

# EXTRACCIÓN SECUENCIAL Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE ÁCIDOS HÚMICOS DE DIFERENTES COMPOSTS Y SU EFECTO SOBRE EL CULTIVO DEL TRIGO

María D. Rodríguez Torres<sup>1</sup>, José Venegas González<sup>1</sup>, María V. Angoa Pérez<sup>1</sup>  
y José L. Montañez Soto<sup>1</sup>

## RESUMEN

Las sustancias húmicas (SH) contenidas en un compost, así como sus características fisicoquímicas, son responsables de su calidad y de la respuesta de los cultivos a sus aplicaciones. La extracción de SH con una sola agitación deja una cantidad considerable de estos compuestos en el sustrato, por lo que las extracciones secuenciales con diferentes reactivos separan las SH residuales, lo que resulta en una estimación más real de la calidad del compost. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la capacidad de extracción de sustancias húmicas de forma secuencial en cuatro diferentes composts, determinar los grupos funcionales y parámetros fisicoquímicos de los ácidos húmicos (AH) allí contenidos y evaluar sus efectos agronómicos sobre el cultivo del trigo. Se emplearon composts de rastrojo de maíz (RM), paja de trigo (PT), residuos de frutas (RF) y estiércol de bovino (EB). Se realizó la extracción secuencial con NaOH 0,5M, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1M y NaF 0,1M y se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de los AH obtenidos. Se lograron rendimientos de 21,7 % para el RM, 15,3 % para la PT, 19,6 % para el EB y 16,9 % para los RF. Las SH de los composts estudiados, mostraron diferencias ( $P \leq 0,05$ ) en sus propiedades, lo que reflejó su distinta constitución química. El rendimiento de la biomasa seca total de las plantas no se vio afectado por las diferentes dosis de AH aplicados al suelo ( $P > 0,05$ ) lo cual pudo deberse al corto tiempo que estuvo el cultivo bajo el efecto de estas sustancias.

**Palabras clave adicionales:** Sustancias húmicas, humificación, grupos funcionales, residuos orgánicos, materia orgánica del suelo

## ABSTRACT

### Sequential extraction and physicochemical characterization of humic acids of different composts and their effect on wheat

Humic substances (HS) in a compost, as well as their physicochemical characteristics, are responsible for their quality and the response of crops to their applications. The SH extraction by a single turmoil leaves a considerable amount of these compounds in the substrate, so the sequential extractions with different reagents can separate residual SH, resulting in a more realistic estimate of the quality of the compost. The objectives of this study were to assess the extraction capacity of HS in a sequential manner in four different composts, determine the functional groups and physico-chemical parameters of humic acids (HA), and evaluate their agronomic effects on wheat growth. Composts of maize stubble (MS), wheat straw (WS), fruit residues (FR) and cattle manure (CM), with six months of humification, were used. Sequential extraction was performed with 0.5 M NaOH, 0.1 M Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, and 0.1 M NaF, and assessed the physicochemical properties of the obtained HA. Extraction yields were 21.7 % for MS, 15.3 % for WS, 16.9 % for FR, and 19.6 % for CM. The SH of the studied composts, showed significant differences ( $P \leq 0,05$ ) in their properties, indicating different chemical constitution. Total dry biomass of wheat was not affected by the different doses of HA applied to the soil ( $P > 0,05$ ) which could be attributed to the short time that the crop was under the effect those substances.

**Additional key words:** Humic substances, humification, functional groups, organic residues, soil organic matter

## INTRODUCCIÓN

Los residuos sólidos orgánicos generados antropogénicamente se transforman en un foco de contaminación ambiental a través de la emisión de gases tipo invernadero (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O) que favorecen el cambio climático. El compostaje es

un proceso bio-oxidativo de los residuos orgánicos para producir compost, el cual es un producto que suministra nutrientes y grandes cantidades de sustancias húmicas al suelo (Chen y De Nobili, 2004). Por lo tanto, el llevar a cabo un proceso de compostaje ayuda a la reducción de la contaminación ocasionada por los residuos sólidos

Recibido: Junio 11, 2008

Aceptado: Junio 1, 2009

<sup>1</sup> Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable, CIIDIR-IPN Michoacán, Justo Sierra # 28, Jiquilpan, Michoacán, CP. 59510. e-mail: april\_8110@hotmail.com; jvenegasg@ipn.mx; vangoa@ipn.mx; jmontanez@ipn.mx

orgánicos, y la importancia de llevar a cabo la extracción de las sustancias húmicas puede reducir el uso de fertilizantes químicos sintéticos y por lo tanto la emisión de gases tipo invernadero.

