

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Sección de Químicas.



TESIS DOCTORAL

**Naturaleza y estructura de las fracciones húmicas en suelos
de la España semiárida**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Alfredo A. Polo Sánchez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

(Sección de Químicas)



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322343214

T1
660
POL

NATURALEZA Y ESTRUCTURA DE LAS FRACCIONES
HUMICAS EN SUELOS DE LA ESPAÑA SEMIARIDA

b 23091848
i 3401908X

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro34062.....

Memoria presentada por:
D. A. Alfredo Polo Sanchez
para aspirar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

Madrid, Noviembre de 1972

Este trabajo ha sido realizado en la Sección de --
Humus del Instituto de Edafología y Biología Vegetal del --
C. S. I. C. bajo la dirección del Dr. D. Eloy Dorado Bernal,
que supo además contagiarme de su gran entusiasmo por la --
Ciencia y la Investigación.

Mi agradecimiento al Dr. D. Francisco Velasco de
Pedro que me eligió el tema e hizo posible con su valiosa --
experiencia y consejo el estudio harto difícil y complejo --
de los suelos estudiados en esta memoria.

También hago constar mi gratitud al Dr. D. José --
del Rio y a la Srta. Pilar Tere Velasco por su colaboración
prestada y al Dr. Serratosa y a Dña M^a Angeles Muros por la
realización de los espectros infrarrojos.

Expreso mi agradecimiento al Ministerio de Educa-
ción y Ciencia por la concesión de una beca del Plan de De-
sarrollo para la realización de este trabajo, así como al --
Patronato "Alonso Herrera" por todos los medios puestos a --
mi alcance para llevar a cabo esta Tesis.

De igual modo, quiero expresar mi agradecimiento al
Profesor Dr. D. Rafael ^{PEREZ ALVAREZ} Osorio, Catedrático de Mecanismo de --
Reacciones Orgánicas de la Facultad de Ciencias de la Univer-
sidad de Madrid, por apadrinar esta Tesis Doctoral

I N D I C E

<u>INTRODUCCION</u>	1
---------------------------	---

CAPITULO I

<u>LA MATERIA ORGANICA Y EL PROCESO DE HUMIFICACION</u>	5
<u>DESCOMPOSICION DE LA MATERIA VEGETAL</u>	8
a) Celulolisis.....	8
b) Ligninolisis.....	9
c) Proteolisis.....	9
<u>FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA HUMIFICACION</u>	10
1º VEGETACION.....	10
a) Contenido en N de las hojas.....	11
b) Material hidrosoluble.....	12
2º EL MEDIO.....	15
a) Factores climáticos.....	15
b) La estación.....	16
- aireación y economía del agua.....	16
- riqueza en bases de la roca madre...	17
3º OTROS FACTORES.....	17
a) Estabilizadores del humus.....	17
b) actividad biológica.....	18
4º RESUMEN.....	18
5º ESQUEMA GENERAL DEL PLAN DE TRABAJO.....	20

CAPITULO II

<u>EL SUELO: ESTUDIO FISICO-QUIMICO</u>	21
<u>METODOS Y TECNICAS EMPLEADAS</u>	21
a) Análisis mecánico.....	21
b) Determinación del pH.....	23
c) Capacidad de cambio y cationes de cambio.....	23
d) Materia orgánica y carbonatos.....	25
e) Determinación de nitrógeno.....	32
<u>CARACTERISTICAS ECOLOGICAS Y FITOGEOGRAFICAS</u> <u>DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS</u>	35

CAPITULO III

<u>CARACTERISTICAS DE LOS SUELOS ESTUDIADOS</u> <u>APLICANDO LOS METODOS GENERALES ANTERIORMENTE DADOS</u> ..	41
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUELOS

1. Tierra parda meridional.....	42
2. Tierra parda meridional.....	45
3. Suelo rendsiniforme.....	47
4. Terra rossa.....	50
5. Suelo pardo calizo forestal.....	52
6. Tierra parda subhúmeda.....	55
7. Tierra parda subhúmeda.....	58
8. Suelo pardo calizo forestal.....	61
9. Ranker de tangel.....	64
10. Suelo pardo calizo forestal.....	67
11. Limo rojo mediterráneo.....	70
12. Tierra parda meridional.....	72
13. Suelo pardo calizo forestal.....	75

CAPITULO IV

<u>LOS ACIDOS HUMICOS: CONOCIMIENTOS ACTUALES</u> <u>SOBRE SU NATURALEZA Y COMPOSICIÓN.....</u>	78
a) Grupos funcionales.....	78
b) Sustancias reductoras en su composición.....	81
c) Formas de nitrógeno.....	81
d) Hipótesis sobre su configuración molecular..	83

CAPITULO V

<u>DISCUSION SOBRE LOS METODOS DE EXTRACCION</u> <u>DE LA MATERIA ORGANICA DE LOS SUELOS.....</u>	85
a) Extracción y separación de las s. húmicas...	87
b) Purificación.....	95
c) Formas de humus.....	96
d) Valoración cuantitativa de a. húmicos y fúlvicos.....	97
e) Discusión.....	99
<u>DESNDIDAD OPTICA Y FLOCULACION.....</u>	100
a) Preparación de las muestras.....	101
b) Resultados de la densidad óptica y discusión	102
c) Umbral de coagulación: resultados.....	105

CAPITULO VI

<u>FRACCIONAMIENTO DE LOS ACIDOS HUMICOS.....</u>	107
<u>METODOS ELECTROFORETICOS.....</u>	108

1º. Aparatos y métodos.....	110
2º. Lectura de los electroforegramas.....	111
3º. Curvas de %T en función de la distancia....	114
4º. Resultados y discusión.....	122
<u>GEL-FILTRACION CON SEPHADEX.....</u>	<u>127</u>
1º. Generalidades sobre tamices moleculares....	127
2º. Mecanismo de la gel-filtración: coeficientes	128
3º. Curvas de elución en función del %T.....	133
4º. Resultados y discusión.....	147

CAPITULO VII

<u>CONTRIBUCION AL ESTUDIO</u> <u>ESTRUCTURAL DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS.....</u>	<u>154</u>
<u>GRUPOS FUNCIONALES Y ANALISIS ELEMENTAL.....</u>	<u>154</u>
a) Grupos funcionales.....	154
b) Resultados y discusión.....	157
c) Análisis elemental: resultados y discusión...	158
<u>ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJO.....</u>	<u>161</u>
a) Bandas características.....	162
b) Resultados y gráficas.....	166
<u>DIFRACCION DE RAYOS X.....</u>	<u>171</u>
<u>MICROSCOPIA ELECTRONICA.....</u>	<u>174</u>
<u>CONCLUSIONES GENERALES.....</u>	<u>175</u>
<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>180</u>

I N T R O D U C C I O N

En las últimas décadas, la Ciencia del suelo ha adquirido un desarrollo extraordinario, atribuible sobre todo a la nueva orientación impuesta a sus líneas de investigación. Actualmente se considera al suelo como un "complejo dinámico": un ente -- natural formado en el punto de intersección de la hidrosfera y de la biosfera,; el suelo se forma bajo la influencia de los factores del medio; la roca madre se altera por efecto del clima y de la vegetación y el medio biológico origina una materia orgánica (humus) de propiedades bien determinadas, que se incorpora al suelo. Los procesos de humificación y de mineralización desembocan en la formación de complejos coloidales organo-metálicos dotados de propiedades físico-químicas y biológicas bien definidas, las cuales confieren al suelo su individualidad propias

Nuestro trabajo se centra sobre las relaciones que se establecen entre la roca, la materia orgánica, el clima y la vegetación. Con este criterio se estudiarán:

- a) Los suelos y sus relaciones con la vegetación
- b) La materia orgánica de estos suelos, principalmente los ácidos húmicos
- c) El estudio de los ácidos húmicos se llevará a cabo de tal manera que podamos conocer su naturaleza y comparar

-los para caracterizarlos de la forma más completa posible.

De acuerdo con la distribución de isoyetas, España se divide en tres zonas:

a) La España húmeda, es la incluida dentro de las isoyetas de 800 mm. y, por tanto, tienen una precipitación media anual igual o superior a esta cifra. Comprende el 24% del área peninsular.

b) La España seca comprende las regiones incluidas dentro de la zona de 400 mm. o inferior a esta cifra. Comprende el 15%: llanuras del Sureste, La Mancha y parte de las cuencas del Ebro y del Duero.

Dantín Cereceda divide la Península en dos zonas: a) - la lluviosa, que recibe precipitaciones superiores a 600 mm. anuales y b) la seca, cuya pluviometría se sitúa en torno a los 400 mm. De acuerdo con los datos establecidos esta última zona abarca el 63,8% del territorio nacional.

La aridez resulta o no de la relación en que se hayan - la precipitación y la evaporación anuales; las regiones donde la evaporación excede a la lluvia son áridas y lo serán tanto más - cuanto mayor sea la diferencia.

c) La España de transición, comprendida entre 400-800 mm.; representa el 61% y tiene una distribución muy irregular. Para nuestro estudio hemos elegido esta tercera zona, exceptuando - la muestra nº 8 que se ha tomado como modelo para ver la influencia del clima en la humificación.

Dentro de la zona de precipitación inferior a 600 mm., el 19% recibe de 600 a 500 mm. de lluvia anual y el 52% recibe de 500 a 400 mm.

Referente a la España árida se pueden establecer algunas conclusiones: a) que el verano es muy seco y b) que la primavera y el otoño son las estaciones más lluviosas. Se pasa de una sequía extremada a un periodo de lluvias violentas y copiosas. Hemos distinguido para nuestro estudio los suelos silícicos de los calizos.

En los suelos silícicos, hemos estudiado desde el tipo ranker de las zonas altas de las cadenas montañosas, donde el humus forma un primer horizonte sobre la roca silícica, hasta las tierras pardas que presentan ya un horizonte (B) y que alcanzan una considerable extensión dentro de la zona silícica. Dentro de la zona semiárida caliza hemos estudiado aquellos suelos con escasez de agua, y por tanto de escasa actividad química, tales como los suelos rendsinifórmes y los suelos pardo calizo forestales.

Dentro de cada una de estas zonas, hemos tenido en cuenta para la génesis y constitución del humus, la vegetación autóctona distinguiendo en la toma de muestras la presencia de coníferas y frondosas, y dentro de las mismas, la especie dominante e incluso la asociación posible con el estrato arbustivo y herbáceo.

El estudio de los suelos, en este aspecto bioquímico, está en íntima relación con la Agricultura y la Fisiología Vegetal. El conocimiento de la influencia de la materia orgánica en la formación y estabilidad de la estructura del suelo, en la retención de agua, sobre el crecimiento vegetal, en la aportación de elementos nutrientes a las plantas y en la liberación de gas carbónico, han revelado la marcada importancia que estas sustancias tienen en los procesos fisiológicos y en la bioquímica de su nutrición.

En España se han realizado algunos estudios parciales sobre la humificación en suelos semiáridos, No obstante, nuestro trabajo completa las investigaciones anteriores, contribuyendo con nuevas aportaciones, gracias a la utilización de modernas técnicas analíticas, experimentales, a un mejor conocimiento de las sustancias húmicas de estos suelos

CAPITULO I

LA MATERIA ORGANICA Y EL PROCESO DE HUMIFICACION

La materia orgánica del suelo se compone de un conjunto de sustancias complejas cuya evolución y dinamismo está determinada por la llegada al suelo de organismos y restos de origen animal y vegetal y su continua transformación mediante la acción conjunta de factores biológicos y fisico-químicos.

Los componentes de la materia orgánica del suelo pueden incluirse en dos grupos:

1) Los residuos vegetales y animales, incluyendo los productos de su descomposición y biosíntesis por la actividad celular: compuestos orgánicos (con o sin nitrógeno) enclavados dentro de grupos bien definidos en la química (proteínas y sus productos de descomposición, hidratos de carbono, grasas, ceras, resinas, etc.). Colectivamente estos compuestos de naturaleza no específica representan el 10-15% del total de la materia orgánica.

2) Un conjunto de sustancias de peculiar naturaleza e imposible de catalogarlas en ninguno de los grupos existentes en la Química Orgánica. La naturaleza, origen y propiedades de estas sustancias no son completamente conocidas. Sin embargo, a causa de su permanencia en la constitución de los suelos, en las turbas y en las sustancias de formación natural, forman un grupo aparte

con características propias bajo la denominación de "sustancias húmicas". En los suelos bien evolucionados este segundo grupo ~~en~~ constituye una gran parte de la reserva de materia orgánica (alrededor de 85-90%).

Amos grupos, más los organismos "recientes" y sus residuos, tanto vegetales como animales, incompletamente descompuestos, forman lo que se llama la "materia orgánica del suelo".

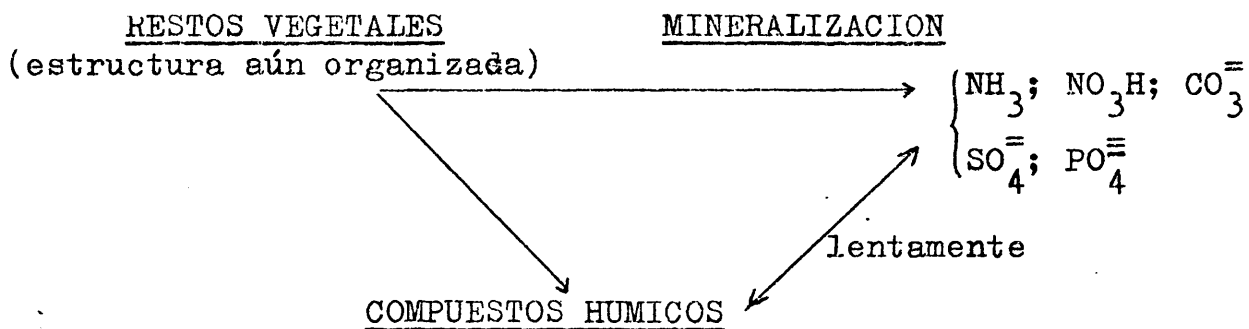
Existe además el concepto de "Humus", concepto más extenso en el cual se incluye, no solamente las "sustancias húmicas propiamente dichas" sino también los productos de avanzado estado de descomposición de los residuos orgánicos y junto con aquellos productos resintetizados por microorganismos (sustancias proteicas, hidratos de carbono, etc.), las cuales acompañan a las muestras que se toman para la determinación de la materia orgánica del suelo.

El cuadro siguiente resume los conceptos anteriormente citados, según Kononova (1966).

M A T E R I A O R G A N I C A	
HUMUS	
"Sustancias húmicas propiamente dichas" formadas por: ác. húmico " fúlvicos " hmatomelánicos huminas	Productos de grado avanzado de descomposición - de los residuos orgánicos y productos de resíntesis por microorganismos (proteínas, hidratos de carbono, ceras, etc.)
ESTRUCTURA NO ORGANIZADA	Fracción reciente; restos sin descomponer. ESTRUCTURA ORGANIZADA

Los restos vegetales de toda índole, hojas, ramas que caen sobre el suelo, constituyen la fuente esencial de la materia orgánica y desde su llegada al suelo, son más o menos velozmente descompuestos por la actividad biológica.

La materia orgánica recién incorporada al suelo es así poco a poco transformada y produce, de una parte, elementos minerales solubles o gaseosos tales como NH_3 , NO_3H , CO_2 (MINERALIZACION). Por otra parte, compuestos coloidales complejos (sustancias húmicas, o más ampliamente humus) que son relativamente estables a la acción microbiana (HUMIFICACION). Estos compuestos húmicos se mineralizan a su vez, pero mucho más progresivamente que la m. o. "fresca". Con esta evolución se forma el ciclo de la descomposición de los restos orgánicos en la forma siguiente:



Se puede definir la humificación como el conjunto de procesos de síntesis que conducen a la formación de compuestos húmicos coloidales a partir de los productos de descomposición de los restos orgánicos.

La humificación da lugar a la formación de moléculas orgánicas complejas más o menos insolubles. Los compuestos más importantes que se originan son los ácidos húmicos y los fúlvicos; Los ácidos fúlvicos son de la misma naturaleza que los primeros, aunque menos polimerizados.

La humificación resulta de una parte, de procesos puramente físico químicos: oxidación y polimerización bajo la influencia de la aireación y desecación (fijación de NH_3 o NH_2 por radicales COOH); de otra parte, de procesos biológicos que activan los primeros. Estos dos tipos de procesos intervienen en grado muy variable según los casos.

DESCOMPOSICION DE LA MATERIA VEGETAL.-

La descomposición de la materia vegetal resulta de procesos esencialmente biológicos. Estudiaremos sucesivamente la descomposición de los hidratos de carbono, celulosa, hemicelulosa y lignina.

a) Celulolisis.- La celulolisis es muy sensible a la riqueza de nitrógeno y calcio del medio, acelerándose este proceso en un medio bien provisto de estos elementos, haciendo posible la actividad de las bacterias principalmente las Mixobacterias tales como *Cytophaga* y de ciertos hongos basidiomicetos; una gran parte del carbono se pierde en forma de CO_2 y el resto se transforma por biosíntesis en carbono celular y en poliuronidos.

En medio muy ácido, inactivo, pobre en N, la celulolisis es muy lenta y solo intervienen ciertos hongos acidófilos.

E En medio anaerobio, la celulolisis puede ser bastante

rápida gracias a la acción de ciertas bacterias anaerobias (Clostridium, Caduceus, Plectridium); pero los resultados son completamente diferentes; se forman productos solubles o gaseosos: CO_2 , H, etanol, ácidos orgánicos; estos últimos pueden ser a su vez transformados en gas (metano). En resumen, en medio anaerobio -- los hidratos de carbono desaparecen completamente sin contribuir a la formación de moléculas húmicas.

b) Ligninólisis.-- Este proceso de degradación es mal conocido y parece estar ligado a la actividad de los hongos. En medio aireado y activo, los basidiomicetos (Clavaria, Armillaria) a) parecen provocar una transformación rápida, cuyas etapas son -- mal conocidas, de la lignina en ácidos húmicos. En medio ácido, -- los hongos lignívoros acidófilos, tales como la Trechispora, ejercen una acción muy diferente; fragmentan la molécula de lignina -- en monómeros solubles de núcleos aromáticos.

En medio mal aireado, la ligninólisis es muy lenta, -- mientras que los hidratos de carbono desaparecen rápidamente.

c) Proteólisis.-- En medios activos, poco ácidos y bien aireados, la proteólisis pasa por tres etapas: proteólisis propiamente dicha que libera aminoácidos; amonificación que libera amoniaco gaseoso a expensas de los aminoácidos y por último, -- la nitrificación que transforma este amoniaco en nitritos y nitratos.

La proteólisis es rápida en medio biológicamente favorables, mientras que se paraliza en medio ácido por la presencia -- de polifenoles que fijan las proteínas.

A pH elevado y en presencia de una gran cantidad de N proteico, las bacterias y actinomicetos son los agentes de una --

amonificación rápida; por el contrario, en condiciones desfavorables, los hongos acidófilos no provocan más que una amonificación relativamente lenta. La relación C/N de los restos vegetales es, en general, un buen índice de la actividad proteolítica; si es baja, estos procesos son rápidos y liberan NH_3 gaseoso. Cuando es alta (mayor de 25), los procesos están amortiguados y no se libera más que una ínfima cantidad de nitrógeno amoniacal.

Es necesario notar que una anaerobiosis relativa favorece considerablemente la amonificación, a la inversa de lo que ocurre en la nitrificación.

Para el estudio de los factores que influyen en la humificación opondremos los factores internos (naturaleza de los restos vegetales), a los factores externos.

