

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE ÁCIDOS HÚMICOS Y SU EFECTO EN EL CULTIVO DE *Tagetes erecta* L. EN UN SUELO AFECTADO POR SALES

Structural Characteristics of Humic Acids and their Effect on *Tagetes erecta* L. in a Salts Affected Soil

Martha E. González-Salgado^{1†}, Norma E. García-Calderón¹ y Gonzalo Almendros²

RESUMEN

Los ácidos húmicos (AH) extraídos de la composta y del suelo de chinampa de 4 tratamientos seleccionados de las parcelas donde se estableció un cultivo de zempasúchil (*Tagetes erecta* L.), se caracterizaron con el objetivo de explicar su efecto mejorador a través de su análisis por espectroscopía visible, espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y por electroforesis. En el suelo de cada uno de los tratamientos se obtuvieron las curvas de mineralización del carbono como un índice para estimar la estabilidad de la materia orgánica. Los resultados mostraron que la mayor condensación de la materia orgánica del suelo (MOS) correspondió al tratamiento control, seguidos por el tratamiento AH (240 mg kg⁻¹), tratamiento con composta (120 mg kg⁻¹) y tratamiento con ácido láctico (3.4 L m⁻²). Los espectros FTIR indicaron la presencia de formas poco alteradas de lignina, típicas en los AH de la composta, en los AH aislados de los suelos en que se obtuvieron altos rendimientos de la cosecha. En estos suelos, también dominaron características indicativas de AH poco evolucionados, de reciente formación, provenientes de la alteración sencilla de macromoléculas vegetales. La electroforesis mostró que los AH del suelo del tratamiento que produjo mayores rendimientos (H2C1M1) presentaron elevada movilidad iónica y en la espectroscopía visible, bajo grado de aromaticidad. Los espectros de los AH de los suelos mejorados indicaron bajo contenido en grupos funcionales oxigenados y presencia de proteína asociada, que explicarían los altos coeficientes de mineralización

observados en las curvas respirométricas, que indican el aporte de materiales prehúmicos de rápida evolución como un índice de su efecto mejorador en el desarrollo del zempasúchil.

Palabras clave: antrosoles, composta, mineralización del C, espectroscopía, rehabilitación.

SUMMARY

Humic acids (HA) isolated from the soil commonly known as *Chinampa soil* of 4 selected treatments and from the compost of plots that were cultivated with zempasuchil (*Tagetes erecta* L.) were characterized through visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and electrophoresis in an attempt to explain their positive effect on the plant yield. Carbon mineralization curves were obtained from the soil of each one the selected treatments as an index of organic matter stability. Results showed that the highest structural condensation of soil organic matter (SOM) was found in the control soil, followed by the treatments with HA (240 mg kg⁻¹), compost (120 mg kg⁻¹) and lactic acid (3.4 L m⁻²). The FTIR spectra indicated the presence of little altered forms of lignin, typical of the HAs isolated from the compost and also from the treated soils that produced the best plant yields. In these soils, the presence of indicative features of recently formed, immature HAs originating from the direct alteration of plant macromolecules was predominant. Electrophoresis showed that HA of the treatment resulting in the best yield (H2C1M1) had high ionic mobility, and the visible spectra showed a low degree of aromaticity. AH spectra from the amended soils showed a low content in functional oxygen groups and the presence of associated proteins, which could explain the high mineralization coefficients recorded in the respirometric curves. This suggests the improvement of the soil through readily biodegradable pre-humic material as an index of the amelioration in the production of zempasuchil.

¹ Laboratorio de Edafología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

[†] Autor responsable: (mgsalgado@yahoo.com)

² Centro de Ciencias Medioambientales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Serrano 115 B. 28006 Madrid, España.

Recibido: febrero de 2007. Aceptado: junio de 2009.

Publicado en Terra Latinoamericana 28: 27-33.