Las sustancias húmicas tienen profundos efectos físicos, químicos y biológicos sobre el suelo, especialmente sobre aquellos que presentan malas condiciones físicas que dificultan la producción de cultivos, y pueden tener un efecto estimulante para el crecimiento de las plantas; además, influyen en la movilidad de compuestos orgánicos no iónicos como pesticidas y contaminantes removiéndolos de las soluciones acuosas, retienen los nutrientes por sus propiedades de intercambio catiónico y son fuente de N, P y S para las plantas (Stevenson, 1994; Popov, 2008).

El estudio de la composición y estructura química de las sustancias húmicas ha representado un problema que surge como una consecuencia de su naturaleza compleja y heterogénea, así como su gran diversidad molecular (Peña-Méndez et al., 2007). Por esto, es necesario investigar sobre su presencia en residuos sólidos, composición y usos.

Los objetivos de esta investigación fueron evaluar la capacidad de extracción de sustancias húmicas en composts, determinar los parámetros fisicoquímicos y grupos funcionales de los ácidos húmicos contenidos en los composts, y evaluar los efectos agronómicos sobre el cultivo del trigo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron los siguientes materiales sólidos orgánicos en el estado de Michoacán: a) rastrojo de maíz (RM) que se colectó en una finca de la comunidad de Cumuatillo del municipio de Venustiano Carranza, b) paja de trigo (PT), colectada en un predio de Jiquilpan, c) restos de fruta (RF), colectados en el mercado municipal de la ciudad de Jiquilpan, y d) estiércol de bovino (EB), colectado en un establo de la periferia de la ciudad de Jiquilpan.

Estos materiales se sometieron a un proceso de compostaje durante 180 días mediante una técnica de aireación pasiva con volteos periódicos, para airearlos, enfriarlos y humedecerlos. Este proceso se repitió periódicamente hasta obtener los composts maduros para la extracción de las sustancias húmicas.

La extracción se llevó a cabo con las

soluciones a base de NaOH 0,5N,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,1N y NaF 0,1N empleando el método propuesto por Kononova et al. (1966), secuenciando cada una de las soluciones. La primera extracción se llevó a cabo con NaOH al 0,5M empleando 2 g de compost seco, molido y tamizado por una malla de 1 mm. Se agregaron 40 mL de la solución extractante. La mezcla se agitó durante 24 h en un agitador con una velocidad de 180 oscilaciones por minuto. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min; la mezcla se decantó y el sobrenadante se conservó. La segunda extracción se realizó agregando 50 mL de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,1N al sedimento restante, dejándolo en agitación durante 24 horas después de lo cual se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. La tercera extracción se realizó agregando 50 mL de NaF 0,1N al sedimento restante dejándolo en agitación durante 24 horas después de lo cual se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. Las tres muestras sobrenadantes se mezclaron y se acidificaron hasta pH 2,0 con HCl; la mezcla se dejó en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Luego se procedió a separar los ácidos húmicos (sedimento) de los fúlvicos (sobrenadante).

La purificación de los ácidos húmicos fue llevada a cabo de acuerdo al método descrito por Sánchez-Monedero et al. (2002). Los AH fueron tratados con una solución de HCl-HF al 0,5% (5 mL de HCl y 5 mL de HF por litro) durante 36 horas. La suspensión fue centrifugada por 15 minutos a 2350 rpm y el sólido se lavó dos veces con HCl 0,1 M, después se lavó con agua destilada hasta quedar libre de cloruros (prueba del  $\text{AgNO}_3$ ) y finalmente los ácidos húmicos se liofilizaron para su caracterización fisicoquímica.

Para obtener las relaciones ópticas  $E_4/E_6$ , la absorbancia a 465 y 665 nm (Chen et al., 1977) fue medido usando un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis Lambda 2.