1º VEGETACION.--

Las interacciones que se establecen entre el suelo y la vegetación han constituido ya desde el siglo pasado un tema muy importante a estudiar entre los investigadores de la química del humus. La influencia de la vegetación en el proceso de la humificación fué reconocida ya en 1879 por Muller al observar la formación de mor cuando el bosque de roble era reemplazado por el de haya sobre suelo silíceo o pobre en calcio. La roca madre ejerce también una influencia decisiva sobre la evolución del humus, de modo que sobre suelo rico en bases, el haya llega a humificar bien y da lugar a la formación de mull.

Dos factores parecen jugar un papel esencial: el contenido en nitrógeno de los restos vegetales y la materia hidrosoluble.

Los restos vegetales débilmente lignificados, por ser

ricos en N y en materia orgánica hidrosoluble, tienden a descomponerse mucho más deprisa que los tejidos lignificados, endurecidos, pobres en N y en bases; aquellos tienden a producir mull, éstos - evolucionarán más bien hacia mor siempre que permanezcan constantes las demás variables que influyen en el proceso de humificación (Duchaufour 1960).

a) Contenido en nitrógeno de las hojas.- Las especies vegetales cuyas hojas están caracterizadas por una relación C/N baja dan restos que se descomponen rápidamente, en contraposición a las especies cuyas hojas (o de una manera general los restos orgánicos formados) son pobres en N (C/N elevado); se llaman acidificantes y tienden a formar un moder o un mor.

Wittich (1961) cita las cifras siguientes para las especies que han crecido en la misma estación:

Aliso, Robinia	16
Olmo, Fresno	24
Roble, Haya	40-45
Pino silvestre	65

Las cuatro primeras especies son netamente "mejorantes". En líneas generales puede establecerse que el bosque de frondosas reúne las condiciones más favorables para la formación de un "mull" en contraposición al bosque de coníferas, normalmente asociado a formación de "mor".

La influencia de la vegetación en la humificación en suelos forestales españoles ha sido puesto de manifiesto en diversos

-sos trabajos. Inicialmente en 1960 (Albareda, Higuera, Velasco) en un estudio micromorfológico y químico de diversos humus pirenaicos.

También en suelos forestales pirenaicos Albareda y Velasco (1963) comprueban que los Fagales aportan unos restos que humifican mejor que los de Coníferas.

Velasco (1966) ha observado en suelos pardos la transformación de un mull forestal con vegetación de *Quercus tozza* a un moder forestal como consecuencia de la degradación del bosque, ocasionada por la invasión de otras especies (*Cistus laurifolius*, *Juniperus communis* etc.) menos aptos para suministrar un material idóneo para el proceso de humificación. La evolución del humus - depende no solo de la vegetación arbórea, sino también del sotobosque, de modo que hay especies que humificando bien (roble), - pueden dar lugar a la formación de humus bruto si el suelo está recubierto de *Vaccinium*.

Cuando el bosque de coníferas se encuentra tapizado - abundantemente por plantas herbáceas, cabe la posibilidad de que se forme un suelo de "Mull". Las Ericáceas disminuyen la actividad biológica y tienden a formar Moder o mor mientras que las - gramíneas favorecen la formación de Mull.

b) Cantidad y naturaleza de las materias hidrosolubles. - Esta fracción existe en cantidades muy variables y su - transformación es muy diferente según las especies vegetales; -- cuando se incorpora al suelo sufre una evolución que depende de las condiciones ecológicas; una fracción sufre una biodegradación que conduce a su rápida desaparición; otra, se conserva y evoluciona más o menos rápidamente por insolubilización, dando origen a compuestos húmicos poco polimerizados (ácidos fúlvicos). Según -

la rapidez de la biodegradación o de la insolubilización y según la permeabilidad del sustrato, esta fracción avanza más o menos en profundidad en el perfil.

Importante factor es la aireación del medio; en medio anaerobio la biodegradación es mucho más lenta que en medio bien aireado.

Solo consideraremos la evolución en medio aireado; los dos factores más importantes son el pH y la naturaleza de los residuos vegetales.

Los compuestos fenólicos se insolubilizan y se polimerizan más o menos deprisa en función del pH del medio y de la cantidad de calcio.

Handley (1954) demostró que en las especies que engendran el "Mor", ciertos taninos fijan las proteínas retardando su descomposición. En 1961, este mismo autor opone los taninos hidrolizables de ciertas plantas "mejorantes" a los taninos condensados originales de las plantas "acidificantes" tales como Calluna; los primeros no impiden a la caseína descomponerse en diferencia de los segundos.

Coulson (1960) estudia la acción del medio exterior (pH y riqueza en bases) sobre la evolución de una misma especie tal como el Haya; en efecto, las hojas del Haya ofrecen la particularidad de dar un Mull o un Moder según las condiciones del medio: si el pH es alto, los ácidos fenólicos sufren una polimerización rápida y pierden su acción complejante con los taninos (Mull); en medio ácido la acción complejante se conserva (Mor).-- El pH de cambio es 5.

Las investigaciones efectuadas recientemente en Nancy sobre materias hidrosolubles han permitido demostrar el pa-

pel preponderante de la naturaleza de la fracción hidrosoluble: incluso en medio pobre y muy ácido, ciertas especies dan compuestos hidrosolubles que evolucionan deprisa y sufren una rápida biodegradación.

Jacquin (1966) ha puesto en evidencia la evolución -- acelerada de las sustancias hidrosolubles de ciertas especies -- como Melandryum rubrum (rica en nitrógeno): La oxidación diastásica de compuestos fenólicos da lugar rápidamente a la aparición de compuestos oscuros, del tipo "melanina" semejantes, por la naturaleza físico química, a los ácidos húmicos.

También hay otras especies "mejorantes" que activan -- considerablemente los procesos de formación de humus de tipo Mull, en medio ácido y oligotrofo: entre los árboles citemos al Aliso y entre las especies herbáceas, la mayor parte de las gramíneas acidófilas (principalmente Festuca Sylvatica); esta especie acelera la descomposición de las hojas del abeto y del haya con las cuales se mezcla y da un tipo de humus Mull: la descomposición -- de los restos del abetal-hayedo ha sido comparada con la de una asociación característica de un humus bruto (pinar con Calluna).

Los restos generadores de Mull contienen doble cantidad de materias hidrosolubles que los restos que dan lugar a Mor; la relación C/N en la primera es 19 por 140 de la segunda.

En los restos que darán Mull interviene, en primer lugar una biodegradación casi completa de estos compuestos hidrosolubles: la casi totalidad del nitrógeno se encuentra en forma mineral (amoniacal y nítrica).

El NH_4^+ se reorganiza al mismo tiempo que una parte del nitrógeno nítrico se lava: esta fase coincide con la neoformación de los ácidos húmicos.

Inversamente, el Mor se caracteriza por una evolución muy lenta de la materia orgánica; la mineralización es incompleta y tardía; la nitrificación es casi nula; no hay formación de ácidos húmicos polimerizados, sino de ácidos fúlvicos.

2º EL MEDIO.-

a) Factores climáticos.- La descomposición rápida de la materia orgánica está condicionada por una temperatura elevada, una humedad suficiente pero no excesiva, de manera que la aireación sea favorable. En clima ecuatorial o mediterráneo no se observa formación de "Mor" en medio aireado. Al contrario, los climas boreales y alpinos y ciertos climas atlánticos de -- fuerte nubosidad (BRETAÑA), favorecen la formación de humus bruto de descomposición lenta.

En clima ecuatorial húmedo, los procesos de humificación y de polimerización son lentos, los ácidos fúlvicos imperan sobre los húmicos. Si se compara el clima continental con el atlántico, se observa que los Mull ofrecen una mejor humificación en el primer caso que en el segundo; son de mayor espesor y más ricos en materia orgánica, lo que parece estar ligado a fuertes variaciones estacionales de humedad en el suelo; los climas caracterizados por una estación seca muy marcada favorecen la formación de horizontes húmicos profundos de gran espesor con sustancias húmicas muy estables.

El clima local refuerza la acción del clima general en un sentido o en otro; así, en la alta montaña, los Mor se localizan a menudo en las vertientes más frías, en razón de la insuficiencia de radiaciones que retarda la actividad biológica.

b) La estación.— La "estación" corresponde a las -- condiciones ecológicas locales, que dependen esencialmente de la roca madre y de la topografía.

Dos factores son esenciales: 1) las condiciones de drenaje y aireación: el medio local puede modificar las condiciones del clima general y contribuir a crear el microclima interno del suelo. 2) la composición química de la roca madre, principalmente en lo que concierne al calcio.

- Aireación y economía del agua.— El medio - óptimo es un medio suficientemente aireado pero presentando cor~~tas~~tas fases de anaerobiosis poco acentuadas; ciertas fases de desecación son igualmente útiles para una buena humificación; un medio demasiado aireado y seco condiciona una mala humificación y una mala mineralización (moder cálcico seco de ciertas calizas superficiales); inversamente, un medio mal aireado, provocando - una anaerobiosis relativa, es a menudo causa de una humificación defectuosa: ciertos compuestos orgánicos (principalmente fenoles), tóxicos para la actividad bacteriana, se forman en esas condiciones y escapan a la biodegradación; además, no se polimerizan más que lentamente y son muy móviles en el suelo. En medio ácido, la descomposición de los restos es muy lenta y se forma "Mor". En - casos extremos de anaerobiosis se forman humus hidromorfos: turbas y anmoor.

Las alternancias microclimáticas de hidromorfía y desecación son muy favorables para la humificación pues según Iarkov (1956) Duchaufour-Jacquín (1969) y Duchaufour-Domomernes (1963), los compuestos orgánicos solubles se forman en periodo húmedo - ("precursores") y se polimerizan e insolubilizan en periodo seco.

- Contenido en bases de la roca madre, - Entre los iones básicos liberados en el curso de la alteración, son el Ca^{++} y el Mg^{++} los que juegan el papel principal: menos móviles que los monovalentes, saturan los radicales ácidos que se desarrollan en el curso de la humificación y elevan el pH: las microfloras neutrófilas son generalmente más activas que las microfloras acidófilas; en medio poco ácido los dos procesos, mineralización y humificación están favorecidos.

Los cationes intervienen de dos maneras: directamente - como en el caso del calcio activo de los suelos calimorfos o indirectamente en el ciclo biológico; para ciertas especies, en efecto, los tejidos son tanto más ricos en bases cuanto los medios sobre los que crecen están mejor provistos de ella: la materia orgánica de los restos vegetales es, de hecho, menos ácida.

Se puede deducir de estas consideraciones, que los Mor son raros sobre roca caliza sobre todo si una mezcla íntima está asegurada entre la materia orgánica y la materia mineral finamente dividida (calcio activo de rendzinas). En caso contrario se puede formar Mor cálcico si las otras condiciones son desfavorables: alta montaña, bosque resinoso, presencia de caliza dura.

Inversamente, Mull oligotrofo, pueden formarse en medios muy ácidos si la materia prima (rica en N) y las condiciones de aireación son favorables.

3º OTROS FACTORES. -

Otro factor importante lo constituyen los "estabilizadores" del humus. Con este nombre designa Laatsch (1963) los componentes minerales que favorecen la acumulación de humus: arcillas y óxidos de hierro y aluminio que forman complejos con la materia

orgánica, la protegen contra la mineralización y favorecen su polimerización.

Interesa señalar aquí especialmente la influencia de la fauna del suelo ya que la actividad microbiológica, aunque es fundamental, está condicionada por los factores precedentes. Las lombrices favorecen la formación muy precoz de un complejo arcillo-húmico muy estable que engloba también materia orgánica poco --- transformada (mull cálcico de rendsina). Por el contrario los artrópodos no favorecen la formación de estos complejos pero favorecen una humificación más intensa (en algunos moder) (Duchaufour, 1963).

4º RESUMEN.-

Se puede pues preguntar cuál es el factor principal, la vegetación o la estación en la formación de un tipo de humus dado.

Si se exceptúan ciertas estaciones, donde las condiciones del medio muy especializadas juegan el papel principal (por ejemplo: turberas, estaciones ricas en calcio activo) parece que dos factores juegan su papel, pero su importancia relativa depende de la duración de la acción de la vegetación: debemos distinguir su acción a corto tiempo de su acción a largo plazo.

- Acción a corto tiempo.- El medio, la estación, parecen imperar en una cierta medida; las especies "acidificantes" - dan un MULL bastante activo cuando se cultiva sobre un medio muy favorable a la actividad biológica; sin embargo, las especies "mejorantes", con hojas ricas en N no dan jamás nacimiento a un Mor, incluso en medios desfavorables (muy ácidos); es el caso de la vegetación a base de gramíneas.

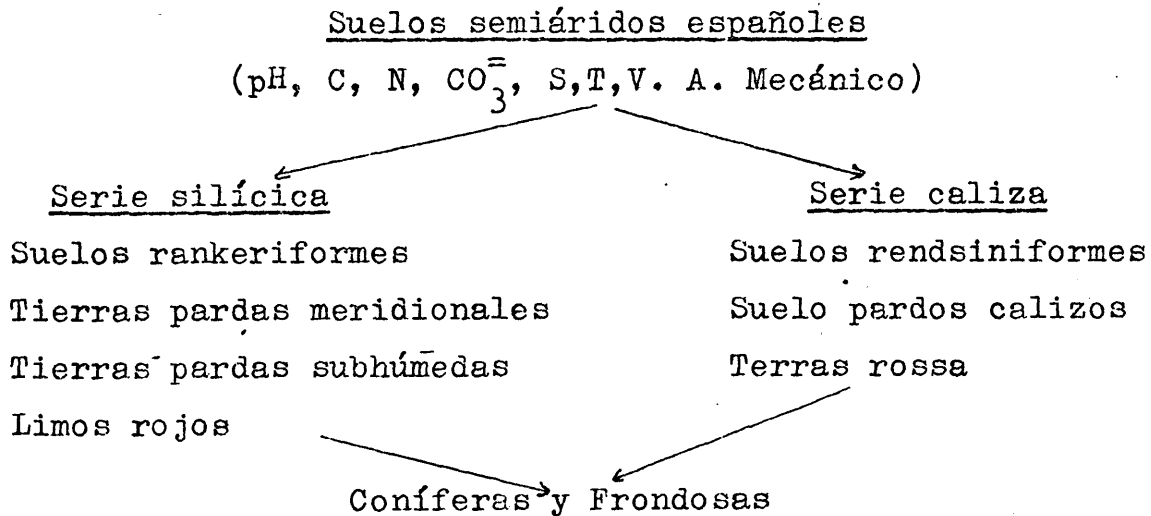
- Acción a largo tiempo.- Por el contrario, la acción de la vegetación instalada desde muy largo tiempo juega un papel decisivo; impera sobre las condiciones locales de la estación, -- principalmente sobre la riqueza en bases de la roca madre: ésta parece que solo juega un papel secundario en la orientación del humus hacia un Mull o hacia un Moder.

Así, en la alta montaña, los Rhododendros forman un Mor (tangel o mor cálcico, en realidad (ácido) sobre caliza; inversamente, con Festuca sylvática bajo abetos, se forma un Mull, incluso en un medio muy pobre en bases.

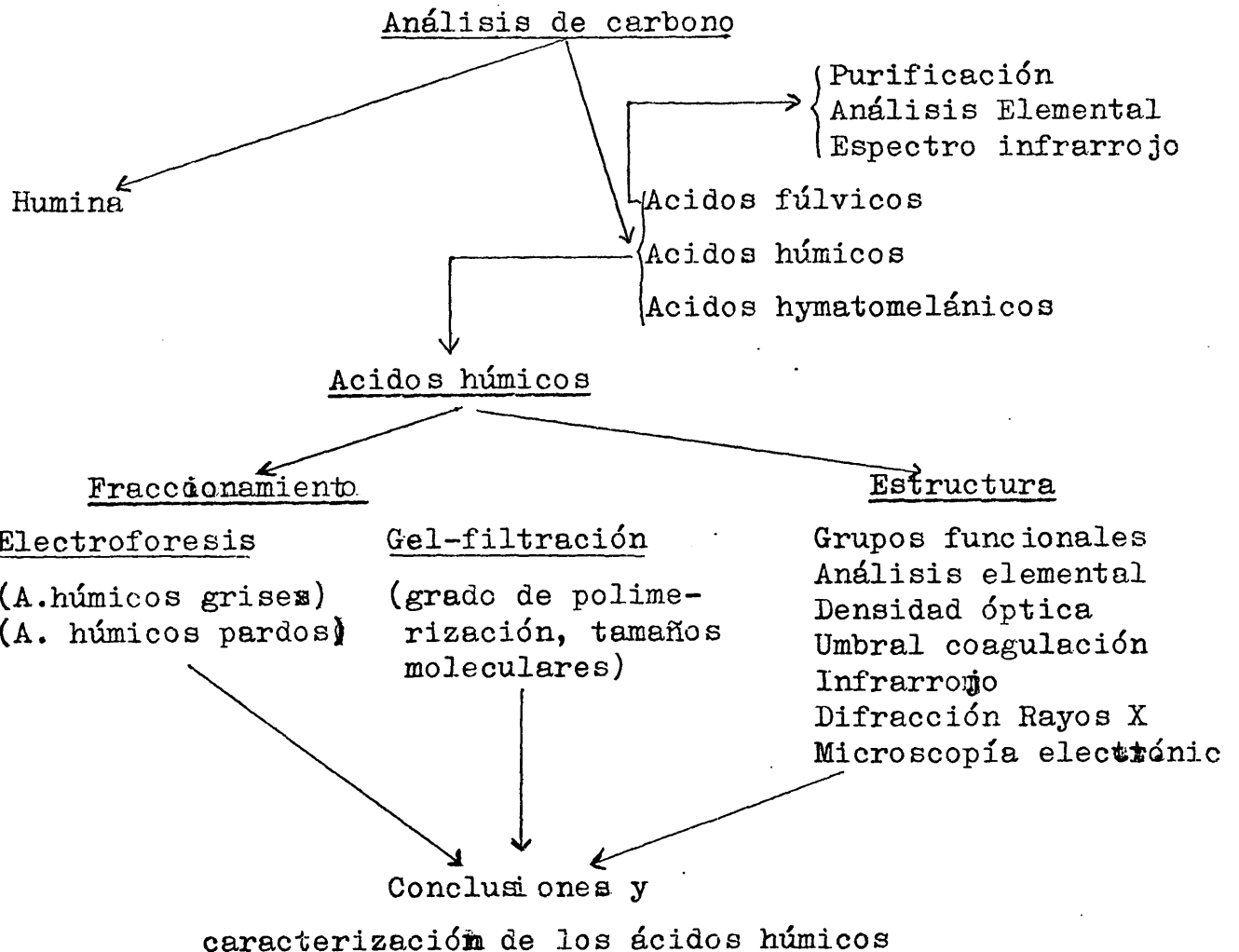
Sin embargo los "mull cálcicos" muy fuertemente humificados exigen siempre, para formarse, la presencia de una reserva abundante de Ca^{++} en la roca madre.

El esquema de trabajo queda esquematizado en la página siguiente.