Index words: *anthrosols, compost, C mineralization, spectroscopy, rehabilitation.*

INTRODUCCIÓN

En la época prehispánica, los habitantes del área lacustre de la cuenca endorreica de México establecieron la zona chinampera de Xochimilco-Tláhuac a partir de técnicas tradicionales, formando suelos de origen antrópico con alta productividad. En la actualidad el riego de las chinampas con aguas residuales ricas en bases, que se concentran por capilaridad al evaporarse en los suelos, ha favorecido su contaminación salina o sódica salina, dando lugar a costras salinas, baja permeabilidad y acumulación de sales solubles hasta de 20 a 30 g kg⁻¹ (García, 1988; Huez *et al.*, 1989; Sánchez *et al.*, 2003), que se traducen en disminución en la producción de los cultivos. Por tal motivo, se ha propuesto el empleo de mejoradores orgánicos para incrementar la producción y la rehabilitación edáfica en cultivos redituables de la zona.

En un trabajo previo se estableció un diseño experimental trifactorial con distribución completamente al azar, para mejorar un suelo salino-sódico sometiendo a lixiviación controlada y tratamientos orgánicos: i) composta (C) obtenida a partir de residuos de eucalipto y estiércol de conejo, ii) AH extraídos de dicha composta y iii) un mejorador orgánico (M): ácido láctico industrial consiguiendo disminuir el efecto de la salinidad, sodicidad y elevar la productividad de parcelas cultivadas con zempasúchil en un Antrosol térrico salino sódico (González *et al.*, 2000).

Se propusieron como mejoradores los AH extraídos de esos tratamientos, por ser macromoléculas con intensa coloración oscura, de naturaleza coloidal y alta resistencia a la descomposición microbiana (Schnitzer y Khan, 1972). Su residencia media en el suelo de décadas hasta varios cientos de años y su caracterización molecular aporta datos de interés acerca de la calidad, estabilidad, fertilidad potencial y actividad fisicoquímica en los suelos (Schnitzer y Schuppli, 1989; Piccolo y Camiri, 1990; Stevenson, 1994). Los AH alcanzan tamaños moleculares de hasta 10⁶ Da, forman un sistema polidisperso con constituyentes mayoritarios aromáticos 20–60% y estructuras alquílicas lineales o ramificadas 10–40% (Almendros, 1994; Senesi *et al.*, 1989). Los AH presentan carácter anfílico y grupos funcionales carboxilos, hidroxilos fenólicos, alcohólicos y quinonas e interactúan con la matriz mineral favoreciendo

los procesos edáficos (Almendros, 1994; Schnitzer, 1978; Stevenson, 1994).

Con objeto de establecer posibles relaciones funcionales entre la estructura y el efecto de los AH aislados de la composta y del Antrosol térrico salino sódico, se comparon las características estructurales de los AH con la respuesta del zempasúchil a diferentes enmiendas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó material seleccionado de un experimento previo que se llevó a cabo en un Antrosol térrico salino sódico de Tláhuac (WRB, 1999), en un área de 700 m², a 19°16'06" latitud norte y 99°00'16" de longitud oeste, basado en un diseño experimental trifactorial, en parcelas al azar de 1.5 x 1.5 m separadas por franjas de 50 cm con cuatro repeticiones; cultivando zempasúchil (*Tagetes erecta* L.), resistente a la salinidad, para investigar el efecto de mejoradores con dosis que incrementaron la producción (Cuadro 1) (González *et al.*, 2000).

Se tomaron muestras de la capa arable del suelo de cada una de las repeticiones de cada tratamiento y del control. Se secaron al aire y se tamizaron por apertura 2 mm (malla 10). El carbono oxidable se valoró por el método de Walkley y Black (Jackson, 1982) y el nitrógeno por el método de Kjeldahl modificado (Page, 1982).

Mineralización del C de los Suelos

El proceso de mineralización del C en condiciones de laboratorio se basó en la incubación aeróbica en matraces Erlenmeyer de 250 mL de 25 g de suelo homogeneizado a 2 mm, a una humedad de 75% de la capacidad de campo, manteniéndolos en una cámara de cultivo a 30 °C. El desprendimiento de CO₂ de las muestras de suelo se midió conectando el tubo de salida a un analizador de gas Carmograph-12 (Wösthoff), mientras el tubo de entrada al matraz se conectó a una columna de cal sodada para permitir la renovación de la atmósfera del matraz mediante aire libre de CO₂. Las mediciones se realizaron durante 19 días. La actividad respiratoria de los suelos se expresó en mg C 100 g de suelo⁻¹ (Almendros *et al.*, 1990).