Se determinó el pH en una suspensión acuosa y en una de KCl 1,0 M, el  $\Delta\text{pH}$  se calculó con la diferencia de ambas lecturas. El contenido de C fue hecho por el método de Walkley y Black. Se determinó el contenido total de grupos funcionales (grupos carboxílicos, OH fenólicos y C=O totales) y la acidez total (Kononova et al., 1966). Para la determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) se usó una solución de acetato de bario 1,0 N por la técnica de Harada e Inoko

(1980). El contenido de N total se determinó mediante el método de Kjeldahl.

Como cultivo indicador de la respuesta de los tratamientos con ácidos húmicos se utilizó el trigo variedad Salamanca S 75 y se sembraron 10 semillas por contenedor en condiciones de invernadero. Se emplearon contenedores con 3 kg de suelo colectado en el municipio de Jiquilpan, Michoacán, caracterizado por su textura arcillosa, 24 mg·kg<sup>-1</sup> de materia orgánica, 1,0 mg·kg<sup>-1</sup> de nitrógeno, 16,4 mg·kg<sup>-1</sup> de fósforo, pH 6,9 y CIC de 38,6 cmol<sub>c</sub>·kg<sup>-1</sup>.

Los tratamientos se generaron con los AH extraídos de cada uno de los cuatro compost a las dosis de 100, 200, 400 y 800 mg·kg<sup>-1</sup> de suelo respectivamente, más un testigo, para un total de 17 tratamientos con tres repeticiones. La aplicación de los tratamientos al suelo se llevó a cabo al momento de la siembra. La primera y segunda aplicación foliares se realizaron a los 35 y 53 días después de la siembra, respectivamente. El experimento se condujo por 64 días durante los cuales se realizó el riego cada tercer día a capacidad de campo; las macetas

fueron cambiadas de lugar semanalmente de forma aleatorizada. Finalmente se evaluó la biomasa seca y el contenido de N por Kjeldahl.

A los resultados del contenido de SH, C, N, y grupos funcionales, E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>, ΔpH y CIC, así como a la producción de materia seca y contenido de N se les realizó análisis de varianza y prueba de medias según Tukey.

## RESULTADOS

Los porcentajes de ácidos húmicos obtenidos mediante la extracción secuencial fueron 21,7 % para el compost de RM, 15,3 % para el de PT, 16,9 % para el de RF y 19,6 % para el de EB. La solución con NaOH 0,5 N extrajo una mayor cantidad de AH de los composts de paja de trigo, residuos de frutas y estiércol de bovino respecto a las otras soluciones; únicamente en el caso del compost de rastrojo de maíz, la solución de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1 N superó a la de NaOH 0,5 N a pesar de que se utilizó en la segunda extracción. La solución de NaF 0,1 N tuvo los menores rendimientos (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Ácidos húmicos (AH) extraídos secuencialmente de diferentes composts

Compost	Contenido total de AH (%)	1ª Extracción NaOH 0,5 N (%)	2ª Extracción Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0,1 N (%)	3ª Extracción NaF 0,1 N (%)
RM	21,7	46,0 ± 0,56	49,3 ± 0,23	4,7 ± 0,79
PT	15,3	68,9 ± 2,76	27,0 ± 2,29	4,1 ± 0,48
RF	16,9	56,8 ± 4,88	36,6 ± 6,84	6,6 ± 1,97
EB	19,6	73,2 ± 2,10	23,3 ± 1,61	3,5 ± 0,08

RM: Compost de rastrojo de maíz; PT: Compost de paja de trigo; RF: Compost de residuos de frutas; EB: Compost de estiércol de bovino

Los AH de los composts de estiércol de bovino y paja de trigo tuvieron el mayor contenido de C presentando diferencias significativas con respecto a los AH de los composts de RF y RM (Cuadro 2). En cuanto al contenido de N los AH de los composts de residuos de frutas y estiércol de bovino fueron diferentes estadísticamente contra el contenido de N de los AH de paja de trigo y rastrojo de maíz. La acidez total de los AH del compost de residuos de frutas fue ligeramente mayor al de los AH del compost de estiércol de bovino; estos últimos no muestran diferencias estadísticas con la acidez total de los AH del composts de paja de trigo, mientras que la menor acidez fue para los AH del compost de rastrojo de maíz.

