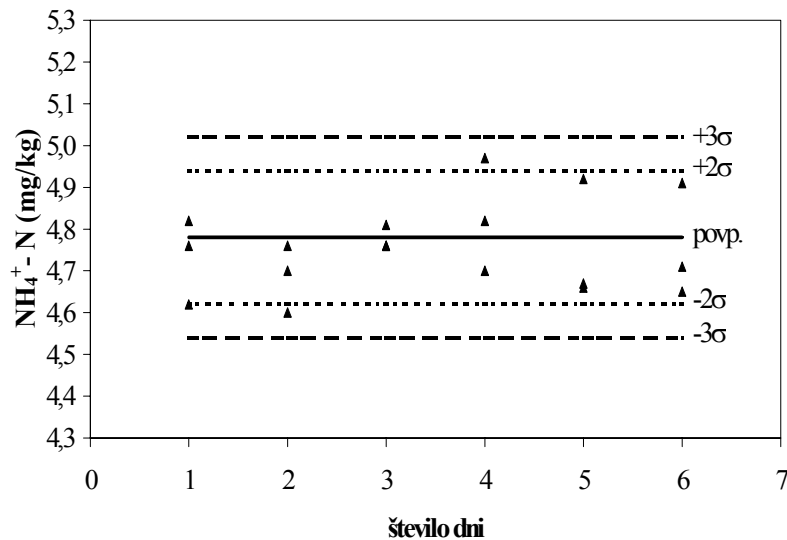
Slika 2: Ponorljivost meritev (metoda določanja NO₃⁻-N v zemlji)
Figure 2: Repeatability of the results (determination of NO₃⁻-N in soil)



Slika 3: Obnovljivost meritev (metoda določanja NO₃⁻-N v zemlji)
Figure 3: Reproducibility of the results (determination of NO₃⁻-N in soil)



Slika 4: Ponovljivost meritev (metoda določanja NH₄⁺-N v zemlji)
 Figure 4: Repeatability of the results (determination of NH₄⁺-N in soil)



Slika 5: Obnovljivost meritev (metoda določanja NH₄⁺-N v zemlji)
 Figure 5: Reproducibility of the results (determination of NH₄⁺-N in soil)

Ponovljivost in obnovljivost meritev smo izrazili s standardnim odmikom (SD) in relativnim standardnim odmikom (RSD). Ponovljivost meritev smo pri metodi določevanja nitratnega dušika določili s SD=0,03 mg/kg oz. RSD=0,2% in pri metodi določevanja amonijevega dušika s SD=0,09 mg/kg oz. RSD=1,9%,

Obnovljivost meritev pa smo pri metodi nitratnega dušika določili s $SD=0,14$ mg/kg in $RSD=0,8\%$ ter pri metodi za določanje amonijevega dušika s $SD=0,08$ mg/kg in $RSD=1,7\%$.

Mejo zaznavnosti (LOD) in mejo kvantitativne določitve (LOQ) smo za obe metodi določili po definiciji za izračun teh dveh parametrov (Miller in Miller, 1988):

V območju od 0-2 mg NO_3^- -N/l in 0-2 mg NH_4^+ -N/l smo naredili umeritveno krivuljo. V obeh primerih je bil korelacijski koeficient 0,9996, kar potrjuje visoko stopnjo linearnosti v koncentracijskem območju od 0-2 mg/l. Zato smo lahko to premico uporabili za umeritveno krivuljo pri določanju LOD in LOQ. Za izračun LOD smo analizirali raztopino z najnižjo možno koncentracijo, ki je dala signal, različen od 0. To je bila koncentracija slepega vzorca. Vzorec smo analizirali v desetih ponovitvah.

Izračunali smo LOD in LOQ na način:

$$LOD = 3 \cdot s_{sl}$$

$$LOQ = 10 \cdot s_{sl}$$

s_{sl} ...standardni odmik 10 meritev slepega vzorca

Izračunane vrednosti LOD in LOQ so naslednje:

$$NO_3^- -N: LOD = 0,05 \text{ mg/kg}_{zemlje}, LOQ = 0,18 \text{ mg/kg}_{zemlje}$$

$$NH_4^+ -N: LOD = 0,09 \text{ mg/kg}_{zemlje}, LOQ = 0,31 \text{ mg/kg}_{zemlje}$$

4 ZAKLJUČKI

Na Kmetijskem inštitutu Slovenije smo v okviru raziskovalnih projektov ugotavljali vpliv mineralnega dušika (Nmin) v zemlji na rast poljščin. V ta namen smo vpeljali analitske metode za določanje nitratnega, nitritnega ter amonijevega dušika, izmenljivega v 0,01 M $CaCl_2$. Metode smo vpeljali na segmentirani pretočni analizator (SFA – Segmented Flow Analyser, Alfa Laval, Bran + Luebbe).