Extracción y Purificación de los Ácidos Húmicos

Para la extracción y purificación de las fracciones orgánicas se aplicaron los métodos descritos por Dabin

Cuadro 1. Tratamientos y dosis aplicadas en el experimento del que proceden los ácidos húmicos (AH) para su caracterización espectroscópica.

Tratamientos	Dosis		
	AH	C	MI
	- - - - - Mg ha ⁻¹	- - - - -	L m ⁻²
H0C0M0 [†]	0	0	0
H1C2M1	H1 = 120	C2 = 90	3.4
H2C1M0	H2 = 240	C1 = 60	0
H2C1M1	H2 = 240	C1 = 60	3.4

[†] = control, H1 = ácidos húmicos (AH) dosis mínima, H2 = dosis doble de ácidos húmicos, C1 = composta dosis sencilla, C2 = composta dosis doble, M1 = mejorador orgánico (ácido láctico).

(1971), Duchaufour y Jacquin (1975). Se van pesando 16 g de suelo (calculados para obtener en el extracto 1 g de carbono orgánico) y se agregaron 150 mL de ácido fosfórico 2M, agitando 5 minutos y centrifugando a 3 500 g durante 5 min. El sobrenadante se decantó sobre papel filtro tarado. El tratamiento se repitió tres veces. La fracción retenida en el papel filtro, correspondiente a la materia orgánica libre, se lavó con H₂O destilada, se desecó a 40 °C y se pesó. El residuo de esta primera separación (fracción pesada) fue sometido a tratamientos repetidos con Na₄P₂O₇ 0.1M (2 veces) y con NaOH 0.1M hasta la extracción total de las sustancias húmicas extraíbles. Se juntaron los extractos de los tratamientos sucesivos y se determinó su volumen. Para la cuantificación del contenido de C de los AH, se tomaron alícuotas de 50 mL del extracto. Del mismo extracto total (AH + AF) se separó una alícuota de 200 mL, la cual se acidificó con H₂SO₄ 1:1 v:v hasta pH 1.5. El extracto se dejó reposar una noche. Se centrifugó a 3 000 g obteniendo en el precipitado los AH, que se disolvieron a pH 12 (NaOH 0.5M) valorando el porcentaje de carbono por el método de Walkley y Black (Jackson, 1982). El contenido en C de AF se obtuvo por diferencia entre la concentración de AH y el contenido en C del extracto total anteriormente determinado.

Purificación de los AH

Los AH se purificaron, por redisolución en NaOH 1M, centrifugando la solución alcalina resultante a 12 000 g. Se decantaron los AH en solución y se acidificaron con HCl a pH 1.5, el precipitado se desmineralizó con la mezcla HCl-HF 1M durante 24 h

repitiéndose tres veces el tratamiento. Los AH obtenidos se lavaron en tubo de diálisis (Visking[®] Medicell # 6, 27/32) y se desecaron en cápsulas de porcelana a 40 °C (Almendros *et al.*, 1982; Stevenson, 1994).

Caracterización Espectroscópica de los AH

Los AHs purificados se estudiaron por las siguientes metodologías:

Electroforesis de los AH

Para el estudio de los AH por electroforesis se utilizó soporte de celulosa, una fuente de electroforesis Desaga y una cubeta Elphor. Añadiendo bórax (Na₂B₄O₇·10 H₂O, 9.54 g L⁻¹) como tampón. Se disolvieron 3 mg de cada muestra en NaOH 1M y se depositaron sobre tiras de papel Whatman #1 (Freifelder, 1991). En los electroforegramas se determinaron las áreas y la relación I/M (AH inmóviles/ AH móviles; Jambu, 1970; Jacquin *et al.*, 1970).

Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de los AH se obtuvieron en un espectrofotómetro Bruker IFS28 con transformada de Fourier a partir de pastillas preparadas con 3 mg de muestra de AH y 200 mg de KBr. Para ello, los AH se homogeneizaron en un mortero de ágata, y se desecaron a 105 °C durante 8 h. La frecuencia de adquisición de los espectros fue de 4000 a 400 cm⁻¹. Se realizaron mediciones de la intensidad de diferentes bandas correspondientes a los principales grupos funcionales de la molécula. Para facilitar el reconocimiento de patrones a partir de los espectros, se aplicó un procedimiento matemático para aumentar su resolución, basado en la sustracción digital del espectro original de un múltiplo positivo de su 2ª derivada (Rosenfeld y Avinash, 1982).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tratamientos seleccionados para la caracterización fueron estadísticamente diferentes al control (Figura 1), donde el peso seco de *Tagetes* se presenta como el principal parámetro de productividad por su uso comercial como pigmentos.

Los AH se aislaron de la composta (%C_{org.} = 17, N = 1.390, C/N = 12) y de los suelos de las parcelas

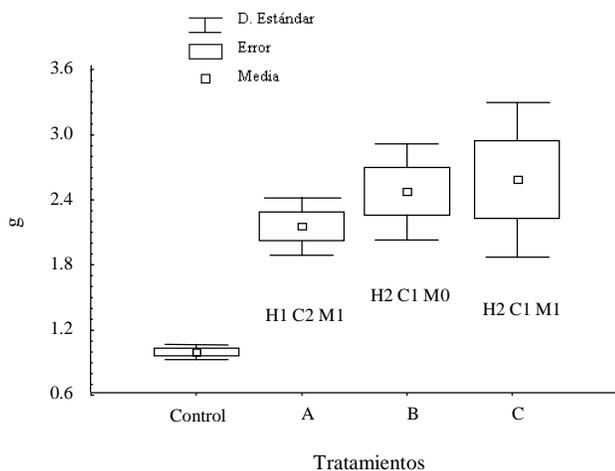


Figura 1. Comparación significativa de productividad del peso seco de las flores (*Tagetes erecta* L.). Se observa la diferencia significativa entre el tratamiento control y los mejores tratamientos: A = doble dosis de composta; B = doble dosis de ácidos húmicos; C = doble dosis de ácidos húmicos con mejorador, (Tukey $P = 0.05$) DMS = diferencia mínima significativa $n = 3$.

tratadas: control (%C = 6.5, N = 0.6, C/N = 11), con un rendimiento de extracción respectivamente de 18%.

Mineralización del C de los Suelos

En la Figura 2 se muestra como el desprendimiento de CO₂ a mineralizado fue mayor en los tratamientos mejorados que en el control. Se considera que la cinética de la mineralización del C es un índice de la actividad biológica, la distinta forma de las curvas de mineralización

está reflejando la progresiva liberación retardada de elementos originalmente inmovilizados en la materia orgánica. Es decir, al añadir las enmiendas orgánicas se incrementa y favorece la producción de CO₂, indicando una actividad biológica sostenida, que supera a partir del segundo día los valores registrados para el control (Almendros *et al.*, 1982; Saviozzi *et al.*, 1993; Álvarez y Álvarez, 2000; Riffaldi *et al.*, 2000).

La aplicación del ácido láctico como mejorador con las diferentes dosis de composta incrementaron positivamente la actividad microbiana favoreciendo la rehabilitación del suelo tratado, principalmente tras la aplicación de la dosis doble de AH2 = 240 mg kg⁻¹, en su triple interacción (H2C1M1) 240 mg, 120 mg y 3.4 L m⁻².

Espectroscopía Visible

Se ha presentado evidencia de que la intensidad del color de las sustancias húmicas está relacionada con su aromaticidad, y se incrementa con la madurez (Traina *et al.*, 1990). Los espectros visibles de los AH extraídos del suelo (Cuadro 2) muestran valores de extinción a 465 nm (E₄) para el Control (1.183) presentando valores más elevados, que los AH de la composta (1.102) utilizada como enmienda, indicando AH con mayor proporción de estructuras alifáticas en los AH de suelos mejorados con los diferentes tratamientos, que se refleja en los valores comparativamente más bajos de E₄ (1.165) H1C2M1, (0.917) H2C1M0 y (1.067) H2C1M1 (Schnitzer, 1978).