El contenido de grupos COOH fue diferente entre los AH de compost de EB y el contenido de grupos COOH de AH de los composts de RF, PT y RM. El menor contenido de OH fenólicos fue para los AH del compost de RM y el mayor para los ácidos húmicos del compost de RF. En cuanto al contenido de grupos C=O los AH de composts de RM y RF fueron similares, mientras que hubo diferencias estadísticas significativas entre los mencionados anteriormente y los AH de PT y los AH del compost de EB (Cuadro 2).

Los AH del compost de rastrojo de maíz tuvieron el mayor pH obtenido en solución acuosa y mostraron diferencias estadísticas significativas entre los AH de los composts de RF, EB y PT. El pH en solución de KCl 1,0 N en los cuatro AH no

tuvo la misma tendencia como lo mostró el pH en agua, ya que el pH mayor fue obtenido con los AH del compost de RF, siguiéndole en forma descendente el de PT, RM y EB. El  $\Delta$ pH de mayor intensidad correspondió a los AH del compost de residuos de frutas (-0,041), seguido por los AH de paja de trigo (-0,0800), rastrojo de maíz (-0,3210) y estiércol de bovino (-0,3400). Por otra parte, los valores de las relaciones ópticas  $E_4/E_6$  de los AH de los composts de diferente origen fueron bajos, especialmente para los AH de los composts de PT y EB. En cuanto a la CIC de los AH del compost de PT resultaron ser los de mayor intensidad, en tanto que la CIC de AH del RM fue la menor (Cuadro 3).

Al evaluar la respuesta del cultivo, las diferentes dosis de AH aplicadas al follaje o al

suelo no produjeron diferencias significativas sobre la producción de materia seca de las plantas de trigo (Cuadro 4). Tampoco los hubo para otras variables vegetativas como altura de la planta y longitud de la raíz (datos no publicados). La falta de significancia estadística en la variable de materia seca se atribuye a la alta variabilidad del material vegetal, pero se observa una notoria tendencia a existir menores valores en el tratamiento testigo y en las plantas que recibieron la mayor dosis de AH por vía foliar. El contenido de N foliar no mostró tendencia definida con relación a las dosis aplicadas, pero en relación a la fuente el AH obtenido a partir de RF, en especial cuando se aplicó al suelo, fue el que aparentemente indujo mayores concentraciones de N foliar (Cuadro 4).

**Cuadro 2.** Composición elemental y grupos funcionales de los ácidos húmicos (AH) obtenidos de diferentes composts

AH	C (%)	N (%)	Relación (C/N)	Acidez total (cmol·Kg <sup>-1</sup> )	COOH (cmol·Kg <sup>-1</sup> )	OH Fenólico (cmol·Kg <sup>-1</sup> )	Grupos C=O (cmol·kg <sup>-1</sup> )
RM-AH	52,0 b	1,52 b	34,2	150 c	136 b	14	493 a
PT-AH	69,7 a	1,57 b	44,4	250 b	144 b	105	386 b
RF-AH	55,3 b	3,49 a	15,9	382 a	150 b	226	481 a
EB-AH	72,7 a	3,32 a	21,9	300 ab	178 a	122	173 c

RM-AH: AH de compost de rastrojo de maíz; PT-AH: AH de compost de paja de trigo; EB-AH: AH de compost de estiércol de bovino; RF-AH: AH de compost de residuos de frutas. Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes entre sí según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

**Cuadro 3.** Propiedades químicas de los ácidos húmicos (AH) obtenidos de diferentes composts

Muestra	$\Delta$ pH	Relación $E_4/E_6$	CIC (cmol·Kg <sup>-1</sup> )
RM-AH	-0,321	0,434 b	334,6 d
PT-AH	-0,080	0,382 c	557,4 a
RF-AH	-0,041	0,501 a	365,2 c
EB-AH	-0,340	0,381 c	510,6 b

RM-AH: AH de compost de rastrojo de maíz; PT-AH: AH de compost de paja de trigo; EB-AH: AH de compost de estiércol de bovino; RF-AH: AH de compost de residuos de frutas. Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes entre sí según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

## DISCUSIÓN

La solución acuosa de NaOH constituyó el reactivo más eficiente para extraer la mayor cantidad de SH (80 %), mientras que la solución de  $Na_4P_2O_7$  extrajo un porcentaje moderado de SH (30 %), siendo un reactivo poco eficiente. Sin

embargo, la eficiencia de ambos reactivos dependió del material del que provienen las SH, ya que en el caso de los AH provenientes del compost de rastrojo de maíz, la eficiencia de la solución de  $Na_4P_2O_7$  fue superior a la mostrada por el NaOH. La cantidad total de AH extraída por los reactivos fue relativamente alta (variando desde 15,3 % para el compost de PT hasta 21,7 % para el de RM) si se compara con las obtenidas por López et al. (2008) quienes extrajeron cantidades que variaron desde 0,43 hasta 8,3% al emplear diferentes técnicas. Según Stevenson (1994) la riqueza de las SH depende del grado de humificación y de la composición de los materiales orgánicos originales, pues aquellos ricos en lignina generan mayor cantidad de ellas.