NATURALEZA DE LAS FRACCIONES HUMICAS EN SUELOS SEMIARIDOS ESPAÑALES



Extracción y separación de sustancias húmicas



CAPITULO II

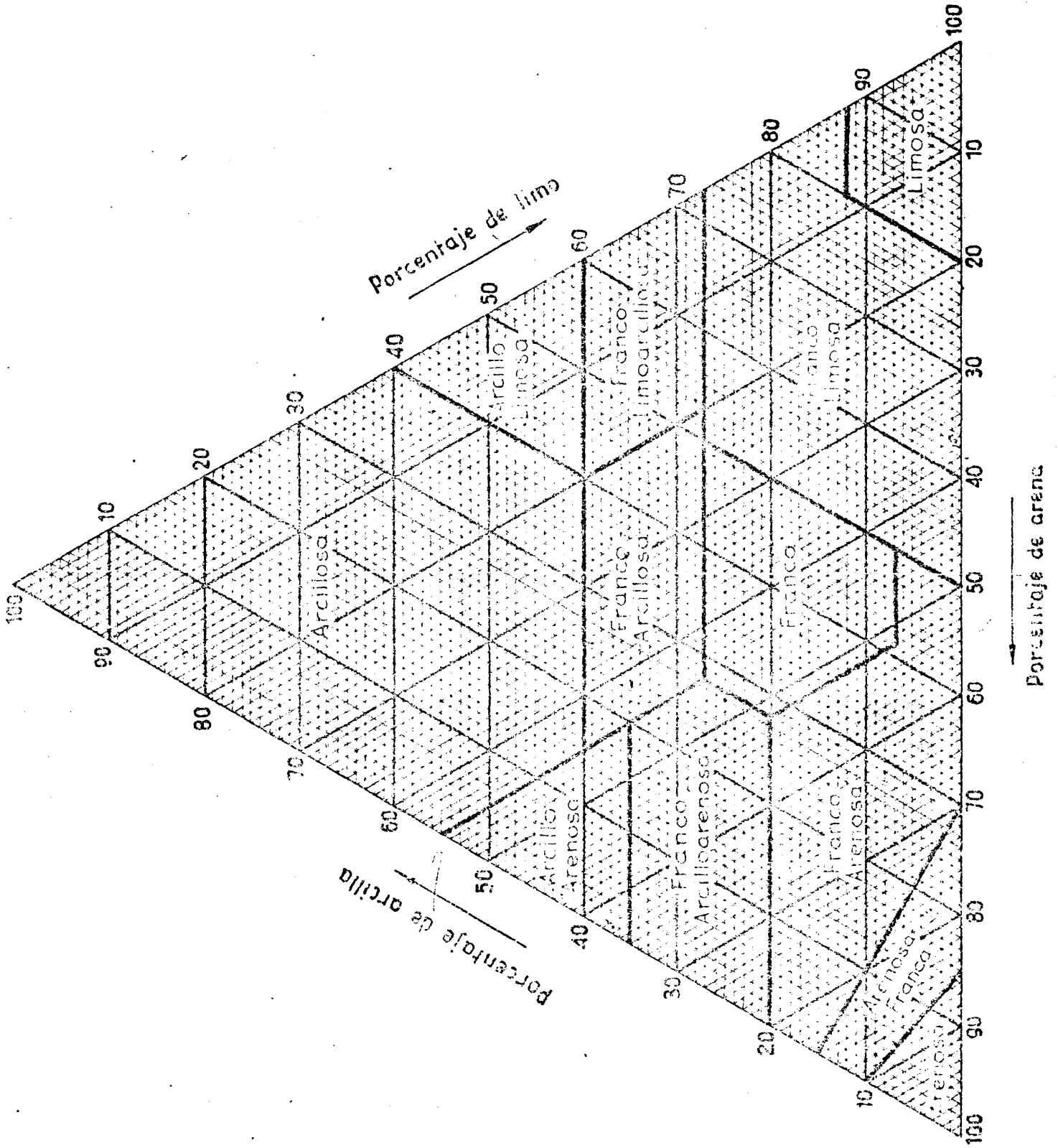
EL SUELO: ESTUDIO FISICO-QUIMICO

Métodos y Técnicas empleadas

1) ANALISIS MECANICO.-

Se pesan 20 gr. de suelo tamizado por 2 mm. y se le aña de agua oxigenada al 40% aproximadamente para destruir la materia orgánica; esta operación se repite 3, 4 ó 5 veces según la cantidad de materia orgánica que contenga el suelo. Se deseca en estufa a 105° C unas horas para quitar la humedad y se vuelve a pesar el suelo dentro del vaso para valorar la cantidad de materia orgánica que se ha destruido. Se pasa luego a una botella de litro añadiéndole 10 cc. de dispersante (metafosfato sódico) y se pone a agitar durante 8 horas en un agitador rotatorio; después se pasa a una probeta enrasando hasta 1 litro, tamizándolo por un tamiz de 0,05 mm.; lo que pasa es la arena muy fina (0,05-0,02 mm.) el limo (0,02-0,002 mm.) y la arcilla (< 0,002 mm.). La arena que se queda sobre el tamiz de 0,05 se seca y pesan las distintas fracciones previo paso por sucesivos tamices cuyos tamaños son: arena muy gruesa (2-1 mm.), arena gruesa (1-0,5 mm.), arena media (0,5-0,2 mm.) y arena fina (0,2-0,05 mm.). Con el líquido que pasó a la probeta se procede de la siguiente forma: se agita durante 1 minuto dejándolo reposar 4 minutos 47 segundos si la temperatura

SISTEMA AMERICANO



es de 20°C (sino fuese así, existen unas tablas de sedimentación en las que se mira el tiempo necesario para distintas temperaturas); entonces con una pipeta Robinson de 20cc. se extrae líquido a una profundidad de 10cc; ésto es el limo mas la arcilla que se seca y pesa. Vuelve a agitarse durante otro minuto y después de reposar 8 horas aproximadamente (también depende de la temperatura) se extrae en la misma forma la arcilla. Por diferencia se conoce la cantidad de limo.

El agente dispersante se prepara mezclando 37,70 gr. de metafosfato sódico (fosfato monosódico calcinado en horno a una temperatura de 650°C aproximadamente) y 7,49 gr. de carbonato sódico en 1 litro de agua.

2) DETERMINACION DE pH.-

Utilizaremos un potenciómetro Beckman, preparando el suelo por procedimiento de la "pasta saturada" recomendada por V. HERNANDO y P. SANCHEZ-CONDE (1954), para los suelos españoles. Todas las determinaciones de pH se realizaron con agua.

3) CAPACIDAD DE CAMBIO Y CATIONES DE CAMBIO.-

Según la técnica de A. MELICH (1948).

Procedimiento:

- Pesar una cantidad de suelo suficiente para dar de 0,5 a 2,2 m.e. de capacidad de cambio (suelo seco al aire y tamizado por tamiz de 2 mm.).- Se suelen pesar 5 grs. de suelo y se pone en un aparato especialmente diseñado para la percolación.

- Percolar con 100 ml. de solución A (Trietanolamina y Cloruro -

bárico).

- Cuando termina la percolación, añadir 25 ml. de la solución B - (cloruro bárico).

- Después añadir 25 ml. de agua destilada para lavar bien las paredes y finalmente 100 ml. de agua destilada.

Fracciones alicuotas de este extracto se utilizan para la determinación de H^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ y K^+ .

Hidrógeno de cambio:

Reactivos:

Acido clorhídrico 0,04N

Indicador mixto: Triturar 0,1 grs. de verde bromocresol con 14,3 ml. de NaOH 0,01N y diluir a 200 ml. con agua.- Disolver 0,1 grs. de naranja de metilo en 200 ml. de alcohol de 95.- Mezclar 2 partes de verde bromocresol y 3 de naranja de metilo.

Procedimiento:

Medir 50 ml. del extracto del suelo en un erlenmeyer, añadir 6 gotas del indicador mixto y titular con clorhídrico 0,04N hasta rosado salmón.

- Se hace una prueba en blanco: 20 cc. de la solución A y 6 gotas del indicador mixto.- Se valora también con clorhídrico.

- El hidrógeno en m.e. en el suelo es la diferencia entre la titulación del problema y la de los 20 cc. de la solución A.

Cálculo:

$$\%H = 0,04 \cdot (f \text{ del ClH}) \cdot 100 \cdot N$$

N = cc. del ClH gastados en el problema - cc. del ClH gastados en la prueba en blanco.

Determinación de Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Na⁺ y K⁺:

Preparación de las muestras:

- Se toman 25 cc. del percolado, se pone en un mechero y cuando está casi hirviendo se precipita con 5 cc. de SO_4H_2 0,6N.
- Se filtra dejando antes enfriar una hora.
- Se lava el precipitado unas cuantas veces con agua destilada - caliente y se enrasa en un matraz de 50 cc.
- El Na^+ y el K^+ se determinaron por fotometría de llama.
- El Ca^{++} y el Mg^{++} se determinaron por absorción atómica:

4) MATERIA ORGANICA Y CARBONATOS.- Método Allison (1960).

El aparato mostrado en la figura 1-A fué proyectado para que tuviera un volumen interno pequeño que evita tener que hacer una pre-aireación según las condiciones más frecuentes en el laboratorio.

Además, requiere solamente un mínimo periodo de aireación seguido a la digestión de la muestra para arrastrar y separar todo el CO_2 producido a través del sistema purificador F-J - hasta dentro del bulbo Nesbitt K donde es absorbido y determinado gravimétricamente.

Se produce una corriente de CO_2 libre haciendo pasar - aire a presión a través de la válvula de aguja A y pasando a través del frasco de cal sodada B. La pequeña banda de autoindicador absorbente de CO_2 , indica cuando hay que reponer la cal sodada. El aire libre de CO_2 pasa a través de un tubo de vidrio que atraviesa todo el refrigerante y se introduce en la solución ácida oxidante en el matraz de digestión. Si se emplea succión en -

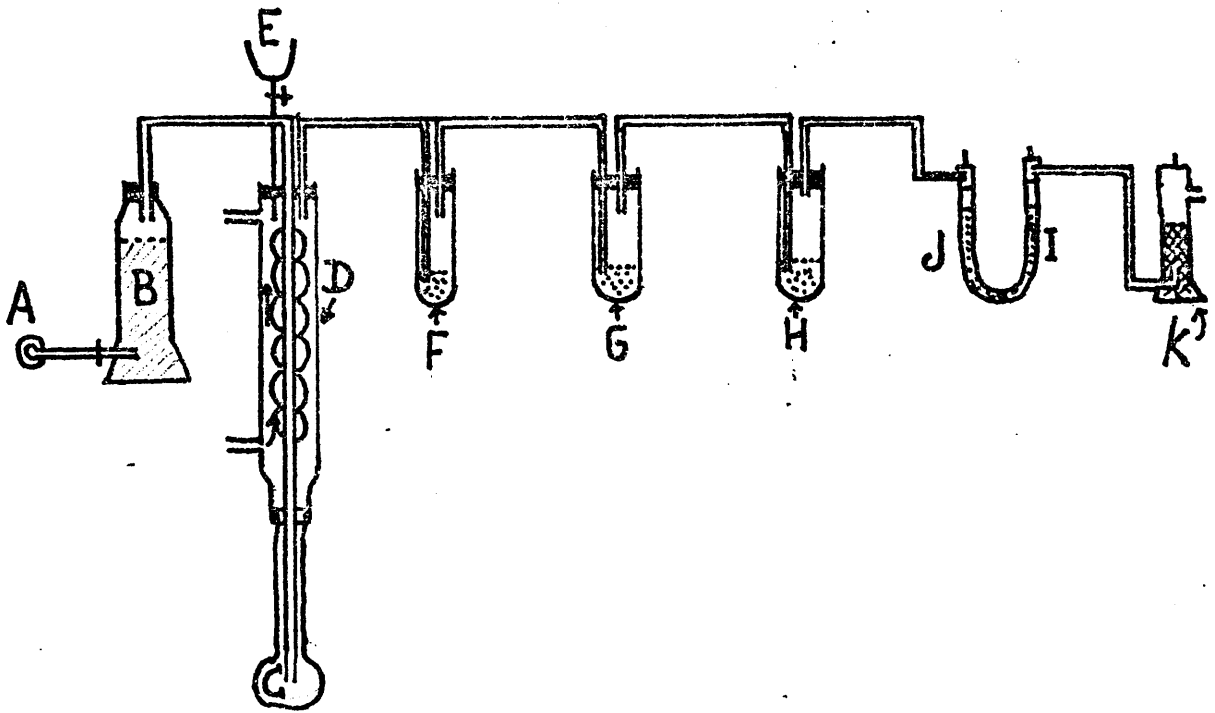


Fig. 1-A: Aparato para la determinación del carbono

- A : Válvula de aguja para regular la presión del aire
- B : Frasco de cal sodada
- C : Matraz de digestión
- D : Refrigerante de bolas
- E \neq Embudo de llave
- F : Frasco lavador con IK
- G : Frasco lavador con SO_4Ag_2
- H : Frasco lavador con SO_4H_2 concentrado
- I-J : Tubo con zinc y anhídrona
- K : Bulbo de absorción Nesbitt

vez de presión hay que poner otro frasco con Cl_2Ca entre el tubo Nesbitt y la fuente de succión para prevenir la entrada de humedad dentro de K.

Las unidades purificadoras F a J inclusive están colocadas en un papel de $7,5 \times 14$ pulgadas con base para conseguir un aparato fácilmente manejable que puede ser colocado en cualquier posición conveniente durante la operación y conservado en un pequeño espacio cuando no se usa. Los frascos F, G y H están hechos de viales de 25×90 mm. con tapones de neopreno del N^o 4 que se cortan a media pulgada aproximadamente por la parte de abajo para conseguir un buen cierre del vial. Los frascos F y G están -- llenos hasta $2/3$ con una solución de Ik al 50% y solución saturada de SO_4Ag_2 respectivamente. La acción combinada de estos dos frascos es necesaria para evitar completamente la interferencia de cloruros. El frasco H se llena de SO_4H_2 concentrado. Los tubos de entrada no deben entrar en la solución más de 1,5 pulgadas para el frasco F y 1 pulgada para el frasco G. De otro modo puede producirse una presión excesiva de retroceso y causar fugas en el sistema. También la punta de los tubos de entrada en F y G no deben ser menores de 1 mm. de diámetro pues podrían cerrarse. I y J están contenidos en un tubo de cloruro cálcico por conveniencia y están separados en el fondo por un disco de lana de vidrio. La rama I, a la derecha, contiene Zn granular, para absorber cualquier vapor ácido que se escape de H. En la rama J, a la izquierda hay anhídrona que absorbe las últimas trazas de vapor de agua en el sistema de arrastre que contiene el CO_2 desprendido antes de que este último entre en el bulbo Nesbitt donde es absorbido. Todas estas conexiones de goma deben estar cubiertas

de silicona lubricante.

El bulbo de absorción contiene Mikobita: una capa de - 3 cm. de 8 a 14 mallas, otra de 2 cm. de 12 a 20 mallas, una sobrecapa de anhidrona y una capa de lana de vidrio por encima y - debajo de la columna.

Reactivos.-

- L. Mezcla de digestión ácida.- Mezclar 600 ml. de SO_4H_2 concentrado y 400 ml. de PO_4H_3 85%. Conservar bien cerrado.
- M. Dicromato potásico.- Grado reactivo.
- N. Digestión ácida para carbonatos.- Disolver 57 ml. de SO_4H_2 conc. y 92 gr. de $\text{SO}_4\text{Fe}, 7\text{H}_2\text{O}$ en 600 ml. de agua. Enfriar y diluir a 1000 ml. Esta solución es aproximadamente 2N en acidez y contiene un 5% de SO_4Fe como antioxidante. Consérvese bien cerrado.
- O. Yoduro potásico.- Disolver 100 gr. de IK en 100 ml. de agua.
- P. Sulfato de plata.p Solución acuosa saturada.
- Q. Otros reactivos.- Mikobita o Caroxita, cal sodada, cinc y anhidrona (porclorato magnésico anhidro).

Preparación de la muestra:

El pulverizar hasta un tamaño de 1 mm. es normalmente suficiente, especialmente si el suelo no es calcáreo y para el análisis se toma una muestra de 2 gr. o mayor. Sin embargo, puesto que muchos suelos áridos y algunos suelos calcificados recientemente contienen fragmentos de la piedra caliza primaria deben -- ser molidos por lo menos a 0,05 mm. para evitar errores en el análisis.

Prueba de carbonatos.-

Si se supone que hay carbonatos se debe hacer en los -

suelos un test de rutina con el fin de determinar el método a seguir. Poner 1/4 de cucharilla de té de la muestra en un papel encerado, humedecer con unas gotas de agua destilada. Añadir ClH 2N gota a gota y observar si hay efervescencia,. El humedecer previamente la muestra ayuda a detectar los casos dudosos. Si hay trazas de carbonatos o hay duda, hay que tratar la muestra previamente para eliminar carbonatos antes de analizar el C orgánico.

Carbono orgánico.-

Este método de combustión húmeda determina directamente el C orgánico en el suelo no calcáreo. En los suelos calcáreos determina el C. total y por tanto es necesario tratar el suelo para separar cualquier carbono inorgánico (carbonatos) -- presente en el matraz de digestión. o determinar el C inorgánico separadamente y restarlo del C total,

Tratamiento previo para separar Carbonatos.-

A la muestra, en el matraz de digestión, añadir 3 ml. de solución N en cantidad suficiente para arrastrar al fondo -- cualquier partícula de suelo adherida al cuello del matraz. Para este procedimiento son los más apropiados los matraces de fondo redonde del tipo Kjeldahl de 100 ml. Poner el matraz en posición vertical sobre una llama a 1 cm. de alta y hervir el contenido suavemente durante minuto y medio mientras se le dan vueltas -- (no agitar) al matraz. Dejar enfriar. Añadir 2g. de $C_2O_7K_2$ e inmediatamente conectar el matraz al refrigerante D pues de otro modo puede haber pérdida de CO_2 ya que las muestras y el dicromato están en contacto con ácido diluido. De este modo la mues-

-tra queda preparada para la determinación del carbono orgánico total.

Determinación del C. orgánico en suelos libres de carbonato.-

Poner una muestra de suelo que contenga 20 a 40 mg. -- de carbono (normalmente de 0,5 a 3 gr. de un suelo seco en la -- estufa) en el matraz de digestión. Lavar el cuello del matraz -- con 3 ml. de agua destilada y conectar al refrigerante D.

Conectar el bulbo Nesbitt K tarado al sistema y abrir la llave de entrada al bulbo. Verter 25 ml. de la mezcla ácida L en el embudo E, dejar que el ácido llegue al matraz C y cerrar -- inmediatamente la llave para prevenir pérdidas de CO_2 . La punta del tubo de aire debe llegar hasta 0,5 cm. por debajo de la superficie del ácido durante la digestión (lubricar la llave del -- embudo E con la mezcla de digestión ácida o con ácido fosfórico siruposo pero nunca con los lubricantes usuales.

Ajustar la corriente de arrastre (Válvula A) de modo -- que salgan 2 burbujas por segundo y mantener esta corriente duran -- te la digestión de la muestra. Aplicar una llama de 5 a 6 cm. de alta y llevar la muestra a ebullición durante 3 ó 4 minutos (Si hay muchos cloruros hay que hervir durante 5 minutos). Continuar con ebullición suave evitando una espuma excesiva durante un pe -- riodo total de calentamiento de 10 minutos. Si el calentamiento es demasiado rápido son visibles humos blancos de SO_2 por encima del segundo bulbo del refrigerante durante la ebullición. Sepa -- rar la llama al final del periodo de digestión y airear durante 10 minutos a razón de 6 a 8 burbujas por segundo. Cuando se ter -- mina la aireación cerrar la llave del bulbo Nesbitt y desconec -- tar éste del sistema. Cepillar el bulbo con un cepillo para se --

-parar cualquier hilo o polvo y pesar el bulbo inmediatamente -
Cálculo del porcentaje de C = (g. de CO₂ en la muestra - g. de CO₂
en el blanco) .27,27/g. de suelo seco en estufa.