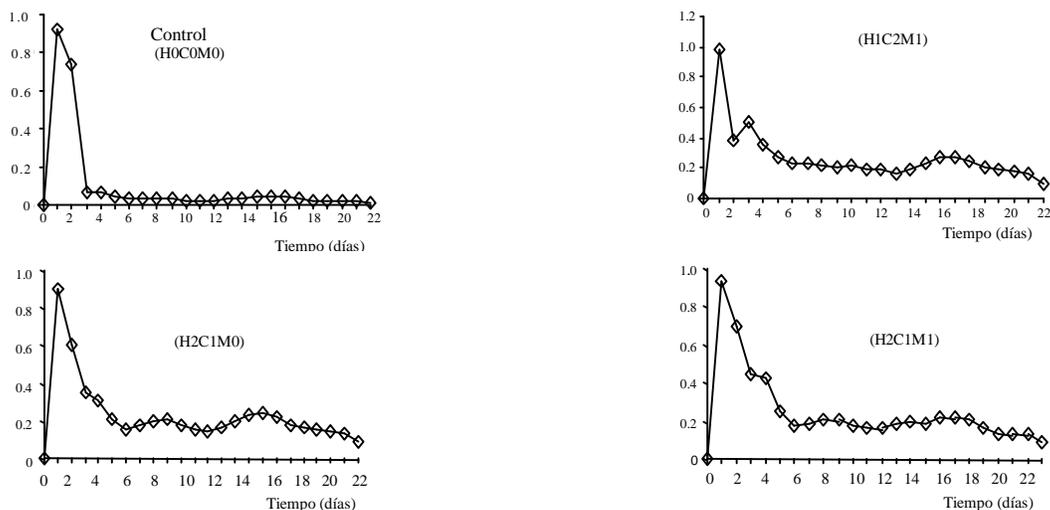


Figura 2. Curvas de producción de CO₂ en suelos control y suelos tratados con las enmiendas.

Cuadro 2. Parámetros en relación con los tamaños moleculares y aromaticidad de los ácidos húmicos obtenidos a partir de los electroforegramas.

Muestra	Fracción 1 (inmóvil)	Fracción 2 (intermedia)	Fracción 3 (móvil)	Inmóvil / móvil	E4 / E6 †	Tamaños moleculares aromaticidad
Composta	9.2	13.9	77.8	0.1	6.33	1.102
Control	18.0	41.5	40.4	0.4	2.76	1.183
H1C2M1	11.9	33.9	54.0	0.2	2.93	1.165
H2C1M0	12.6	34.9	53.8	0.2	3.04	0.917
H2C1M1	6.1	41.2	54.5	0.1	2.78	1.067

† = La relación E4/E6 es inversamente proporcional a la cantidad de estructuras alifáticas en el control con respecto a los tratamientos y a la composta.

Electroforesis

La electroforesis (Cuadro 2) permite obtener una idea de la movilidad iónica que se encuentra relacionada con el peso molecular, que en el caso de los AH, en ocasiones es considerada un índice relacionado con la calidad de humificación (Jambu, 1970; Jacquin *et al.*, 1970).

En la Figura 3, se aprecia la presencia de la proporción de macromoléculas poco evolucionadas de elevada movilidad electroforética en los AH extraídos de la composta en un 78%, que coincide con el elevado índice E4/E6 anteriormente indicado, que sugieren el bajo

grado de humificación de los AHs de la composta, en contraste con sus valores para el suelo control y los tratamientos (Dorado *et al.*, 1972).

En efecto, las curvas densitométricas correspondientes a los electroforegramas de los AH muestran de dos a cuatro fracciones más o menos definidas, donde pueden distinguirse en el control (Figura 3a) sustancias de alto peso molecular (fracción inmóvil) y de peso molecular comparativamente reducido (fracción móvil), quedando una apreciable proporción de AH con valores de movilidad intermedia.