Los composts PT y EB presentaron valores altos de C (69,7 y 72,7 %, respectivamente), superiores al rango de 53,8-58,7 % señalado por Steelink (1983) para ácidos orgánicos. Por otro lado, el contenido de N de ambos composts estuvo

dentro del rango de 0,8-4,3 % señalado por el mismo autor. El alto valor encontrado para el carbono podría ser atribuido al uso de los tres extractantes así como a la naturaleza y grado de

humificación del compost. En general, los contenidos de C y N fueron variables, lo que originó diferentes relaciones C/N en los AH de los composts.

**Cuadro 4.** Respuesta de plantas de trigo ante aplicaciones al follaje y al suelo de dosis crecientes de ácidos húmicos (AH) obtenidos a partir de diferentes composts

Compost	Dosis (mg·L <sup>-1</sup> )	Aplicación foliar		Aplicación al suelo	
		Materia seca	Contenido foliar de N (%)	Materia seca	Contenido foliar de N (%)
Testigo	0	76,0 a	2,24	76,0 a	2,24
RM-AH	100	290,2 a	2,50	88,9 a	3,49
	200	107,6 a	2,26	112,7 a	1,98
	400	334,1 a	1,80	196,2 a	2,26
	800	86,0 a	2,26	90,6 a	2,13
	PT-AH	100	249,5 a	2,40	130,0 a
PT-AH	200	127,6 a	1,85	59,9 a	2,74
	400	233,3 a	1,49	167,8 a	2,40
	800	64,1 a	1,85	168,2 a	2,92
	RF-AH	100	101,0 a	2,52	88,1 a
RF-AH	200	116,4 a	2,21	85,5 a	3,60
	400	100,6 a	2,48	103,1 a	3,39
	800	81,6 a	2,42	160,3 a	2,22
EB-AH	100	149,7 a	2,05	156,7 a	1,59
	200	133,5 a	1,83	772,3 a	2,34
	400	182,3 a	2,26	141,4 a	2,06
	800	77,5 a	2,22	154,7 a	2,52

RM-AH: AH de compost de rastrojo de maíz; PT-AH: AH de compost de paja de trigo; EB-AH: AH de compost de estiércol de bovino; RF-AH: AH de compost de residuos de frutas. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey (P>0,05)

El contenido de los grupos carboxílicos resultó similar entre los AH de RM, PT y RF, y ligeramente superior en EB. Puesto que la reactividad de las sustancias húmicas se debe en gran medida a su alto contenido de grupos funcionales y que un mayor contenido de grupos carboxílicos posiblemente está correlacionado a una gran oxidación (D'Orazio et al., 2008), es probable que el material más rápidamente transformado a AH hayan sido los componentes del EB.

La acidez total de los AH de los cuatro composts se encuentran en el rango de 150 a 382 cmol·kg<sup>-1</sup>. Sin embargo, Stevenson (1994) encontró valores muy superiores, en el rango de 560 a 890 cmol·kg<sup>-1</sup>. La acidez (o capacidad de intercambio) de las sustancias húmicas es debida principalmente a la presencia de hidrógenos ionizables en grupos carboxílicos aromáticos y alifáticos y en grupos OH fenólicos (Schnitzer, 2000). El ΔpH fue negativo, situación que

probablemente sea la consecuencia de los grupos funcionales COO<sup>-</sup> que son las fuentes de sitios cargados negativamente a pH menores de 7,0 (Stevenson, 1994).

En cuanto a las relaciones ópticas E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>, los AH de la PT y el EB mostraron los menores valores, indicando que contienen moléculas con un alto grado de polimerización. Un valor bajo está asociado con altos tamaños moleculares y alto grado de condensación de constituyentes húmicos aromáticos (Kononova et al., 1966), reflejando el nivel de madurez del compost (Stevenson, 1994). En cambio, los AH derivados del RM y RF, con las mayores relaciones ópticas indican que contienen moléculas de menor complejidad y mayor grado de alifaticidad.