Determinación del Carbono orgánico en extractos de suelos.-

Poner una parte alícuota del extracto en el matraz de digestión; añadir 1 ml. de la sol. N y evaporar a sequedad. El ácido que contiene la solución N destruye cualquier carbonato -- presente y los iones ferrosos actúan como antioxidante para prevenir pérdidas de C de origen orgánico. El residuo seco se trata entonces como una muestra de suelo excepto que se añaden 5 o 6 - bolas de vidrio al matraz antes de añadir la sol. ácida de diges-
tión L.

Carbono inorgánico.-

El aparato de la fig. 1-A para determinar directamente el C inorgánico de los suelos calcáreos es muy adecuado, siguiendo el procedimiento siguiente:

Una muestra de 1 a 5 gr. de suelo seco en la estufa se ponen en el matraz de digestión que se conecta al refrigerante D. Pesar el bulbo Nesbitt, unirlo al sistema y poner la corriente de aire a razón de 1 a 2 burbujas por segundo. Verter 25 ml. de la solución ácida N en el embudo E, dejar que llegue al matraz y -- cerrar inmediatamente la llave del embudo. Aplicar un calor suave que lleve a ebullición al contenido del matraz durante unos 4 minutos. Continuar hirviendo hasta exactamente 3 minutos más lo que hace un total de 7 minutos. Separar la llama y aumentar la - corriente de aire a 8 burbujas por seg. y continuar la aireación durante 10 minutos. Desconectar el bulbo Nesbitt, limpiarlo de -

hilos o polvo con un cepillo de pelo de camello y pesarlo. Calcular el C inorgánico del mismo modo que el orgánico y el % de CO_3Ca , si se desea, por la fórmula : % C inorgánico x 8,33 % de carbonato cálcico.

5) DETERMINACION DEL NITROGENO.-

Método Kjeldahl, con las modificaciones introducidas por Irion (1951).

Este método se basa en la mineralización del nitrógeno con formación de amonio (sulfato amónico) que es valorada después de la destilación.

Se pueden establecer tres etapas:

- 1) Ataque o combustión en a. sulfúrico
- 2) Destilación del amoniã
- 3) Valoración del mismo

Técnica:

- Se pesan 2 gr. de muestra sólida en papel de filtro (Albert 11 cm.) haciendo un pequeño cartucho y se introduce en un matraz Kjeldahl de 300 cc.; se añade una punta de espátula del catalizador (mezcla de selenio en polvo, sulfato de cobre y sulfato potásico), y 20 cc. de SO_4H_2 concentrado.

- Se calienta la mezcla (colocando un embudo pequeño en la boca del matraz para evitar proyecciones) y se mantiene en ebullición hasta que desaparece la materia orgánica, obteniéndose un líquido transparente. (esta operación debe hacerse en vitrina).

- Una vez frio el matraz se traspasa su contenido a un matraz aforado de 250 cc (lavando el Kjeldahl con agua destilada)

Destilación:

- Del líquido anterior se miden con pipeta 50 cc. y se llevan a un erlenmeyer de 750 cc. añadiendo unas gotas de indicador Schi-ro-Taschiro (100 cc. de alcohol de 96°; 0,08 gr. de azul de metileno y 0,125 de rojo de metilo), unos 300 ó 400 cc. de agua -- destilada y unas perlas de vidrio.- El líquido se pone de color violeta.

Se enlaza en aparato destilatorio que consta de:

- 1).- Un erlenmeyer de destilación
- 2).- Tubo aducto provisto de ensanchamiento para evitar proyecciones del líquido durante la destilación
- 3).- Embudo de bromo donde se coloca la solución de sosa al 30% conectado con el erlenmeyer provisto de una llave
- 4).- Tubo de vidrio que actúa como refrigerante
- 5).- Tubo que se sumerge en el líquido del erlenmeyer - colector también con ensanchamiento para evitar la absorción del mismo
- 6).- Erlenmeyer colector en el que se coloca el ácido sulfúrico.

- En el erlenmeyer colector se coloca el SO_4H_2 0,1N para la fijación del amoníaco y unas gotas del indicador.- La cantidad de ácido depende de la muestra.- Para productos pobres en nitrógeno es suficiente con 25 ml. exactamente medidos.

- Una vez preparado el aparato destilatorio, se deja caer la solución de sosa al 30% hasta que el líquido esté alcalino (color verde).

- Por acción del álcali queda el amoníaco en libertad y calentan

-do el matraz a ebullición se desprende todo el amoniaco siendo retenido por el sulfúrico.

- Cuando todo el NH_3 se ha desprendido, cosa que se nota poniendo un papel indicador al final del tubo refrigerante, se efectúa la valoración.

Valoración:

- El exceso de ácido se valora con NaOH 0,1 factorada, en presencia del indicador que se puso anteriormente.- El viraje se produce de color violeta a gris.

- Paralelamente se hace una prueba en blanco.

Cálculos:

$$\% \text{ de N} = \frac{(A-B) \cdot f \cdot 0,14}{0,4}$$

Siendo: f= factor de la NaOH 0,1N

A= ml. de NaOH gastados en la prueba en blanco

B= ml. de NaOH gastados en el problema.

CARACTERISTICAS ECOLOGICAS Y FITOGEOGRAFICAS DE LAS

ESPECIES ESTUDIADAS.-

FAGUS SILVATICA, L.

El área general de esta especie se extiende de N a S. desde algo más de los 60º en la parte meridional de Escandinavia, hasta algo menos de los 38º en el Etna (Sicilia), mientras que de O. a E. se le encuentra desde la costa occidental de Noruega, Inglaterra y nuestra cordillera Cantábrica, hasta Crimea.

Sus principales manifestaciones españolas quedan incluidas en la franja cantábrica y pirenaica.

Respecto a la ecología del haya, el primer carácter a destacar es su intransigencia con los climas secos; necesita forzosamente humedad, siendo fundamental que esté en el ambiente, - más que en el suelo, por exigirlo así la intensa transpiración - de su follaje. Es importante destacar su resistencia al frío, por lo que se le considera árbol de montaña, teniendo en España su óptimo entre los 1000 y 1500 m. pudiendo elevarse a los 2000 y bajar hasta cotas inferiores a 500 m.

En cuanto a suelos, muestra una gran amplitud pero son manifiestas sus preferencias por los calizos, sin exceso de humedad.

QUERCUS TOZZA BOSCH.

El área general del rebollo resulta bastante reducida, pues se limita a la península Ibérica, parte occidental de Fran

-cia y N O de Marruecos.

Esta distribución geográfica incita a calificarle de especie atlántica; sin embargo, no demuestra este árbol ninguna preferencia por situaciones costeras; antes bien, su difusión por las mesetas interiores parece poner de manifiesto cierta condición orófila y transigencia con el clima continental.

Se instala entre los 400 y 1400 m. pudiendo llegar a 1760 m. en Marruecos.

En cuanto a la humedad observa una condición intermedia meso-xerófila corroborada por las ponderaciones que de su resistencia a la saquía hacen los forestales europeos, mientras que los mediterráneos señalan su relativa exigencia de humedad.

Ecológicamente una de sus más destacadas características es su aversión a los suelos calizos; se trata de una especie silícicola, que dentro de esta condición puede vivir en suelos de muy diversa naturaleza; cuarcitas, arenas, pizarras, areniscas ... etc.

QUERCUS LUSITANICA, WEBB.

El área general de esta especie se concreta a la península Ibérica y N. de Africa hasta Tunez.

Se desarrolla más bien en clima continental de tendencias orófilas, lo cual presupone una gran amplitud térmica y altitudinal, pudiendo subir hasta los 1800 m. y descender excepcionalmente hasta las regiones costeras. Su escasa exigencia de humedad le permite intervenir en paisajes de típica xerofilia, tanto en los fríos páramos de Castilla y Aragón, como en las situaciones más templadas que ofrecen algunas sierras levantinas.

Se adapta fácilmente a suelos de muy diversa condición;

abunda en los silíceos, pero tiene una gran tolerancia y casi predilección por los calizos.

QUERCUS ILEX, L.

La encina se extiende por la mayor parte de la región mediterránea con más abundancia por la parte occidental que por la oriental; hacia el N no pasa de la Bretaña francesa, su límite meridional se encuentra en Cirenaica.

En cuanto a ecología hay que resaltar su maravillosa flexibilidad, se trata de un árbol que al mismo tiempo ostenta condiciones definitivas y climáticas que llega a límites insospechados de rusticidad y resistencia a las condiciones adversas compitiendo con especies más sufridas y acreditadas de frugalidad.

Entre 200 y 1200 m. según latitud y climas, puede situarse el óptimo de las formaciones de esta especie cuya amplitud térmica le capacita a llegar hasta más de 2000 m.

JUNIPERUS THURIFERA, L.

Especie mediterránea occidental propia del pino de alta montaña y de la facies ruda del pino semiárido; parece que existe solamente en nuestra península y N de Africa.

En España rara vez se encuentra por debajo de los 500 m. alcanzando su mayor cota a los 2000 m. en las cumbres de la sierra de Sagra.

Ecológicamente se acredita por su fácil adaptación a situaciones de condición francamente adversa, donde el frío y la sequedad son características fundamentales del clima.

En cuanto a suelos, tiene esta especie una gran toleran

-cia prefiriendo siempre los calizos en donde se encuentran las mejores y más extensas formaciones de Juniperus thurifera.

CASTANNEA SATIVA. MILL.

Se extiende por la parte meridional de Europa, desde el S. de Inglaterra y península Ibérica hasta Turquía, apéndices occidentales en las islas atlánticas (Madera y Canarias), orientales en las proximidades del Mar Caspio y meridionales en Marruecos y Argelia.

En España se extiende desde Galicia hasta Navarra con ramificaciones en el interior por las comarcas de León y Zamora; falta en los Pirineos y reaparece en Gerona y Barcelona. En Andalucía hay dos núcleos: uno en Sierra Morena, otro en la Península con manchas en la Serranía de Ronda y en Sierra Nevada.

Ecológicamente presenta marcadas preferencias por las situaciones abrigadas y frescas, observa resistencia al frío y vive desde el nivel del mar hasta el contacto con coníferas de montaña entre los 500 y 1200 m.

Presenta gran tolerancia por los suelos; los graníticos o volcánicos, ricos en potasa son los que más le convienen.

QUERCUS COCCIFERA.

Arbusto de 0,5 - 3 m. Hojas persistentes de periodos cortos muy duras, dentadas espinosas, raramente enteras y verdes.

Glandes subsesiles o con pedúnculo corto, con cúpula erizada de escamas punzantes.

Esta encina (coscoja) está distribuida en toda la región mediterránea y en general ocupa las etapas degradadas, constitu-

-yendo matorrales bajos conocidos con el nombre de garriga.

Corteza muy estimada por el contenido en taninos.

Es indiferente a la naturaleza química del sustrato; - resulta más xeroterma que *Quercus ilex*.

SAROTHAMNUS PURGANS y JUNIPERUS COMUNIS (ssp. nana).

Especies propias de la alta montaña ibérica, silicícola, tienen una gran amplitud geográfica en la Península, que va desde el Pirineo a Sierra Nevada. Tiene su óptimo en el Sistema Central e Ibérico, situándose como etapa serial de pinares y hayedos; por encima del límite natural del bosque forman parte con el enebro rastrero del matorral climácico.

Constituyen los típicos "piornales" serranos característicos del Sistema Central.

El suelo que los soporta es generalmente un ranker par do o de tangel.

PINO CARRASCO (P. HALEPENSIS).

Es la conífera más típica de la región mediterránea, - tiene enorme resistencia al calor y a la sequía, fácil adaptación a los suelos faltas de permeabilidad y una gran tolerancia - para el calcio, soportando dosis mayores que la de cualquier otro pino. Muy exigente para la luz, resiste bien los fuertes calores que supone la intensa insolación de los veranos en la región mediterránea; otro es, en cambio, su comportamiento respecto al -- frío, resultando bastante sensibles a las temperaturas bajas; de ahí, su preferencia por las orientaciones de solana y su localización general en cotas inferiores a 1000 m.

Sus óptimas manifestaciones parecen ocurrir en los arenales y colinas de la región costera mediterránea, con suelo calizo y cotas de 0-800 m. con clima de temperaturas suaves y precipitaciones de 500 mm, pero la rusticidad y pocas exigencias, - salvo en lo relativo a bajas temperaturas, le permite insospechados alejamiento de la condición óptima llegando a vivir en suelos pobres con menos de 200 mm. de precipitación anual; pero este campeón de resistencia a la sequía, sabe gustar y aprovechar la humedad y las buenas situaciones demostrándolo con su aspecto vigoroso, mayores crecimientos y doble medida anual.

Se distribuye por la Europa mediterránea.

CAPITULO III

CARACTERISTICAS DE LOS SUELOS ESTUDIADOS APLICAN-
DO LOS METODOS GENERALES ANTERIORMENTE SEÑALADOS

Todos los resultados están referidos al peso del suelo - seco al aire. Los correspondientes al complejo de cambio están dados en meq. en 100 g. de suelo.

Los datos para la obtención de las curvas monoterms se han obtenido de los Boletines Climatológicos editados por el Ministerio del Aire. Se ha tomado la media de los últimos 20 años.

El significado de las letras es el siguiente:

P= precipitación total anual

T= temperatura media anual

Pps= precipitación en el periodo seco

Tps= temperatura media en el periodo seco

M= índice de Martonne = $\frac{P}{T+10}$

C= intensidad de sequedad = $\frac{\text{area central}}{\text{suma áreas laterales}}$

Para es estudio de los colores de los suelos se emplearon las tablas MUNSELL.

Muestra nº 1

Tierra parda meridional

a) Localidad: Hoyo de Manzanares (Madrid)

Situación: Carretera de Hoyo de Manzanares a Colmenar Viejo -
(Km 4) a 15 m. a la derecha de la carretera.

Altitud: 1010 m.

Inclinación: llano

Formación geológica: granito y gneis

Vegetación: Quercus ilex. Cistus ladaniferus

b) Perfil

A₀₀: 0-0,2 cm.

A₀: 0,2-1 cm.

A₁: 1-9 cm. Color 10YR 3/3

(B): 9-27 cm. Color 10YR 4/3

C₁: 27-47 cm. Color 10YR 5/4

c) Análisis

Hor	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer,	Arena muy fina	limo	arcilla
A ₁	27,88	14,90	10,41	73,76	5,88	13,22	7,14
(B)	23,49	15,90	12,88	69,26	10,30	12,06	8,38

Horizonte	pH	%C	%N	C/N
A ₁	6,35	3,82	0,21	18,14
(B)	6,30	1,37	0,07	19,57

Complejo de cambio:

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	9,99	4,0	1,39	0,47	0,38
(B)	6,46	1,5	0,78	0,52	0,25

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} + Mg^{++}}$
A ₁	6,24	16,23	38,44	0,12	0,19
(B)	3,20	9,66	33,12	0,34	3,37

d) Comentario:

- Suelo con textura franco arenosa. La microestructura A₁ es de agregados mixtos de materia mineral y compuestos orgánicos. Fuerte actividad biológica debida a las lombrices.

- Capacidad de cambio baja; poco calcio y elevada proporción de hidrógeno (grado de saturación intermedio).

e) Tipo de humus - Mull forestal oligotrofo

Síntesis biológica variable de complejos húmicos; predominan los ácidos húmicos poco polimerizados sobre los de mayor peso molecular.

OYO

NZ NA E

MUEST A 1 2

P=780 m

T=1,7°

2,9

ps=56 m.m

ps= 34

1

(m.)

10

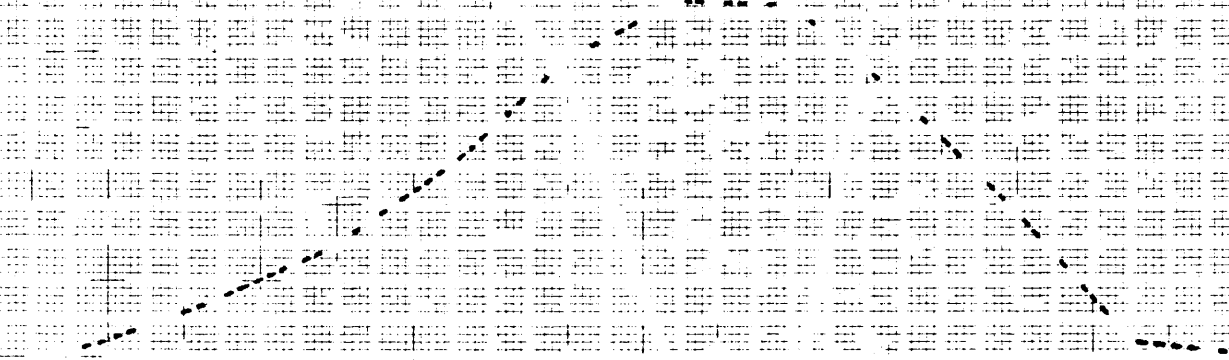
0

60

F M A

J A

O N D



Muestra nº 2

Tierra parda meridional

- a) Localidad: Hoyo de Manzanares (Madrid)
Situación: Carretera de Hoyo de Manzanares a Colmenar Viejo
(Km 4) a 5 m. a la derecha de la carretera.
Altitud: 1010 m.
Orientación: Sur-Sureste
Formación geológica: granito y gneis
Vegetación: Juniperus oxycedrus

b) Perfil

- A₀₀: 0-0,2 cm.
A₀: 0,2-2 cm.
A₁: 2-9 cm. Color 7,5YR 2/2
(B): 9-44 cm. Color 10YR 7/3

c) Análisis

Hor.	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer.	Arena muy fina	limo	arcilla
A ₁	17,61	16,19	18,54	56,36	19,25	16,7	7,70
{B}	25,18	20,05	18	81	9,74	7,79	1,47

Horizonte	pH	%N	%C	C/N
A ₁	7,75	0,29	5,65	19,48
(B)	7,35	0,11	0,70	6,36

Complejo de cambio:

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	1,54	17	1,31	0,52	0,38
(B)	10,48	2	0,43	0,52	0,25

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} + Mg^{++}}$
A ₁	19,21	20,75	92,57	0,030	0,05
(B)	3,2	13,68	23,39	0,026	0,31

d) Comentario:

- Suelo de textura francá arenosa en el horizonte orgánico y arenosa franca en el horizonte estructural (B).

- Está muy próximo al perfil 1 y solamente la vegetación es diferente por lo que las diferencias entre los compuestos húmicos de ambos suelos serán solo debido a la flora característica.

- La capacidad de cambio es baja aunque V es alto debido a la poca cantidad de H⁺ de cambio. Es importante la cantidad de meq. de Ca⁺⁺.

- La actividad biológica es intensa y se aprecian lombrices en el horizonte orgánico A₁.

e) Tipo de humus - Mull forestal.

Es muy difícil definir el subtipo porque si bien el V y el pH son altos, la relación C/N se encuentra en el límite mull-moder. Es necesario realizar un estudio más completo de la materia orgánica. Parece ser, más bien, un mull forestal mesotrofo.

Muestra nº 3

Suelo Rendsiniforme

a) Localidad: Gajanejos (Guadalajara)

Situación: Km. 82 de la carretera Madrid-Zaragoza a unos ---
300 m. a la derecha de la carretera.

Altitud: 1060 m.