Los resultados en la (Figura 3 a, b, c, d y Cuadro 2) muestran como los tamaños moleculares de los AH

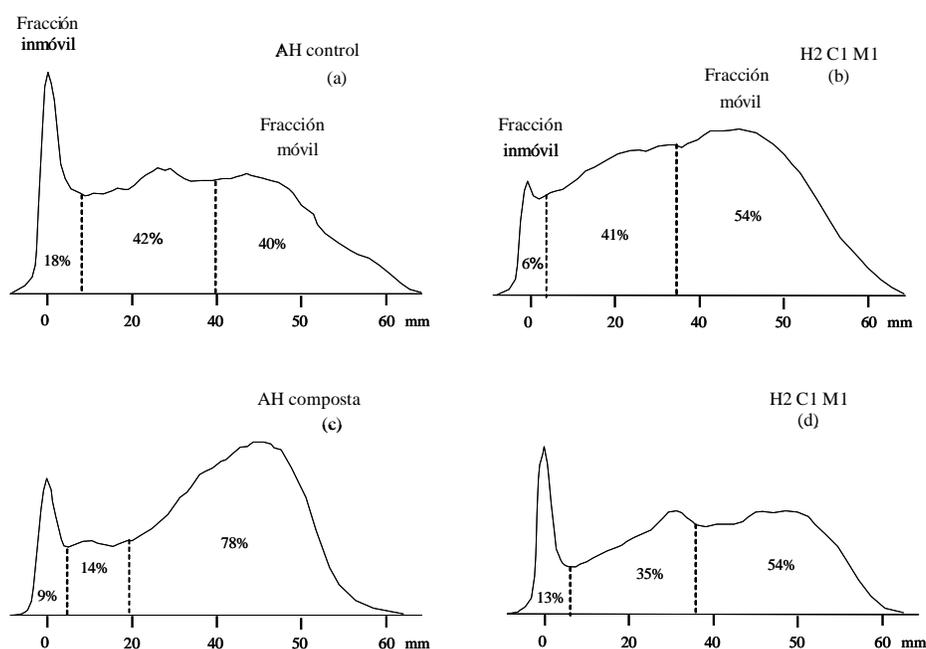


Figura 3. Electroforegrama de los ácidos húmicos extraídos de los suelos sometidos a distintos tratamientos.

extraídos de los suelos enmendados (13%) son superiores a los de la composta (9%) y menores al control (18%) en la fracción inmóvil de alto peso molecular, debido a que son moléculas poco evolucionadas y en la (Figura 3d) el peso molecular en los tratamientos de la fracción móvil (54%) se ve influenciado por la aplicación de la composta en (78%), que aumenta la movilidad indicando que, con independencia de lo duradero de su efecto en el suelo, las enmiendas orgánicas pueden aportar coloides de tamaño molecular moderado que ejercen una función significativa en el aumento de la mineralización del C y en su efecto amortiguador.

Espectroscopía IR

Los espectros FTIR de los AH extraídos de los suelos (control, y H1C2M1, H2C1M0, H2C1M1), no presentaron diferencias cualitativas sustanciales (Figura 4), en parte porque fueron extraídos de las parcelas del mismo suelo, a diferencia de los AH de la composta (Figura 4a). La comparación de los espectros sugiere diferencias en la intensidad de tres bandas características: 1720 cm^{-1} (COOH), 1560 cm^{-1} (N en forma de amidas; proteínas) y 1460 cm^{-1} (grupos alifáticos en cadenas alquílicas) y del patrón característico de picos típicos de ligninas a 1510, 1460,

1420, 1270 y 1230 cm^{-1} , que en el caso (Figura 4b) sugieren AHs de origen reciente y relativamente biodegradables (Fengel y Wegener, 1984; Farmer y Morrison, 1960).

Los espectros IR también presentaron una intensa banda a 1660 cm^{-1} correspondiente a proteínas, que coincide con la observación anterior. Las otras las bandas y sus intensidades se hacen patentes al aumentar la resolución del espectro a partir de la segunda derivada.