Con respecto al efecto de los AH de los diferentes composts en la producción de trigo no se encontraron diferencias significativas en la producción de materia seca lo cual coincidió con los resultados obtenidos por Mackowiak et al.

(2001) también en plantas de trigo, pero difieren de los de Nardi et al. (1999) quienes reportaron que las fracciones húmicas con alta cantidad de grupos fenólicos y carboxílicos mostraban un efecto significativo en el crecimiento de *Pinus sylvestris* y *Picea abies*.

### CONCLUSIONES

La eficiencia de las soluciones extractantes de los ácidos húmicos depende de la composición del material original.

Las sustancias húmicas de los composts estudiados manifestaron diferencias significativas en sus propiedades debido a que poseen diferente constitución elemental.

Las plantas de trigo no mostraron respuesta clara a la aplicación de los ácidos húmicos al suelo o al follaje, al menos durante los 64 días de duración de la prueba.

### LITERATURA CITADA

- Chen Y., N. Senesi y M. Schnitzer, 1977. Information provided on humic substances by E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41: 352-358.
- Chen, Y. y M. De Nobili. 2004. The role of humic substances and DOM in metal binding and plant growth. *In: Martin-Neto, Milori y da Silva (eds.) Humic Substances and Soil and Water Environment.* pp. 195-197. Sao Paulo, Brazil.
- D'Orazio, V.A. Traversa y N. Senesi. 2008. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from urban soils. *In: Perminova y Kulikova (eds.) From Molecular Understanding to Innovative Appl. of Humic Substances. Proc. 14<sup>th</sup> Meeting of International Humic Substances Society. Humus Sapiens. Moscow.* pp. 199-202.
- Harada Y. y A. Inoko, 1980. The measurement of the cation exchange capacity of CSMBs for the estimation of the degree of maturity. *Soil Sci. Plant Nutr.* 26: 127-134.
- Kononova, M.M., Z.T. Nowakowsky y D.C.A. Newman. 1966. *Soil Organic Matter. Its Nature, Role in Soil Formation and in Soil Fertility.* Pergamon Press. N.Y.
- López, R., D. Gondar, A. Iglesias, S. Fiol, J. Antelo y F. Arce. 2008. Acid properties of fulvic and humic acids isolated from two acid forest soils under different vegetation cover and soil depth. *European Journal of Soil Science* 59: 892-899.
- Mackowiak, C. L., P.R. Grossl y B.G. Bugbee. 2001. Beneficial effect of humic acid on micronutrient availability to wheat. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65: 1744-1750.
- Nardi, S., D. Pizzeghello, F. Reniero y A. Muscolo. 1999. Biological activity of humic substances extracted from soils under different vegetation cover. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 30(5): 621-634.
- Peña-Méndez, E., K. Novotná, D. Gajdosova, V. González y J. Havel. 2007. Characterization of humic substances of different origin by means of mass spectrometry an neural networks. *Chemosfere* 68: 2047-2053.
- Popov, A. I. 2008. The probable mechanism of biological effect of humic substances. *In: Perminova y Kulikova (eds.) From Molecular Understanding to Innovative Applications of Humic Substances. International Humic Substances Society. Humus Sapiens. Moscow.* pp. 453-456.
- Sánchez-Monedero, M.A., A. Roig, J. Cegarra, M.P. Bernal y C. Paredes. 2002. Effects of HCl-HF purification treatment on chemical composition and structure of humic acids. *European Journal of Soil Science* 53: 375-381.
- Schnitzer, M. 2000. A lifetime perspective on the chemistry of soil organic matter. *In: D.L. Sparks (ed.) Advances in Agronomy. Vol. 68.* Academic Pres, NY. pp. 1-58.
- Steelink, C. 1983. Elemental characteristics of humic substances. *In: Aiken, McKnight, Wershaw y MacCarthy. (eds.) Humic Substances in Soils, Sediments and Water.* Wiley. NY. pp. 457-476.
- Stevenson F.J. 1994. *Humus Chemistry. Genesis, Composition and Reactions.* Wiley. N.Y.