Inclinación: llano

Formación geológica: calizas pontienses (mioceno)

Vegetación: Quercus ilex; Cistus laurifolius; Líquenes (Par-
melia perlata).

b) Perfil

A₀₀: 0-2 cm.

A₀: 2-2,2 cm.

A₁: 2,2-17 cm. Color 10YR 3/2

A₁/(B): 17-30 cm. Color 7,5YR 4/2

c) Análisis

Hor.	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer.	Arena muy fina	limo	arcilla
A ₁	4,87	3,50	17,10	26,27	29,9	11,55	31,84
A ₁ /(B)	4,78	3,60	9,05	18,09	18,94	34,80	28,17

Horizonte	pH	%C	%N	C/N	%CO ₃ ⁼
A ₁	7,60	7,21	0,48	15,02	12,48
A ₁ /(B)	7,65	2,64	0,22	12	17,07

Complejo de cambio

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	2,7	33	2,17	0,52	0,76
A ₁ /(B)	0	19	0,96	0,43	0,12

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} + Mg^{++}}$
A ₁	36,45	39,15	93,10	0,015	0,036
A ₁ /(B)	20,51	20,51	100	0,022	0,027

d) Comentario:

Suelo con textura franco-arcillosa

- Abundancia de carbonato cálcico, gran parte del cual es activo (11% para A₁ y 14,25% para A₁/(B))

- Capacidad de cambio elevada y complejo absorbente saturado de calcio y magnesio. Mucha materia orgánica.

- Muy buena estructura en la parte superficial.

e) Tipo de humus: mull cálcico de rendsina

Humificación media, los ácidos húmicos pardos equilibran a los ácidos húmicos grises, unidos fuertemente a la arcilla bien por intermedio del calcio (extraídos solo por la sosa previa descalcificación del suelo) o bien por los iones Fe y Al; en este último caso los compuestos no se extraen con la sosa a no ser -- previa extracción de los sesquióxidos libres y por ataque parcial de las arcillas con SO₄H₂ en caliente.

G AD JAR

U T

16
08

- 71 .
- 13,5°

ps=21,9°

p : 75

2

(m.)

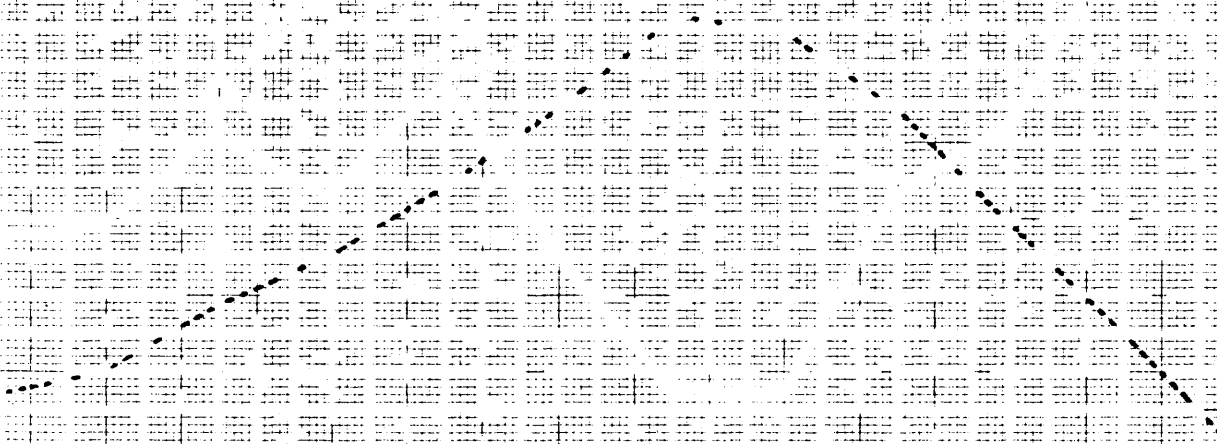
100

0

60

0

A J I A O N D



Muestra nº 4

Terra rossa

a) Localidad: Gajanejos (Guadalajara)

Situación: Km 96 de la carretera Madrid-Zaragoza a 20 m. a la derecha de la carretera.

Altitud: 1090 m.

Inclinación: llano

Formación geológica: calizas cretácicas

Vegetación: Quercus ilex; bosque degradado; gramíneas y líquenes

b) Perfil

A₀₀: 0-0,2 cm.

A₀: 0,2-2 cm.

A₁: 2-8 cm. Color 5YR 3/4

(B): 8-22 cm. Color 2,5YR 3/6

c) Análisis

Hor.	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer.	Arena muy fina	limo	arcilla
A ₁	0,84	2,32	8,73	12,01	20,09	23,45	44,42
(B)	1,06	2,45	6,50	10,28	18,51	13,20	58,01

Horizonte	pH	%C	%N	C/N	%CO ₃ ⁼
A ₁	7,05	5,62	0,37	15,19	1,13
(B)	7,40	1,51	0,13	11,62	0,42

Complejo de cambio:

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	5,61	23	2,35	0,61	0,76
(B)	3,57	18	0,96	0,52	0,25

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} + Mg^{++}}$
A ₁	26,72	32,33	82,64	0,026	0,05
(B)	19,73	23,30	84,68	0,028	0,09

d) Comentario:

- Suelo con textura arcillo-limosa en A₁ y arcillosa en(B).

+ Grado de saturación del complejo absorbente bastante alto, con buen porcentaje de calcio de cambio, que junto a la gran cantidad de arcilla proporciona una mezcla íntima de la materia mineral con la orgánica, favorecida además por la presencia de lombrices en el horizonte superior.

e) Tipo de humus:Mull forestal mesotrofo

En el horizonte superior los elementos húmicos están parcialmente saturados de calcio (humus Ca⁺⁺). La débil C/N ligado a una microflora activa provoca una descomposición intensa de la materia orgánica.

Muestra nº 5

Suelo pardo calizo forestal

- a) Localidad: San Millán de la Cogolla (Logroño)
Situación: Monasterio de Suso
Altitud: 820 m.
Orientación: S-Suroeste
Inclinación: 20%
Formación geológica: areniscas
Vegetación: Quercus lusitanica

b) Perfil

A₀₀: 0-0,5 cm.

A₀: 0,5-0,7 cm.

A₁: 0,7-3 cm. Color 5YR 3/4

(B): 3-10 cm. Color 5YR 4/4

c) Análisis

Hor.	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer.	Arena muy fina	limo	arcilla
A ₁	8,64	12,82	20,62	45,50	18,66	22,16	13,68
(B)	6,68	9,56	22,36	40,77	25,18	19,96	14,09

Horizonte	pH	%C	%N	C/N	%CO ₃ ⁼
A ₁	7,55	4,59	0,35	13,11	5,19
(B)	7,55	2,89	0,25	11,56	5,34

Complejo de cambio:

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	1,95	12	1,56	0,43	0,38
(B)	8,45	8	1,13	0,61	0,25

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} + Mg^{++}}$
A ₁	14,37	16,32	88,05	0,03	0,06
(B)	9,99	13,44	54,17	0,07	0,09

d) Comentario:

- Suelo con textura franca, baja capacidad de cambio - pero el complejo absorbente está prácticamente saturado de calcio.

- Fuerte actividad biológica y abundancia de carbonato cálcico, buena parte del cual está en forma "activa" aunque - no tanto como en el caso de la rendsina.

- Materia orgánica bastante abundante y unida a la materia mineral con formación de complejo arcillo-húmico. Debido a la acción de las lombrices hay también formación precoz de un -- complejo entre la arcilla y los restos orgánicos incompletamente descompuestos.

e) Tipo de humus: mull cálcico

La proporción de ácidos húmicos grises es parecida a - la de pardos aunque menor que en el caso de la rendsina.

OG OÑO

UES RA

-2.5

= 61°

ps 208-

p = m

10

m)

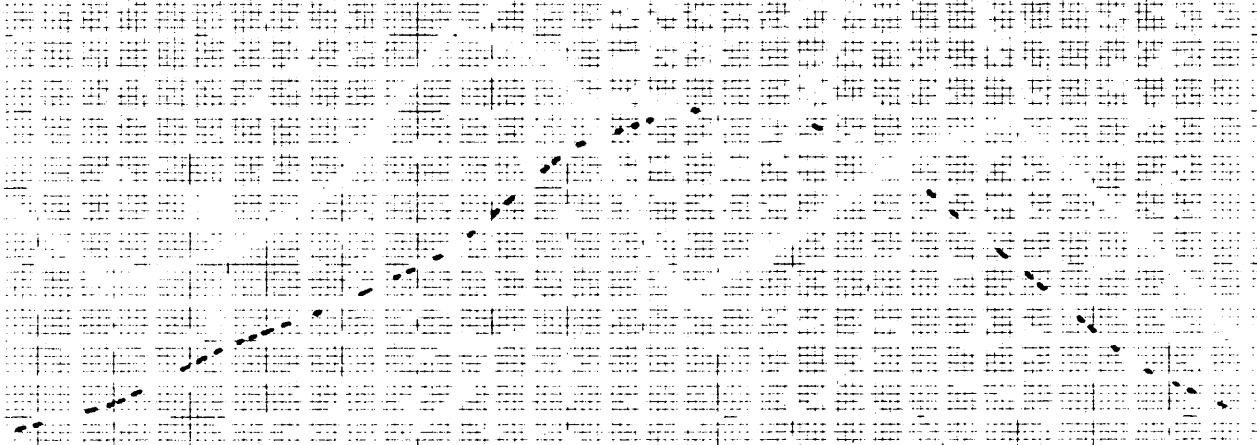
80

60

0

E M A J I A S O N D

0
0
0
0



Muestra nº 6

Tierra parda subhúmeda

a) Localidad: Carretera de Logroño-Burgos Km. 80; a la derecha de la carretera.

Altitud: 11020 m.

Orientación: S-SE

Inclinación: 15%

Formación geológica: conglomerados

Vegetación: Quercus tozza; gramíneas abundantísimas que forman almohadillado. Erica, Pteridium; musgos.

b) Perfil

A₀₀: 0-0,2 cm.

A₁: 0,2-8 cm. Color 10YR 4/3

(B): 8-14 cm. Color 10YR 5/4

c) Análisis

Hor.	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer.	Arena limo muy fina	arcilla	
A ₁	6,11	6,90	15,92	30,82	22,33	31,43	15,42
(B)	4,44	7,03	16,29	29,47	25,95	28,20	16,38

Horizonte	pH	%C	%N	C/N
A ₁	6,05	4,75	0,26	18,27
(B)	5,15	1,90	0,13	14,68

Complejo de cambio:

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	12,59	4	2,26	0,52	0,51
(B)	9,34	1	1,22	0,52	0,25

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} + Mg^{++}}$
A ₁	7,29	19,88	36,67	0,13	0,18
(B)	2,99	12,33	24,25	0,52	0,34

d) Comentario:

- Suelo con textura franco-limosa, sin apenas lavado de arcilla y pasándose sin transición desde el horizonte A₀₀ al A₁.

- Capacidad de cambio y grado de saturación bajo; poca cantidad de calcio de cambio.

- Actividad biológica intensa; en el horizonte A₁ se encuentran lombrices de tierra de gran tamaño.

e) Tipo de humus: Mull forestal oligotrofo

Predominio de los ácidos húmicos de bajo peso molecular sobre los más polimerizados.

R O
M E TR

M= 7
C= 48

P=5 3 m

- 06°

.5
=24,3°

10
(m.)

0

0

0

F M A J A S O D

Muestra nº 7

Tierra parda subhúmeda

- a) Localidad: a 2 Km. pasado el puerto de Piqueras (Logroño)
Situación: a 10 m. a la izquierda de la carretera
Altitud: 1590 m.
Inclinación: 25%
Orientación: Noroeste
Formación geológica: cuarcitas
Vegetación: Fagus silvatica

b) Perfil

- A₀₀: 0-0,2 cm.
A₀: 0,2-2 cm.
A₁: 2-10 cm. Color 7,5YR 3/3
(B): 10-20 cm. Color 7,5YR 4/2

c) Análisis

Hor,	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer,	Arena muy fina	limo	arcilla
A ₁	2,47	4,33	18,11	26,20	23,71	23,76	26,33
(B)	2,45	5,89	23,03	31,86	21,7	20,66	25,8

Horizonte	pH	%C	%N	C/N
A ₁	5,75	9,15	0,44	20,78
(B)	5,05	4,44	0,26	17,08

Complejo de cambio:

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	20,63	5	1,74	0,61	0,38
(B)	18,20	2	0,96	0,52	0,25

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ K^+}{Ca^{++} Mg^{++}}$
A ₁	7,73	28,36	27,26	0,12	0,14
(B)	3,73	21,93	17,01	0,26	0,26

d) Comentario:

- Suelo con textura franca, con buen contenido de arcilla.
- Bajo valor de S y mucho hidrógeno de cambio condicionan un grado de saturación bajo.
- Se observan la presencia de lombrices y miriápodos: - transformación biológica fuerte.

e) Tipo de humus: moder forestal:

Incorporación incompleta de la materia mineral con la orgánica, no hay formación del complejo arcillo-húmico; la microestructura está formada a base de microagregados orgánicos justapuestos a las partículas minerales.

La humificación es peor que en los mull y dominan los ácidos húmicos de bajo peso molecular.

LIQUERAS

M EST A

= 331 .m

= 84°

= 50,7

= ,

ps=18, m

T S=196°

140

100

0

60

40

0

T

A

M

J

Jl

A

S

O

N

D

Muestra nº 8

Suelo pardo calizo forestal

a) Localidad: Sta. M^a de Lebieña (Santander)

Situación: Carretera de Potes a Panes, Km 156, izda. carretera

Altitud: 160 m.

Inclinación: 45°

Orientación: S-SE

Formación geológica: calizas montaña (carbonífero)

Vegetación: Quercus ilex; zarza; gramíneas y leguminosas

b) Perfil

A₀₀: 0-0,2 cm.

A₀: 0,2-0,7 cm.

A₁: 0,7-4 cm.

(B): 4-36 cm.

c) Análisis

Hor.	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer.	Arena muy fina	limo	arcilla
A ₁	7,06	3,38	4,07	19,89	7,54	22,09	50,51
(B)	10,08	5,97	5,74	24,51	7,29	33,19	35,01

Horizonte	pH	%C	%N	C/N	%CO ₃
A ₁	7,40	8,23	0,58	14,19	4,39
(B)	7,55	5,47	0,43	12,72	4,74

Complejo de cambio

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	3,02	27	1,91	0,43	0,76
(B)	13,08	24	1,31	0,61	0,52

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} + Mg^{++}}$
A ₁	30,10	33,12	90,88	0,015	0,041
(B)	26,43	39,51	66,89	0,025	0,044

d) Comentario:

+ suelo con textura arcillosa en A₁ y franco-arcillosa en (B).

- Suelo con buena estructura, muy grumoso, intercalado con roca madre y con efervescencia a lo largo de todo el perfil.

- Materia orgánica abundante y bien humificada; grado de saturación alto. Calcio activo más bajo que en el caso de la rendsina (4,7% para A₁ y 5,2 para (B)).

e) Tipo de humus: mull. cálcico

Las condiciones climáticas y la vegetación condicionan una humificación mejor que en el caso de los suelos pardo calizo de la España semiárida. Sin llegar al caso de la rendsina, los ácidos húmicos grises se encuentran en buena proporción, aunque inferior al porcentaje en pardos.

ORR LAVEGA

MU STR

M=40
= .01

m

140

m.)

s=1.9°

10

80

0

0

F A M J J I A S O N D

Muestra nº 9

Ranker de Tangel

- a) Localidad: Puerto de Navacerrada (Madrid)
Situación: A 200 m. de la cima
Altitud: 1910 m.
Inclinación: 15%
Orientación: N-NE
Formación geológica: granito y gneis
Vegetación: Sorothanus purgans y Juniperus comunis, ssp-nana;
abundantes gramíneas

b) Perfil

- A₀₀: 0-0,1 cm.
A₀: 0,1-12 cm.
A₁: 12-60 cm.
C₁: (60-85) cm.

c) Análisis

Hor.	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer.	Arena muy fina	limo	arcilla
A ₁	16,47	23,08	20,60	64,46	16,47	10,08	8,90

Horizonte	pH	%C	%N	C/N
A ₁	4,45	6,22	0,43	14,47

Complejo de cambio:

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	33,60	0,5	0,08	0,26	0,12

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} + Mg^{++}}$
A ₁	0,96	44,56	2,15	5,2	0,65

d) Comentario:

- Suelo con textura franco-arenosa, muy suelto (sin grumos) y con muchas raíces.

- Buena proporción de materia orgánica y bajísimo grado de saturación en razón del valor muy elevado de hidrógeno intercambiable.

e) Tiipo de humus: tangel

Suelo de alta montaña (Navacerrada) donde debido a los fuertes contrastes climáticos, los abundantes restos vegetales - de *Sarrothanus purgans* y *J. communis* se descomponen rápidamente, al mismo tiempo que se produce una fuerte síntesis de ácidos húmicos de elevado peso molecular, compensando estos contrastes de clima, la escasez de bases.

P E R T D E N A C E R D

M E S T

-0,00

= 1 - P s = 53,4 mm

140

0

10

0

60

4

2

E F A J J A O N D

Muestra nº 10

Suelo pardo calizo forestal

- a) Localidad: Km. 31 de la carretera Salcedo a Pedraza (Segovia)
Situación: 200 m. a la derecha de la carretera
Altitud: 1100 m.
Inclinación: 30%
Orientación: N.
Formación geológica: calizas
Vegetación: Juniperus thurifera. Cistus ledaniferus; abundantes musgos y gramíneas; brotes residuales de antiguo bosque de encina.

b) Perfil

- A₀₀: 0-0,1 cm.
A₀: (0,1-0,2 cm.)
A₁: (0,2-4,5 cm. Color 10YR 3/2
(B): (4,5-24 cm. Color 10YR 6/6

c) Análisis

Hor.	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer.	Arena muy fina	limo	arcilla
A ₁	3,32	5,34	15,11	24,12	32,17	16,23	27,48
(B)	4,25	5,50	15,73	26,59	28,27	21,32	23,82

Horizonte	pH	%C	%N	C/N	%CO ₃ ⁼
A ₁	7,75	10,34	0,55	18,80	5,03
(B)	7,65	4,01	0,18	22,28	5,34

Complejo de cambio:

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	0	25	5,84	0,52	1,02
B	0	14	5,57	0,52	0,76

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} + Mg^{++}}$
A ₁	32,38	32,38	100	0,020	0,049
B	20,85	20,85	100	0,037	0,066

d) Comentario:

- Suelo con textura franca y buena grumosidad. Poco contraste de colores en el perfil.

- Los restos orgánicos se descomponen rápidamente y se entremezclan con la parte mineral del suelo.

- Materia orgánica muy abundante y complejo de cambio saturado en Ca⁺⁺. Efervescencia desde la superficie y calcio activo en las proporciones de 4,6% en A₁ y 1% en (B).

e) Tipo de humus: mull-moder cálcico

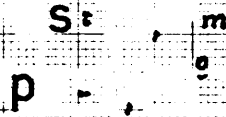
De acuerdo con el pH, V y C/N se trata de un mull-moder cálcico (mull likemoder, Kubiena, 1953). Análisis posteriores demuestran que hay muy poca cantidad de ácidos húmicos grises, lo que pone en evidencia la acción poco favorable de la sabina en la humificación.