CONCLUSIONES

- El comportamiento de la materia orgánica del suelo, sugerido por las curvas de mineralización del C, mostró el aumento de la actividad biológica en los suelos mejorados por los distintos tratamientos.
- Los espectros visibles y la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) de los ácidos húmicos (AH), extraídos de los suelos tratados con las enmiendas en su mayor parte procedentes de ligninas, mostraron un contenido relativamente bajo de compuestos aromáticos en comparación con el suelo original.
- La electroforesis y la espectroscopía FTIR también sugieren que los tratamientos H2C1M0 y H2C1M1 conducen a la acumulación en el suelo de AH poco

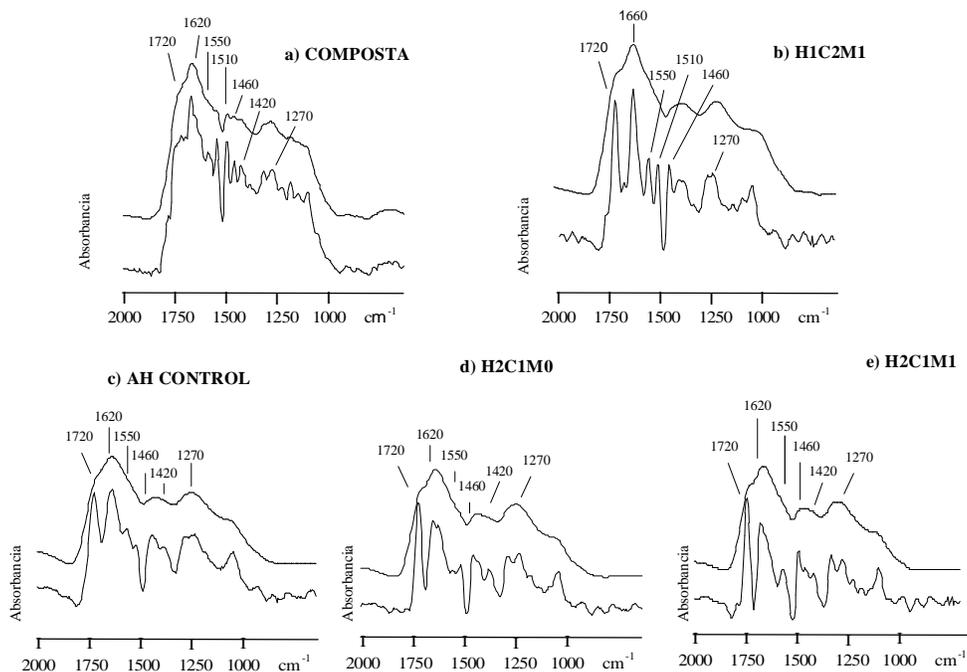


Figura 4. Espectros de infrarrojo de los ácidos húmicos se muestra el espectro mejorado en la parte inferior de cada uno.

evolucionados. Los tamaños moleculares elevados y la presencia de varios tipos de grupos reactivos, su alta biodegradabilidad y contenido en proteína, facilitarían la liberación progresiva de nutrimentos a la solución del suelo sugeridas por las cinéticas de mineralización del C en los experimentos de incubación. El conjunto de las características de los AH favorecieron la producción de las flores de zempasúchil en forma significativa.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México DGAPA, UNAM, por el apoyo económico para la estancia en el CSIC.

A la M. en C. Ma. del Socorro Galicia por su apoyo en el análisis de las sustancias húmicas. Laboratorio de Edafología Nicolás Aguilera UNAM.