Analitske metode za določanje nitratnega (NO_3^- -N) in amonijevega (NH_4^+ -N) dušika smo ovrednotili (vsebnost nitrita je v tleh zanemarljiva – pod mejo zaznavnosti, zato metode za določanje nitritnega dušika v zemlji nismo ovrednotili). Z ovrednotenjem vpeljanih metod smo preverili točnost in natančnost (ponovljivost in obnovljivost) metod ter mejo zaznavnosti (LOD) in mejo kvantitativne določitve (LOQ). Vrednosti dobljenih parametrov prikazuje preglednica 3.

Preglednica 3: Ovrednotenje analitskih metod s statističnimi parametri: povprečna vrednost, natančnost (ponovljivost in obnovljivost meritev), meja zaznavnosti in meja kvantitativne določitve.

Table 3: Verification of analytical methods with parameters: average, repeatability, reproducibility, LOD, LOQ.

	NO_3^- -N	NH_4^+ -N
Povprečna vrednost, mg/kg	18,04	4,84
Ponovljivost (RSD), %	0,2	1,9
Obnovljivost (RSD), %	0,8	1,7
Meja zaznavnosti (LOD), mg/kg	0,05	0,09
Meja kvantitativne določitve (LOQ), mg/kg	0,18	0,31

Točnost meritev smo dokazali z uspešnim sodelovanjem v mednarodni medlaboratorijski primerjalni shemi WEPAL.

5 LITERATURA

- Briški, L., Gregorčič, A., Kmecl, V. 1996. Gnojenje poljščin z dušikom na podlagi meritev mineralnega dušika v tleh. Zbornik predavanj. Posvet: Dušik-naravovarstvena paradigma. ZTI, Ljubljana, 28.-29.3.1996, s. 107-118.
- Crompton, T. R. 1996. Determination of anions. A guide for the analytical chemist, Springer-Verlag, Berlin
- van Dijk D., Houba V.J.G. 2000. Interlaboratory analytical Studies and their Evaluation. Wageningen Agricultural University, 39 s.
- Groot J.J.R., Houba V.J.G. 1995. A comparison of different indices for nitrogen mineralization. *Biology and Fertility of Soils*, 19, 1-9.
- Harper J.E. 1984. Nitrogen in crop production. R.D.Hauck (ed.), ASA, CSSA, SSSA, Madison, 165 s.
- Hoffmann G. 1991. Die Untersuchung von Boden. Methodenbuch, Band 1, VDLUFA - Verlag, Darmstadt, 316 s.
- Houba V.J.G., Temminghoff E.J.M., Gaikhorst G.A., van Wark W. 1999. Soil analysis procedures, Extractions with 0,01 M CaCl₂. Wageningen Agricultural University, 95 s.
- International Organisation for Standardisation (ISO). 1995. ISO/DIS 14255, Soil quality – determination of soluble nitrogen fractions, Geneva.
- Mengel K. 1985. Dynamics and availability of major nutrients in soils. *Adv.Soil Sci.*, 2, 65-131.
- Miller J.C., Miller J.N. 1988. Statistics for analytical chemistry, Second edition. Ellis Horwood limited, West Sussex, 245 s.
- Scharph, H.C., Wehrmann, J. 1975. Die Bedeutung des Mineralstickstoffvorrates des Bodens zu Vegetationsbeginn für die N-Düngung zu Winterweizen. *Landw. Forsch.*, 32/I, sw. 100-114.
- Sušin J., Kmecl V., Žnidaršič-Pongrac V., Resnik M. 1999. Gnojilni poskus z dušikom v koruzi v letih 1997-1999. Nasveti svetovalcev celjske in koroške regije. Kmetijska svetovalna služba Slovenije, 4, 23-28.
- Wilson W.S., Ball A.S. 1999. Managing risk of nitrates to humans and the environment. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 347 s.