MUESTRA

-22,
= 2

= 66

= 114°



0
0
0
0
0
0

00
0
60
4
20

F A M J I A O N D

Muestra nº 11

Limo rojo mediterráneo

a) Localidad: Carretera Guadalajara-Marchamalos-Usanos (Guadalajara)

Situación: Entre Marchamalos-Usanos a la izda. de la carretera

Altitud: 770 m. -

Inclinación: 5%

Orientación: S-SO

Formación geológica: limos fluviales con canturreal de cuarcita

Vegetación: Quercus lusitanica, Quercus coccifera, ssp fagina -

D.C; otras: Daphne guidium.

b) Perfil

A₀₀: 0-0,10 cm.

A₀: 0,1-4 cm.

A₁: 4-16 cm. Color 5YR 3/3

B: 16-38 cm. y más: Color 5YR 3/8

c) Análisis

Hor.	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer.	Arena muy fina	limo	arcilla
A ₁	2,23	5,63	20,89	29,26	28,74	12,44	29,56
B	2,09	4,63	18,45	26,15	22,64	17,37	33,84

Horizonte	pH	%C	%N	C/N
A ₁	7,25	5,10	0,32	15,94
B	7,15	1,89	0,067	28,21

Complejo de cambio:

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	0	18	3,04	0,43	0,51
B	3,25	12	2,79	0,43	0,51

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} + Mg^{++}}$
A ₁	21,98	21,98	100	0,023	0,044
B	15,73	18,99	82,83	0,027	0,063

d) Comentario:

- Suelo con textura franco arcillosa, muy plástico y de tono rojizo con ligero enriquecimiento de arcilla en el horizonte B.

- Complejo de cambio saturado en calcio y abundancia de materia orgánica.

- En el A₀ aparecen hifas de hongos

e) Tipo de humus: mull forestal mesotrofo

No hay predominio de ácidos húmicos grises sobre los pardos.

Muestra nº 12

Tierra parda meridional

- a) Localidad: Cadalso de los Vidrios a Rozas (L-49) (Madrid)
Situación: a la salida de Rozas, a la izda. de la carretera
Altitud: 860 m.
Inclinación: 20%
Orientación: N.NO
Formación geológica: granito y gneis
Vegetación: Castanea sativa (bosque puro). Se observa algo de gramíneas, musgos y líquenes

b) Perfil

A₀₀: 0-2 cm.

A₁: 2-8 cm. Color 10YR 3/2

(B): 8-40 cm. y más. Color 7,5YR 5/6

c) Análisis

Hor.	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer.	Arena muy fina	limo	arcilla
A ₁	17,94	18,03	22,90	62	10,24	16,28	11,48
(B)	13,33	17,70	21,29	55,14	13,57	10,97	20,32

Horizonte	pH	%C	%N	C/N
A ₁	6,15	2,54	0,095	26,74
(B)	5,25	2,84	0,067	12,54

Complejo de cambio:

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
A ₁	9,14	1	2	0,35	0,51
(B)	12,28	1	1,04	0,43	0,25

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} Mg}$
A ₁	3,86	13	29,69	0,35	0,28
(B)	2,72	15	18,13	0,43	0,33

d) Comentario:

- Suelo con textura franco-arenosa, de estructura muy suelta y en donde se pasa brúscamente de un horizonte A₀₀ grueso (presencia de hifas de hongos) a un A₁.

- Poca materia orgánica y complejo de cambio con mucha acidez.

e) Tipo de humus: moder forestal

La escasa proporción de "estabilizadores" del humus en el horizonte A₁ resulta desfavorable para la humificación. Sin embargo estudios posteriores de la materia orgánica han demostrado que en este moder hay un porcentaje muy alto de ácidos húmicos grises, lo que sin duda está originado por la influencia de la vegetación.

OZA

U S R 1

M-30,9

1.8

ps-38,

1

m.)

0

100

P

80

0

40

0

20

E A J I A O N



Muestra nº 13

Suelo pardo calizo forestal

- a) Localidad: Pantano de Bolarque (Guadalajara)
Situación: Carretera de urbanización "Nueva Sierra de Madrid"
a 1 Km. antes de llegar a la playa
Altitud: 770 m.
Inclinación: 25%
Orientación: N.E.
Formación geológica: calizas
Vegetación: Pinus halepensis.(fundamental). Otros: Juniperus
thurifera, Quercus lusitanica

b) Perfil

A₀₀: 0-0,3 cm.

A_F: 0,3-1,3 cm.

A_H: 1,3-1,8 cm.

Se tomaron dos muestras: 1(0-10 cm.) y 2(10-20 cm.).

c) Análisis

Hor.	Arena gruesa	Arena media	Arena fina	Arena amer.	Arena muy fina	limo	arcilla
1	4,80	4,12	15,04	24,86	26,05	16,79	32,30
2	3,44	4,09	19,87	28,10	19,24	16,39	36,27

Horizonte	pH	%C	%N	C/N	%CO ₃ ⁼
1	7,85	5,93	0,17	34,88	4,69
2	7,95	2,71	0,16	25,45	4,87

Complejo de cambio:

Horizonte	H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
1	3,89	27	3,48	0,47	0,64
2	0	20	4,53	0,47	0,51

Horizonte	S	T	V	$\frac{Na^+}{Ca^{++}}$	$\frac{Na^+ + K^+}{Ca^{++} + Mg^{++}}$
1	31,59	35,48	89,04	0,017	0,036
2	25,51	25,51	100	0,023	0,039

d) Comentario:

- Suelo con textura franco- arcillosa.
- El horizonte A₁ es poco profundo y pasa bruscamente - al horizonte (B) en el que penetra la materia orgánica.

e) Tipo de humus: mor cálcico

Humus bruto muy particularmente formado sobre caliza en condiciones desfavorables; hay transición con el moder.

A T O E B L R Q E

MUESTRA

M= 3,

P 56,

13,

Pps=94, m

T s=22,

0

(m.m)

80

60

0

F A J A S N D

CAPITULO IV

LOS ACIDOS HUMICOS: CONOCIMIENTOS ACTUALES SOBRE SU NATURALEZA Y COMPOSICION.

Podemos definir los ácidos húmicos según Steelink como "la porción de la materia orgánica del suelo soluble en bases e insoluble en los ácidos minerales y el alcohol".

Naturalmente, la idea que se tiene de estas sustancias es más precisa y determinada. Las moléculas de ácidos húmicos tienen:

- a) Diferentes grupos funcionales: hidroxilos de fenoles y alcoholes, carboxilos, carbonilos, metoxilos, quinónicos y anillos bencénicos.
- b) Posibles sustancias reductoras:
- c) Compuestos de nitrógeno en forma cíclica y periférica.

a) Grupos funcionales.-

Fuchs (1929) ya determinó en un ácido húmico los siguientes grupos funcionales: grupos carboxilos (por medio de metilación con ClH metanólico) y grupos hidroxilos fenólicos (por pos-

-terior metilación exhaustiva).

Sobre la base de sus resultados experimentales pudo establecer cuantitativamente la presencia de 4 carboxilos y 3 grupos fenólicos en la citada molécula; también había presentes grupos OH alcohólicos que no eran metilados con diazometano pero si con dimetilsulfato.

Shumuk demostró la presencia de grupos hidroxilos y fenólicos en los ácidos húmicos de un chernozem, por medio de la formación de complejos ésteres del ácido benzoico durante su reacción con cloruro de benzoilo; sin embargo, estas investigaciones solo tenían un carácter cualitativo.

Además de los grupos carboxilos, fenólicos y alcohólicos, los ácidos húmicos también tienen grupos metoxilos en una proporción de 1-2%.

Los grupos quinómicos también están presentes; el doble enlace $-CH=CH-$ y el grupo carbonilo también pueden ser determinados. Los grupos carbonilos se determinan por formación de oximas con 2-4 denitrofenil-hidrazona (el exceso de ésta se determina polarográficamente).

Hoppe-Seeler fué el primero en demostrar la presencia de anillo aromático en los ácidos húmicos de una turba por fusión con KOH a la temperatura de 245°C; entre los productos encontrados estaban la pirocatequina y el ácido protocatético.

Shumuk (1924) fué el primero que demostró la presencia del anillo aromático en los ácidos húmicos de un chernozem. En la fusión encontró indol y derivados del pirrol, indicando la presencia de aminoácidos aromáticos en la molécula de ácido húmico; igualmente demostró la presencia de polifenoles y ácido protocatético.

Diversos tratamientos de los ácidos húmicos con diferentes agentes han dado lugar a compuestos en los que figuraba el anillo bencénico.

Scharpenseel (1960) usando cromatografía de partición de papel detectó durante los productos de fusión alcalina y oxidación con nitrobenzeno, compuestos tales como pirocatecol, pirogarol y ácido protocatético.

La hidrólisis ácida realizada en nuestro laboratorio con los ácidos húmicos de unas turbas de Padul y Mazagon han demostrado la existencia de: ácido vaníllico, ácido siringico, ácido benzoico y sus derivados. Semejantes resultados hemos obtenido en los ácidos húmicos de un ranker y de un podsol.

La presencia de componentes de la lignina (vanillina y aldehído siríngico) en los hidrolizados, indica que la lignina y otras sustancias de las plantas participan en la formación de los ácidos húmicos. El infrarrojo también demuestra la presencia del anillo. La absorción a 1510 cm^{-1} se utiliza para establecer relaciones de densidad óptica.

Wright y Schnitzer (1961) han determinado el carácter aromático de las fracciones de un podsol (A_0 y B_1). El extracto de NaOH 0,5N es agitado con Amberlita 120 y la solución (evaporada a sequedad) se eleva a 170°C durante 500 horas, La débil corriente de aire que pasa por el tubo de combustión oxida los átomos de carbono alifáticos y acíclicos mientras que los compuestos aromáticos subsisten.

La oxidación del carbonó no fenólico engendra generalmente grupos carboxilos; por diferencia con el carbono y el hidrógeno total se sabe la cantidad de carbono y de hidrógeno aromáticos.

b) Sustancias reductoras en la composición de los ácidos húmicos del suelo.-

No está todavía claro si la molécula de ácido húmico - contiene o no sustancias reductoras, aunque esta información es muy interesante desde el punto de vista de la naturaleza y origen de los ácidos húmicos.

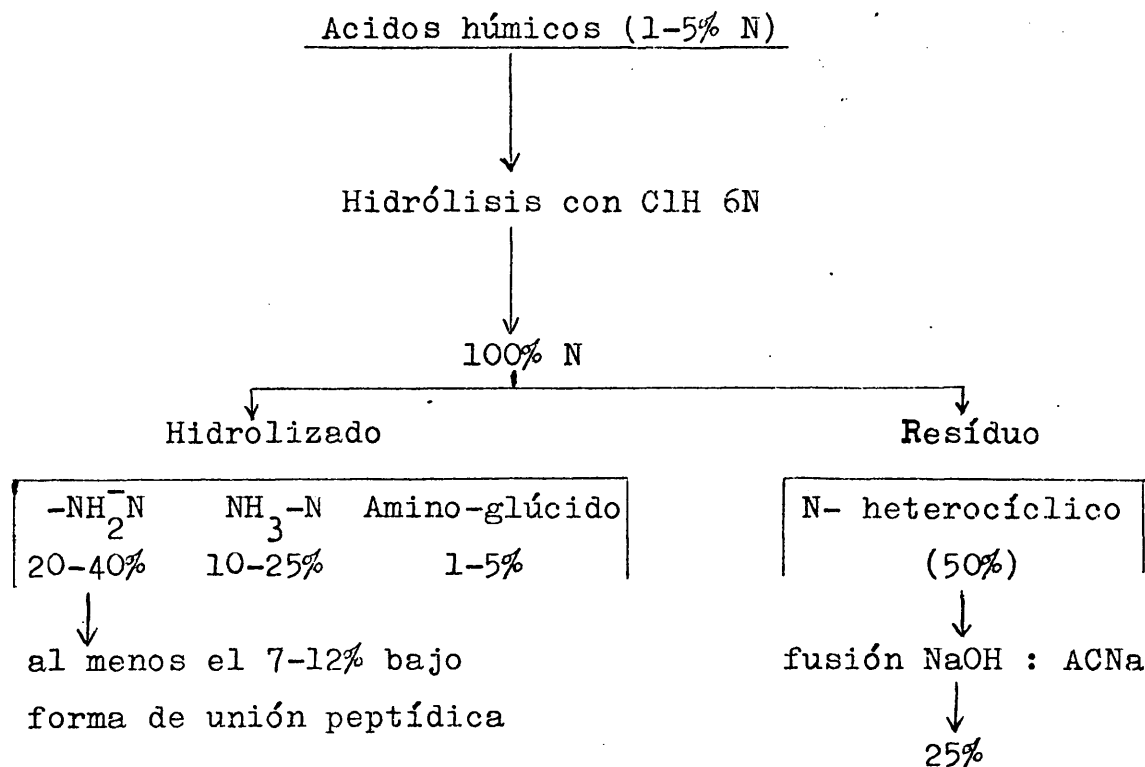
Reinitzer (1960) demostró que las sustancias húmicas reducían el líquido de Fehling, pero Shmuck (1924) no encontró sustancias reductoras durante la investigación de los ácidos húmicos de un chernozem; consideró que Reinitzer trabajaba con soluciones no muy puras y que la capacidad reductora era debida a una mezcla de carbohidratos.

Los posteriores trabajos de Dragunov (1950) confirmaron la presencia de sustancias reductoras en los ácidos húmicos; su cantidad depende, sin embargo, del método de purificación de la solución obtenida por hidrólisis del ácido húmicos. Si el hidrolizado no se purifica por el método comunmente empleado (acetato e hidróxido de bario), entonces el contenido de sustancias reductoras era el 11% pero si se purifica solo era del 3%.

Investigaciones posteriores han demostrado la presencia de pentosas, hexosas, ácido galacturónico y otros compuestos de naturaleza carbohidratos.

c) El nitrógeno de los ácidos húmicos.-

La cantidad está comprendida entre el 1-5%. El siguiente esquema es muy representativo:



Es un dato muy importante saber la "composición elemental" de la molécula de ácidos húmicos; es diferente según sean las condiciones naturales de formación del humus. Kononova (1961) ha publicado un estudio sobre la composición elemental de ácidos húmicos y fúlvicos de una serie de suelos desde los podsoles a los chernozem, observando como el porcentaje de carbono aumenta y en cambio disminuye el de oxígeno e hidrógeno al pasar del podsol al chernozem.

El decrecimiento de H es más grande que el de oxígeno y por eso la relación O/H va aumentando. Esto indica la existencia de un mayor número de grupos hidróxilos y una oxidación más alta en los ácidos húmicos de un podsol que en los de un chernozem -- donde los procesos de deshidratación y oxidación ocurren más tarde.

También va disminuyendo la relación C/H (grado de aromaticidad) al pasar del chernozem al podsol (la naturaleza de los ácidos húmicos se hace menos compleja).

Los ácidos húmicos están unidos a la materia mineral formando el complejo arcillo-húmico diferente según el tipo de suelo; es muy difícil eliminar la arcilla del ácido húmico y los métodos de precipitación de las mismas implican ciertos riesgos; en nuestro laboratorio hemos demostrado que el añadir SO_4Na_2 al extracto húmico no solamente se produce la precipitación de las arcillas sino también de los ácidos húmicos de mayor grado de polimerización (demostrado por electroforesis).

El contenido en cenizas en los ácidos húmicos dializados es del orden del 15-25% y para eliminarlas el método más corrientemente utilizado es el de Butler que emplea una mezcla de FH-ClH en partes iguales y que permite obtener ácidos húmicos con solo 1% de cenizas.

Tomando como base los datos experimentales de la composición elemental, el peso molecular, la presencia de grupos funcionales, la cantidad de nitrógeno en sus diferentes formas y el anillo bencénico, se pueden predecir distintas estructuras; todas tienen de común asignar una estructura tipo en la que se incluyen los aspectos fundamentales sin detallar la localización de grupos funcionales. Difieren sin embargo en la naturaleza del núcleo: bencénico, fenólico, quinónico o heterocíclico.

Thiele sugiere que la estructura de los monómeros -- consta de núcleo bencénico, grupo reactivo ($-\text{COOH} - \text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{OCH}_3$) y puentes ($-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{NH}-$, $=\text{N}-$, $-\text{CH}_2$).

Dragunov considera que la molécula de ácido húmico es

un producto de la condensación de compuestos aromáticos con productos de la descomposición de las proteínas y la posible participación de sustancias de naturaleza hidrocarbonada

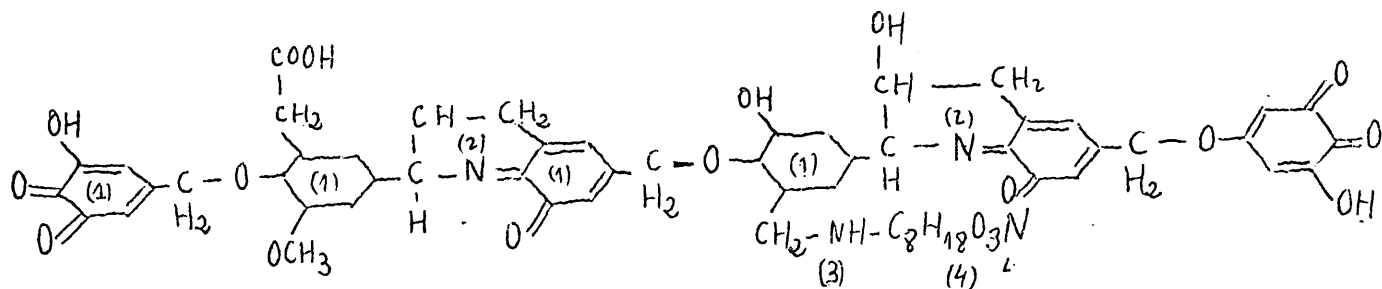


Fig. 1-B.- Estructura de la molécula de a.húmico según Dragunov
 (1): anillos aromáticos del tipo di y trihidroxifenol , parte de los cuales tiene un doble enlace de - grupos quinona
 (2): nitrógeno en forma cíclica
 (3): nitrógeno en cadenas periféricas
 (4): residuos carbohidratos.

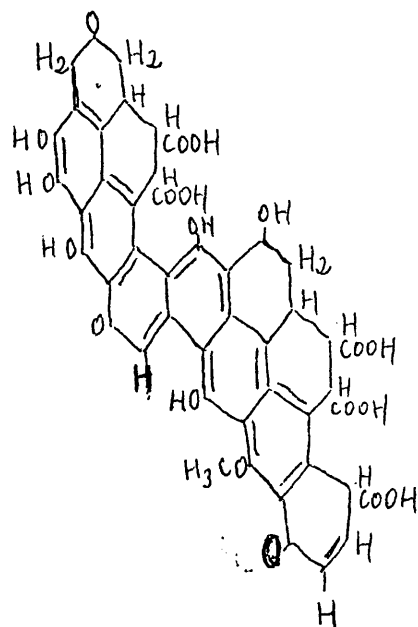


Fig.1-C.- Estructura según Fuchs

Sin discutir los esquemas en detalle parece que la estructura de Dragunov es mejor que la de Fuchs, puesto que representa no solamente los compuestos aromáticos (lignina principalmente), sino también compuestos que contienen nitrógeno y sustancias reductoras que tienen su fuente en el plasma microbial.

El esquema de Dragunov ha sido aceptado por casi todos los investigadores; sin embargo, este esquema es aproximado y necesita un ulterior desarrollo. La "unidad estructural" de la molécula no ha sido definida. Esta estructura unidad la componen monómeros que se cambian para dar polímeros.

Las uniones entre esta estructura unidad y los monómeros se forman con puentes de oxígeno y también por medio de enlaces $-NH-$; $-N-$; $-S-$; $-CH_2-$ y otros.