LITERATURA CITADA

- Almendros, G. 1994. Effects of different chemical modifications on peat humic acid and their bearing on some agrobiological characteristics of soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 25: 2711-2736.
- Almendros G., A. Polo y E. Dorado. 1982. Fraccionamiento y caracterización de la materia orgánica de la turbera de Mazagón. *An. I.N.I.A. Ser. Agric. / N.* 18: 29-42.
- Almendros, G., F. G. González-Vila, and F. Martín. 1990. Fire-induced transformation of soil organic matter from an oak forest: an experimental approach to the effects of fire on humic substances. *Soil Sci.* 149: 159-168.
- Álvarez, R. and C. R. Álvarez. 2000. Soil organic matter pool and their associations with carbon mineralization kinetics. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64: 184-189.
- Dabin, B. 1971. Étude d'une méthode d'extraction de la matière humique du sol. *Sci. Sol.* 1: 47-63.
- Dorado, E., A. Polo y J. Del Río. 1972. Caracterización de los ácidos húmicos por electroforesis y gel filtración. *An. Edafol. Agrobiol.* 31: 693-718.
- Duchaufour, Ph. and F. Jacquin. 1975. Comparaison des processus d'humification dans les principaux types d'humus forestiers. *Bull. AFES.* 1: 29-6.
- Farmer, V. C., R. Morrison, I. 1960. Chemical and infrared studies on *Phragmites* peat and its humic acid. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.* 1: 85-104.
- Fengel, D. and G. Wegener. 1984. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter. Berlin, Germany.
- Freifelder, D. 1991. Técnicas de bioquímica y biología celular. Reverté, S. A. Barcelona, España.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, UNAM. México, D.F.
- González, S. M., N. E. García y M. Galicia. 2000. Evaluación del zempasúchil como producto de rehabilitación de un suelo salino sódico de Tláhuac. *La Edafología y sus Perspectivas al Siglo XXI. Tomo II. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, UNAM, UACH, México. D.F.*
- Huez, M. A., M. Ortega, C. Ramírez y J. L. Tone. 1989. Caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas de los suelos y espesores subyacentes del predio Montecillo. *Agrociencia* 78: 231-247.
- Jackson, M. L. 1982. Análisis químico de los suelos. Omega. Barcelona, España.
- Jacquin, F., C. Calvez, J. F. Dormaar y M. Metche. 1970. Contribution A l'étude des processus d'extraction et de caractérisation des composés humiques. *Bull. AFES* 4: 27-38.
- Jambu, P. 1970. Observation sur l'humification en milieu calcique hydromorphe. *Sci Sol.* 1: 67-89.
- Piccolo, A. and L. Camiri. 1990. A comparison of two methods for the determination of total acidity of humic substances. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 41: 65-69.
- Riffaldi, R., A. Saviozzi, and R. Levi-Minzi, 1996. Carbon mineralization kinetics as influenced by soil properties. *Biol. Fertil. Soils* 22: 293-298.
- Rosenfeld, A. and C. K. Avinash. 1982. Digital picture processing. 2nd edition. Academic Press. Orlando, FL, USA.
- Sánchez B., E., M. Ortega E., V. González H., G. Ruelas A., J. Kohashi S. y N. García C. 2003. Tolerancia de tubérculos de papa cv. Alpha en etapa de brotación a condiciones de salinidad. *Terra* 21: 481-491.
- Saviozzi, A., R. Levi-Minzi, and R. Riffaldi. 1993. Mineralization parameters from organic materials added to soil as function of their chemical composition. *Bioresour. Technol.* 45: 131-135.
- Schnitzer, M. 1978. Humic substances: chemistry and reactions. pp. 1-64. *In: Schnitzer, M. and S. U. Khan (eds.). Soil organic matter. Elsevier Science B. V. Amsterdam, The Netherlands.*
- Schnitzer, M. and S. U. Khan. 1972. Humic substances in the environment. Marcel Dekker. New York, NY, USA.
- Schnitzer, M. and P. Schuppli. 1989. Method for the sequential extraction of organic matter from soils and soil fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53: 1418-1424.
- Senesi, N., T. M. Miano, M. R. Provenzano, and G. Brunetti. 1989. Spectroscopic and compositional comparative characterization of IHSS reference and standard fulvic and humic acids of various origin. *Sci. Total Environ.* 81-82: 143-156.
- Stevenson, F. J. 1994. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. John Wiley and Sons Publisher. New York, NY, USA.
- Thomas, G. W. 1982. Exchangeable cations. pp. 160-165. *In: Page, A. L. (ed.). Methods of soil analysis; Part 2: Chemical and microbiological properties. 2nd. Ed. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America. Madison, WI, USA.*
- Traina, S. J., J. Novak, and N. E. Smeck, 1990. An ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids. *J. Environ. Qual.* 19: 151-153.
- WRB (World Reference Base). 1999. Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos No. 84. FAO-ISRIC, Roma, Italia.