Los ácidos fúlvicos poseen las mismas "unidades estructurales" pero con menor carácter aromático.

Flaig sostiene que las sustancias húmicas son el producto final de la secuencia iniciada con la degradación y demetilación de la lignina a polifenoles sustituidos, seguida por oxidación a quinonas y su condensación con unidades aminoácido.

Sin embargo, (Alexandrova), ciertos microorganismos pueden sintetizar, utilizando glucosa, compuestos semejantes a los ácidos húmicos. Igualmente se forman a partir de restos vegetales de algas y hongos (que no poseen lignina); todo esto excluye a la lignina como fuente esencial de formación de los ácidos húmicos.

Según Swaby y Ladd los ácidos húmicos resultan de una combinación de aminoácidos con fenoles y quinonas por su grupo $-NH_2$. La polimerización se haría por radicales libres.

Felberck supone una estructura parecida a la de Ladd -

pero tomando como unidad central un monómero poli-heterocíclico.

Podemos deducir que los compuestos húmicos ofrecen una gran homogeneidad de estructura: son edificios más o menos complejos contruidos a expensas de unidades estructurales muy parecidas; esta unidad estructural está formada de un núcleo esférico aromático (fenólico o quinónico) y de cadenas periféricas alifáticas (urónicos, péptidos, sacáridos). En los ácidos fúlvicos, el núcleo aromático es poco importante en relación con las cadenas alifáticas; en los ácidos húmicos ocurre al revés: la cantidad de núcleo aromático aumenta de las formas más móviles y menos polimerizada (pardos) a las más condensadas (grises).

Según Dubach, el enlace químico entre las cadenas alifáticas y los núcleos aromáticos parece ser poco sólida y fácilmente rompible, principalmente en los ácidos fúlvicos, lo que -- explica que se separen fácilmente por cromatografía.

En los últimos 15 años se ha conseguido un aumento importante en el conocimiento del humus debido principalmente al uso de nuevas técnicas de separación y caracterización de los -- productos de degradación.

Actualmente, parece claro que una parte de las sustancias húmicas son consecuencia de la actividad microbiana. Por ello se presenta como muy esperanzadora esta moderna línea de trabajo.

Es evidente el caracter heteropolímero de las sustancias húmicas. Igualmente, los términos "ácidos húmicos", "ácidos fúlvicos" se vienen sustituyendo por el más genérico de sustancias húmicas, de acuerdo con la realidad.

Con toda probabilidad, el futuro próximo conducirá a -- resultados muy concluyentes en el campo de los compuestos húmicos.

CAPITULO V

DISCUSION SOBRE LOS METODOS DE EXTRACCION DE LA MATERIA ORGANICA. -

a) Extracción de las sustancias húmicas del suelo:

Solamente una pequeña parte de las sustancias húmicas - del suelo se encuentran en estado libre; la mayor parte están más o menos unidas con los minerales del mismo. Esta unión debe destruirse si queremos que estas sustancias se solubilicen.

Los métodos a seguir para conseguir esta extracción --- son muy variados y es necesario admitir que ninguno de ellos da -- resultados satisfactorios.

Esta separación es muy delicada y no puede hacerse de -- manera rigurosa; hay varias razones: primero, la existencia de --- productos intermedios mal definidos y segundo, la dificultad de -- encontrar un reactivo de extracción capaz de aislar selectivamen- te y sin alterar los compuestos húmicos existentes en el suelo.

Las tentativas para utilizar disolventes orgánicos no -- han dado buenos resultados: los compuestos orgánicos extraídos -- están poco alterados pero la extracción no es completa. Scheffer y colaboradores han utilizado sucesivamente acetona, etanol, dio- xano, dimetilformamida, piridina. Denel (1960) utiliza EDTA como

agente acomplejante.

Tinsley (1956) utilizó el ácido fórmico

El agente de extracción más corrientemente utilizado es el pirofosfato sódico, que por su poder desacomplejante, disocia en parte los humatos férrico y cálcicos. Otros autores, y en particular los rusos (Tyurin), aumentan la cantidad de los -- compuestos húmicos extraídos elevando el pH de los reactivos de extracción. Kononova-Belchikova (1961) proponen utilizar conjuntamente una mezcla de pirofosfato-NaOH con el fin de extraer la fracción de humus unido íntimamente a la arcilla.

Más recientemente, Duchaufour y Jacquin (1966) para permitir una disociación entre productos realmente existentes en el suelo y productos de neoformación, propone utilizar sucesivamente soluciones de pirofosfato a pH crecientes y una última extracción con NaOH. Pero la neoformación puramente artificial de los compuestos húmicos que se producen a expensas de la materia orgánica reciente o a partir de los compuestos ya polimerizados, arrastra un error en todos los métodos que operan a pH mayor que 10, según han demostrado estos mismos autores.

Schnitzer (1968) propone la utilización de resinas cambiadoras de iones para solubilizar la materia orgánica presente en los suelos. Vamos a proceder a un estudio más detallado de estos extractantes:

1) NaOH.-

Reactivo muy empleado desde hace mucho tiempo.

Extrae prácticamente todos los compuestos húmicos, pero

ofrece muchas dificultades:

a) Disolver la sílice, contaminando este elemento mineral la fracción orgánica separada.

b) Disolver compuestos orgánicos tales como la lignina y la hemicelulosa.

c) Provocar una autoxidación de los constituyentes de la materia orgánica del suelo.

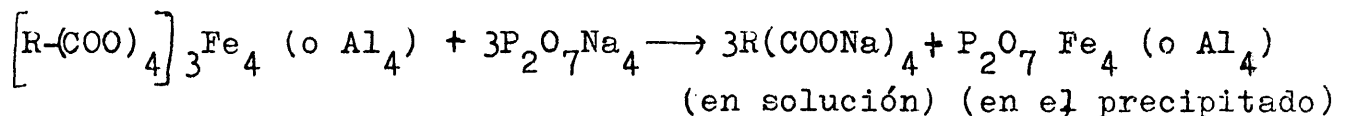
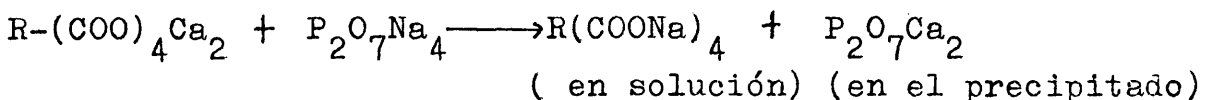
d) Por su pH elevado produce neoformaciones en los ácidos húmicos.

e) Hidroliza proteínas, polisacáridos y produce reacciones de condensación entre los compuestos aminados y aldehidos o fenoles.

f) No extrae los ácidos húmicos unidos al calcio, a no ser previa decalcificación del suelo.

2) Sales sódicas.-

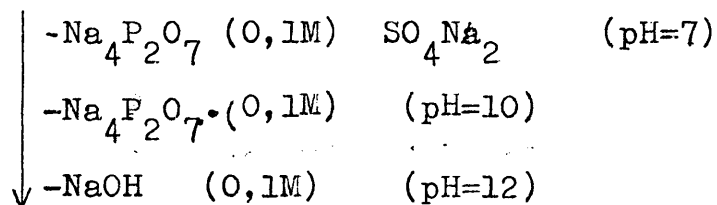
Para evitar los inconvenientes de la NaOH, se emplean sales alcalinas. El pirofosfato sódico y otras sales de ciertos ácidos orgánicos como oxalato, citrato y tartrato sódico, forman precipitados insolubles con los iones calcio, hierro, aluminio y otros cationes metálicos con los cuales están unidas las sustancias húmicas del suelo.



El pH de la solución es muy importante: al aumentar, la cantidad de compuestos húmicos es mayor. La solución de pirofosfato sódico a pH bajo solo extrae las sustancias húmicas que están en estado libre o formando humatos de calcio, hierro o aluminio, tal como se demuestra en el cuadro siguiente: (Kononova):

	Podsol	Chernozem
0,1M $P_2O_7Na_4$ pH= 8,3	10%	22,4%
Kononova	22,5%	37%
NaOH 0,1 (Tyurin)	18,3%	37,4%

Es decir, que para una extracción más completa, es necesario emplear soluciones más alcalinas, pero eso trae consigo el problema de la neoformación. Jacquin (1966) y Duehaufour han propuesto el método de la triple extracción a pH creciente que permite ir obteniendo las sustancias húmicas de menor a mayor grado de polimerización:



Separan la materia orgánica libre por densitometría y extraen en ambas fracciones (ligada y libre) los ácidos húmicos y fúlvicos.

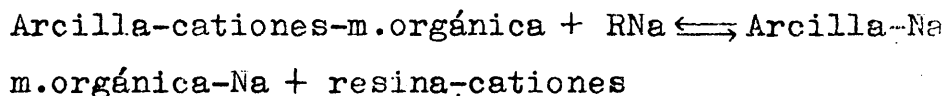
3) Extracción con resinas.-

Un cambiador de iones es un cuerpo químico que posee la propiedad de fijar, de manera reversible, los iones presentes en una solución. Después de haber utilizado las zeolitas como cambidores naturales, los químicos emplean actualmente polímeros constituidos de redes hidrocarbурadas tridimensionales. Lo más corriente es que se traten de cadenas muy largas unidas por puentes de divinil-benceno.

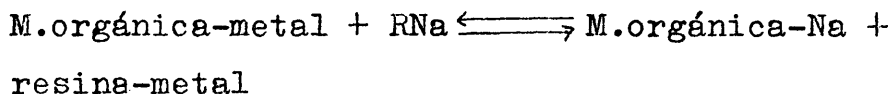
Sobre estos núcleos se fijan grupos funcionales ionizados que confieren a las resinas la propiedad de cambidores de iones.

Los complejos órgano-minerales y órgano-metálicos son más o menos disociados o descomplejados en contacto con la resina catiónica y el proceso de solubilización de los compuestos húmicos bajo forma sódica se puede esquematizar de la siguiente forma:

a) Caso de un complejo arcillo-húmico:



b) Caso de un complejo órgano-metálico



La resina catiónica mas empleada es la Dowex 50w (50-100 mallas) en forma sódica. La resina aniónica Dowex 2x8 (50-100 mallas, forma OH) utilizada conjuntamente con la catiónica, tiene por objeto fijar los aniones intercambiables y precipitar bajo forma de hidróxidos ciertos cationes tales como hierro y aluminio -- que se encontrasen en forma libre en el medio.

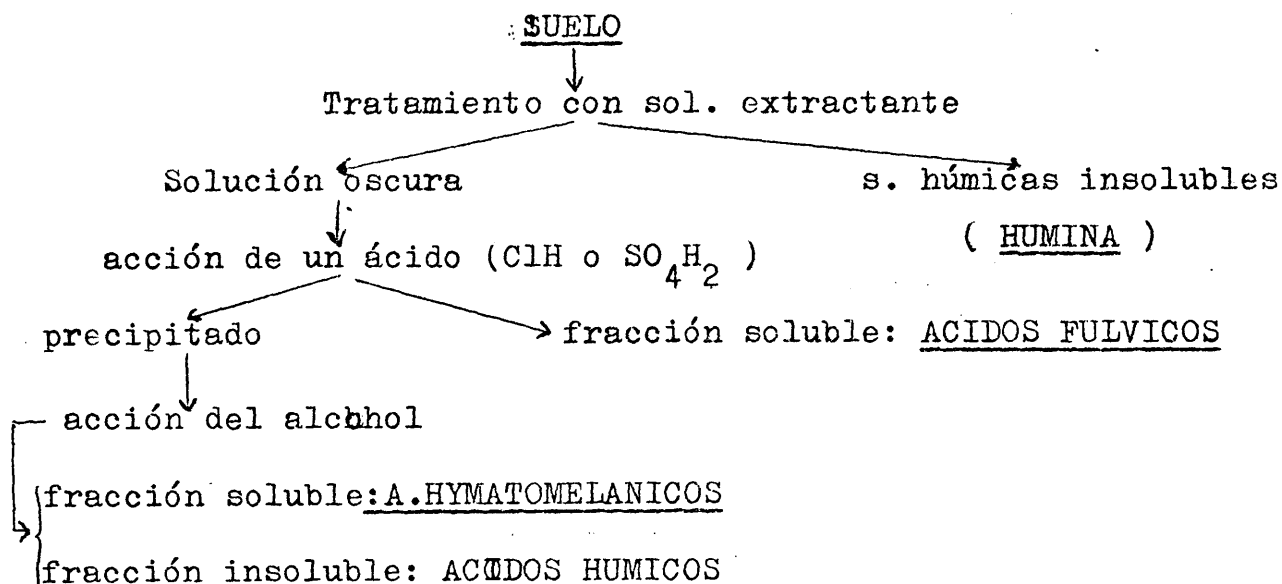
Calvez (1970) ha demostrado que las resinas solubilizan ~~la~~ materia orgánica exclusivamente por intermedio de los cationes asociados a esta última bajo forma intercambiable.

Los ácidos húmicos extraídos con resinas parecen presentar un grado de polimerización elevado, si bien, se caracterizan por fuertes uniones con la materia mineral (gran contenido de cenizas). Esto nos hace sospechar que la extracción por resinas no se lleva según el esquema indicado anteriormente, sino de forma mas compleja y hasta ahora, no bien conocida.

Nosotros hemos utilizado el método de Kononova (1960) para la extracción de los compuestos húmicos; utiliza una mezcla de pirofosfato-hidróxido sódico 0,1M.

EXTRACCION Y SEPARACION DE LOS COMPUESTOS HUMICOS: METODO DE KONONOVA.-

1) SEPARACION.-



2) EXTRACCION .-

En un erlermeyer de 250 ml. se colocan
5 gr. de suelo y 100 ml. de sol. extrac-
tante recién preparada (4,46 gr. de --
 $P_2O_5Na_4 \cdot 10 H_2O$ y 4 gr. de NaOH)

↓
Reposar durante 16-18 horas manteniendose
bien cerrado para evitar la contaminación
del CO_2 atmosférico

↓
Centrifugar

↓
Solución
(extracto alcalino)

↙
ACIDOS HUMICOS Y FULVICOS

↘ 5-10 ml. para hallar %C

25-40 ml. de sol.

↓
precipitar con SO_4H_2 1:1 hasta
pH:1 agitando

↓
Calentar a 80° 30 minutos

↓
Dejar reposar una noche

↓
Filtrar

→ Sol.: ACIDOS FULVICOS

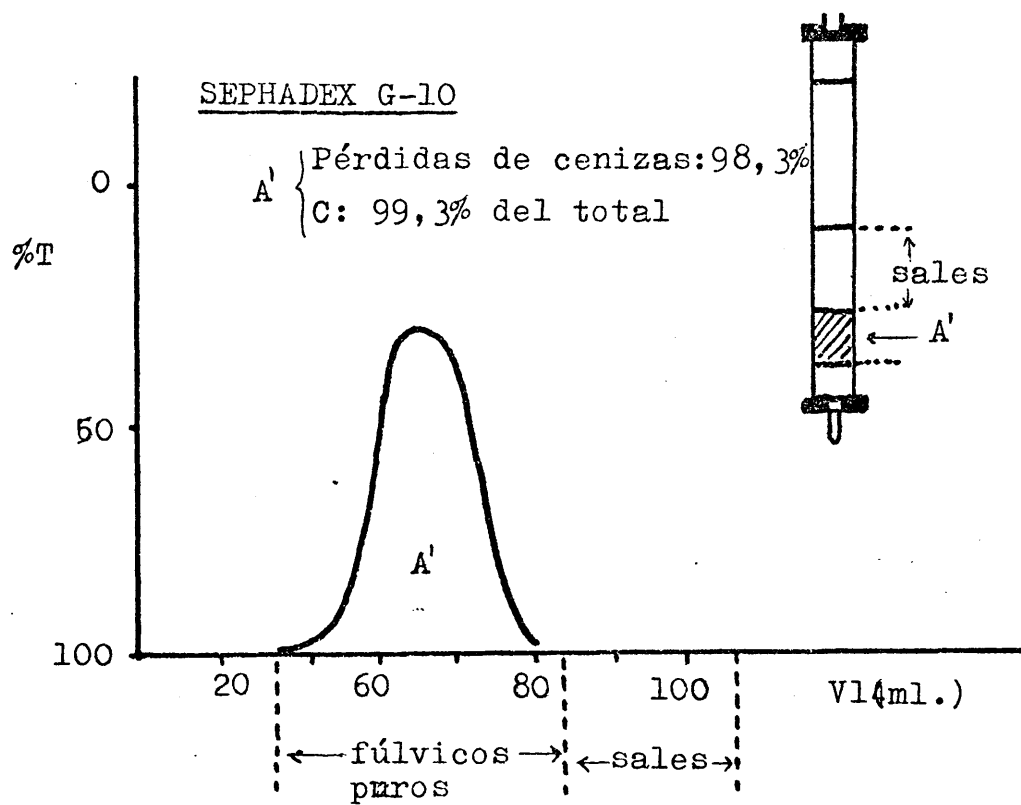
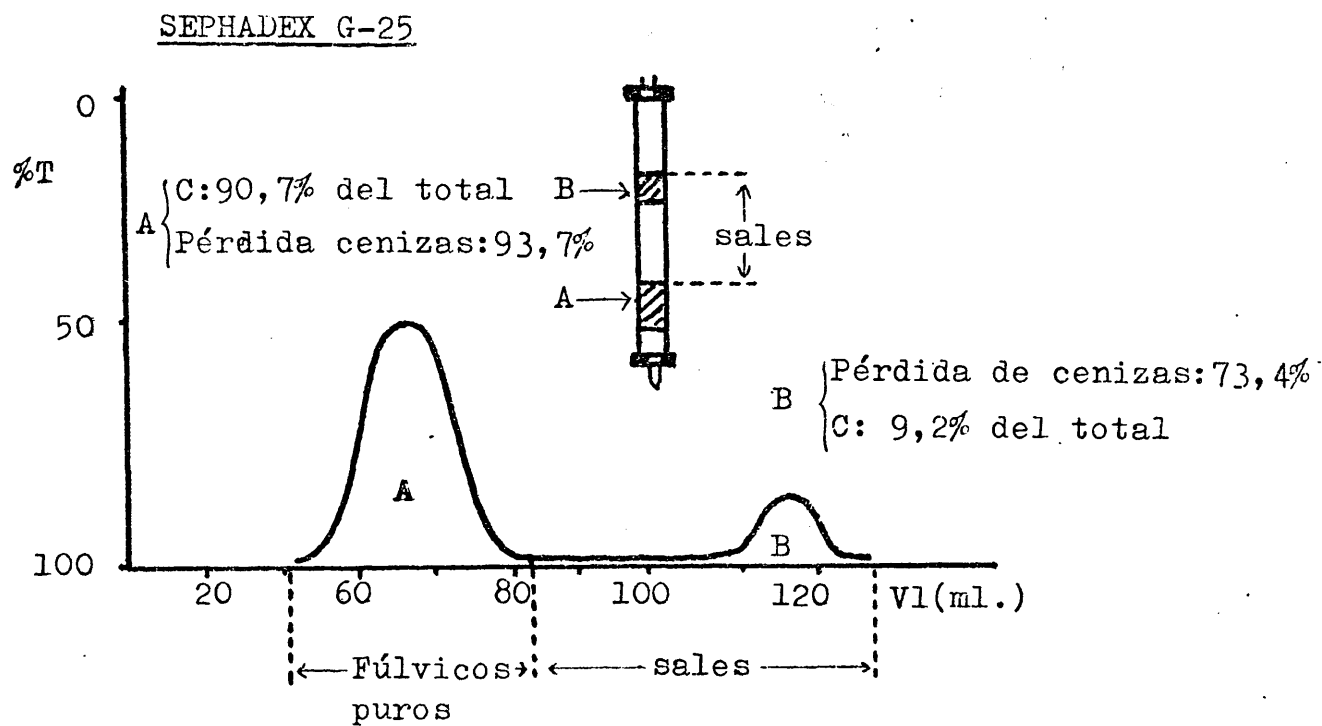
↙ Precipitado: A.HUMICOS

↓
Calcular el % C

↓
Lavar con a. sulfúrico 0,05N

↓
Disolver el precipitado en -
NaOH 0,05N en caliente

↓
Dejar enfriar y valorar el %C



Fif. 1-D.- Purificación de ácidos fúlvicos por gel-filtración

b) Métodos de purificación.-

Los ácidos húmicos se purifican por electroforesis y los fúlvicos por gel-filtración con Sephadex. Este último método lo hemos desarrollado en nuestro laboratorio con gran éxito y -- permite una separación casi total de las sales inorgánicas que -- acompañan a estos compuestos, trabajando a pH aproximado a 4 y -- con pequeñas cantidades de C (5-10 mg.); el eluyente empleado es agua destilada y la columna utilizada fué la de K25/45.

En efecto, en la fig. 1-D se demuestra como el Sephadex G-25 fino separa netamente dos fracciones muy diferentes en cuanto a tamaños moleculares, la última de las cuales contiene una cantidad importante de cenizas y además representa cerca del 10% de la materia orgánica total introducida en la columna. En cambio utilizando Sephadex G-10 fino solo se observa una fracción que va inmediatamente detrás de las sales y que, además de representar la casi totalidad de la muestra orgánica, presenta una pérdida casi total de cenizas (98,3%).

Un estudio de purificación por resinas cambiadoras de iones no dió resultado porque retienen parte de materia orgánica.

c) Caracterización de las formas de humus.-

Hemos seguido el criterio de Duchaufour de acuerdo con el siguiente esquema:

TIPOS DE HUMUS

Tipo	Horizontes	pH	C/N	V	Subtipos
Mull cálcico	A ₀ =muy delgado	>7	10 (A ₁)	100	Mull cálcico rendsina Mull cálcico estepa Mull-moder cálcico
Mull forestal	A ₁ =poco espeso	5,5	<20 (12-15)	20-60	Mull eutrofo Crypto-mull Mull ácido Hidromull
Moder	A = 2-3 cm. A ₁ ⁰ =sin límite neto	4-5	15-25	10-20	Moder forestal Hidromoder Moder alpino Moder cálcico
Mor	A = 5-10 cm. A ₁ ⁰ = 2-5 cm.	3,5 4,5	A ₀ 30-40 A ₁ =25	≤10	Xeromor Hidromor Mor cálcico

R E S U L T A D O S

Estudio cuantitativo.-

Todos los resultados están dados en forma de C y corresponden al horizonte orgánico A₁, utilizándose para la extracción de las sustancias húmicas el método Kononova.

%AH: tanto por ciento de ácidos húmicos

%AF: tanto por ciento de ácidos fúlvicos

%AH_{ca}: tanto por ciento de ácidos húmicos unidos al calcio

F/H: relación ácidos fúlvicos a ácidos húmicos

C_t: tanto por ciento de carbono total del suelo

Grado de humificación: $\left(\frac{\%AH + \%AF}{C_t} \right) \times 100$

Muestra	%AH	%AH _{ca}	%AF	F/H	grado de humificación
1	$\frac{0,75}{(19,63)}$	$\frac{0,11}{(2,8)}$	$\frac{0,46}{(12,04)}$	0,61	31,67
2	$\frac{1,43}{(22,31)}$	$\frac{0,26}{(4,6)}$	$\frac{1,08}{(19,11)}$	0,75	34,42
3	$\frac{1,76}{(24,41)}$	$\frac{1,12}{(15,53)}$	$\frac{0,89}{(12,34)}$	0,5	36,75
4	$\frac{1,26}{(22,4)}$	$\frac{0,43}{(7,65)}$	$\frac{0,86}{(15,3)}$	0,69	37,72
5	$\frac{0,93}{(20,21)}$	$\frac{0,65}{(14,13)}$	$\frac{0,54}{(11,73)}$	0,6	31,95

Muestra	%AH	%AH _{ca}	%AF	F/H	grado de humificación
6	$\frac{1,10}{(23,15)}$	$\frac{0,34}{(7,16)}$	$\frac{0,66}{(13,89)}$	0,6	37,05
7	$\frac{1,66}{(18,14)}$	$\frac{0,68}{(7,43)}$	$\frac{1,13}{(12,35)}$	0,67	30,50
8	$\frac{1,62}{(19,68)}$	$\frac{0,66}{(8,02)}$	$\frac{1,04}{(12,63)}$	0,64	32,32
9	$\frac{1,94}{(31,18)}$	---	$\frac{0,92}{(14,79)}$	0,47	45,98
10	$\frac{1,53}{(14,8)}$	$\frac{0,9}{(8,7)}$	$\frac{0,92}{(8,9)}$	0,60	23,7
11	$\frac{0,76}{(14,9)}$	$\frac{0,49}{(9,52)}$	$\frac{0,53}{(10,39)}$	0,7	25,2
12	$\frac{0,53}{(20,86)}$	---	$\frac{0,36}{(14,17)}$	0,68	35,03
13	$\frac{1,44}{(24,28)}$	$\frac{0,6}{(10,0)}$	$\frac{1,01}{(17,03)}$	0,7	41,30

Las cifras del denominador indican el porcentaje respecto al carbono total del suelo, que en el caso de realizar un estudio comparativo es mucho mas útil que el referido al tanto por ciento respecto al suelo ya que muchas veces la separación entre horizontes es muy difícil distinguirla y esto trae un error en la toma de muestras.

Los valores mas altos en C de ácidos húmicos corresponden al ranker, a la rendsina y al suelo pardo calizo forestal con vegetación de *Pinus halepensis*.

Un dato muy interesante es la cantidad de ácidos húmicos unidos al calcio. La determinación se realiza mediante dos extracciones independientes: con pirofosfato-NaOH y con NaOH solo (sin previa decalcificación del suelo). Como el hidróxido sódico no extrae los ácidos húmicos unidos al calcio, por diferencia entre el carbono de las dos extracciones obtenemos un valioso dato relativo al grado de complejamiento del catión con la molécula de ácido húmico. Los valores mas altos corresponden a la rendsina y al suelo pardo calizo con vegetación de *Quercus lusitanica*.

Un detalle muy importante: los ácidos húmicos del ranker y de la tierra parda meridional con bosque de *Castanea sativa* tienen un grado de polimerización muy alto y sin embargo no tienen calcio de unión con su molécula ; esto indica la importancia de otros factores (condiciones climáticas y vegetación) en el proceso de humificación.

La relación ácidos fúlvicos/ácidos húmicos, directamente relacionada con el grado de polimerización de los ácidos húmicos es menor en la rendsina y en el ranker pero luego todos los valores están comprendidos entre 0,6-0,7 lo que no permite diferenciar de una forma clara y neta el grado de polimerización ba-

-sándose simplemente en esta relación; es necesario acudir a la electroforesis y a la gel-filtración para determinar la naturaleza íntima de estos compuestos húmicos.

El grado de humificación varía entre el 45,98% del ran- ket y el 23,7% del suelo pardo calizo del sabinar; los valores -- son bastantes bajos, cosa lógica teniendo en cuenta las condicio- nes de formación de estos suelos de la España semiárida.--Sin em- bargo, también es baja en la muestra que se ha tomado como modelo (8); por eso es necesario admitir que hay una fracción orgánica más o menos humificada (humina) que no se extrae con pirofosfato - NaOH a pesar del pH elevado y del poder complejante de la sol. ex- tractante.

D E N S I D A D O P T I C A Y F L O C U L A C I O N

La densidad óptica depende de la estructura y es propor- cional al contenido de dobles enlaces conjugados. La idea del -- grado de condensación del anillo aromático (Orlov 1960; Jacquin - y Mangenot (1960); Kononova (1966)).

El umbral de coagulación, es decir la mínima cantidad - de electrolito necesaria para la coagulación completa de una sol. de humato sódico en un tiempo dado, es un dato muy interesante. El grado de dispersión de los ácidos húmicos es inversamente pro- porcional a la razón entre las estructuras aromática y alifática

y por eso los ácidos húmicos con predominio de cadenas lineales - son los más resistentes a las electrolitos. Velasco (1966).

1) Preparación de las soluciones de ácidos húmicos.-

Los ácidos húmicos se precipitan del extracto alcalino con ácido sulfúrico 1:1, se lavan con ácido diluido y se disuelven en bicarbonato sódico 0,02 N . La concentración de carbono - de iguala a 136 mg./litro de humato sódico. El pH final debe estar comprendido entre 7,2-9,8.

2) Estudio de la densidad óptica.-

La medición de la absorbancia se realizó con un espectrofotómetro Zeiss PMQ II, utilizando como control una solución de bicarbonato sódico 0,02 N.

Se utilizaron las siguientes longitudes de ondas ($m\mu$):
726-665-615-574-533-446-465

3) Estudio de la floculación con Cl_2Ca

En una serie de tubos de ensayo se colocan desde 2,5 a 40 meq. de calcio/ litro de solución ; se completa a 1 ml. con agua destilada y se añaden 5 ml. de la solución que se ha utilizado para medir la densidad óptica. Al cabo de 2 y de 4 horas se anota el comienzo de la turbidez y de la coagulación, así como la intensidad de floculación.

R E S U L T A D O S

a) Densidad óptica de los ácidos húmicos extraídos por el método Kononova:

Muestra	λ (m μ)						
	726	665	619	574	533	496	465
1	0,092	0,155	0,235	0,335	0,46	0,63	0,81
2	0,088	0,140	0,23	0,325	0,45	0,61	0,78
3	0,145	0,25	0,375	0,55	0,77	1,04	1,34
4	0,079	0,135	0,205	0,305	0,43	0,59	0,76
5	0,076	0,15	0,215	0,31	0,445	0,62	0,81
6	0,07	0,135	0,20	0,32	0,43	0,60	0,77
7	0,07	0,12	0,21	0,295	0,40	0,55	0,71
8	0,115	0,19	0,29	0,42	0,59	0,80	1,024
9	0,155	0,31	0,45	0,64	0,88	1,21	1,56
10	0,06	0,112	0,185	0,29	0,43	0,60	0,79
11	0,062	0,123	0,205	0,325	0,46	0,65	0,86
12	0,125	0,215	0,325	0,46	0,61	0,81	1,07
13	0,06	0,115	0,20	0,31	0,45	0,62	0,80

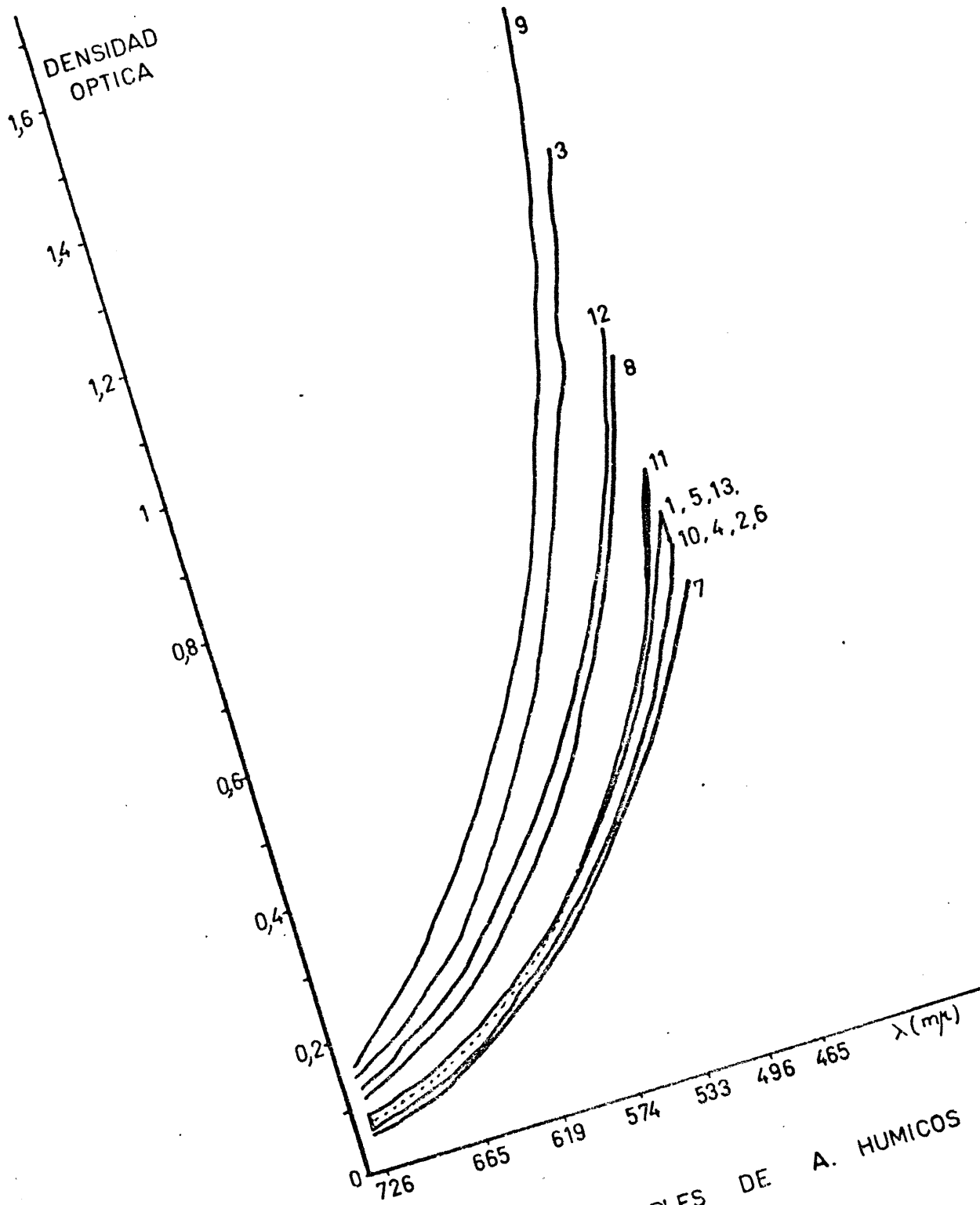


FIG. 2 : ESPECTROS VISIBLES DE A. HUMICOS

El grado de condensación del anillo aromático en la molécula de ácido húmico disminuye en el sentido:

$$9 > 3 > 12 > 8 > 11 > 1 > 5 > 13 > 10 > 4 > 2 > 6 > 7$$

La influencia del reactivo de extracción es notoria.-- Utilizando NaOH se observa como disminuye la densidad óptica en los suelos calizas :

Muestra	λ (m μ)						
	726	665	619	574	533	496	465
3	0,09	0,14	0,19	0,30	0,45	0,65	0,85
5	0,06	0,14	0,21	0,31	0,44	0,58	0,75
8	0,07	0,12	0,17	0,25	0,36	0,51	0,67
10	0,06	0,10	0,15	0,22	0,33	0,48	0,65
13	0,03	0,04	0,06	0,08	0,12	0,17	0,24

La razón ha sido mencionada anteriormente: el hidróxido sódico no rompe la unión Ca-ácido húmico.

Welte (1955) considera que valores altos de la relación de densidades ópticas a 465 dividido por la correspondiente a 665 m μ indican una polimerización débil, en contraposición a los valores bajos que, como en los chernozem (3,5) indican una fuerte polimerización en los ácidos húmicos.

Los valores de esta razón Q4/6 son:

Muestra	12	9	1	3	8	5	2
Q4/6	4,97	5,06	5,22	5,36	5,38	5,4	5,58

Muestra	4	6	7	11	13	10
Q4/6	5,63	5,7	5,9	6,99	7,04	7,05

Las diferencias entre los primeros es muy pequeña; sin embargo en los tres últimos se aprecia una considerable disminución de la polimerización con respecto a los demás.

B) Umbral de coagulación en meq.Cl₂Ca/litro de humato sódico (extracción de a.húmicos por método Kononova):

Muestra	Suelo	2 horas		4 horas	
		Turbidez	Floculación	Turbidez	Floculación
1	T.p.meridional	12,5	20(M)	12,5	20(F)
2	T.p.meridional	15	20(D)	12,5	20(M)
3	Rendsina	10	15,5(M.F)	10	15,5(MF)
4	Terra Rossa	12,5	17,5(M)	12,5	17,5(M)
5	S.p.calizo	17,5	20(M)	17,5	20(M.F)
6	T.p.subhúmeda	20	22,5(M.D)	20	22,5(D)
7	T.p.subhúmeda	17,5	27,5(D)	17,5	20(D)
8	S.p.calizo	10	17,5(M)	10	17,5(F)
9	Ranker tangel	5	10(M.F)	5	10(M.F)
10	S.p.calizo	12,5	20(M)	12,5	20(M)
11	Limo rojo	12,5	20(M)	10	20(M)
12	T.p.meridional	10	17,5(D)	10	17,5(F)
13	S.p.calizo	17,5	20(D)	17,5	20(D)

Las letras entre paréntesis indican la intensidad de -
floculación: D= débil, F= fuerte, M= media.

De acuerdo con esta tabla, se llega al conocimiento de -
que la razón entre las estructuras aromática y alifática disminuye
en el sentido:

9 > 3 > 12 > 8 > 4 > 5 > 1 > 10 > 11 > 2 > 13 > 7 > 6

En este mismo sentido va aumentando la movilidad de los
ácidos húmicos y su mayor participación en la descomposición de los
minerales del suelo al mismo tiempo que van presentando cualidades
menos favorables como agentes formadores de una buena estructura.

Cuando la extracción de los a. húmicos se realiza con -
NaOH los valores de la floculación disminuyen de acuerdo como ex-
presa la siguiente tabla (meq. Cl_2Ca /l. de sol. a las 2 horas):

Muestra	tipo de suelo	Floculación
3	Rendésina	20
5	S. pardo calizo	17,5
8	S. pardo calizo	40
10	S. pardo calizo	22,5
13	S. pardo calizo	22,5

CAPITULO VI

FRACCIONAMIENTO DE LOS ACIDOS HUMICOS

Los compuestos húmicos son muy heterogéneos y es posible separarlos en fracciones por métodos basados en sus diferente naturaleza y propiedades.

Un posible método es la precipitación fraccionada a diferentes pH. Flaig (1955) lo ha utilizado para estudiar los ácidos húmicos. Rydalevskaya (1961) fraccionaba los ácidos húmicos por precipitaciones graduales con sexquióxidos a varios pH.

Sowden y Denel (1961) extraen las sustancias húmicas del horizonte B_h de un podsol y las fraccionan con cationes polivalentes en columnas de celulosa.

Flaig (1958) y Sheffer (1958) utilizaron la ultracentrifugación. Hayasky y Nagai (1960), Scholz (1969) y Kononova (1960) utilizaron carbón activo para fraccionar las sustancias húmicas.

Sdarpenseel (1960) y Singh (1960) han utilizado la cromatografía de papel para separar los a. húmicos en varias zonas.

Kononova y Bel'chikova (1960) y Dorado (1968) han aplicado la cromatografía de papel circular al fraccionamiento de los ácidos húmicos.

Tyurin distingue tres grandes categorías de ácidos húmicos:

- 1) Acidos húmicos libres poco polimerizados (pardos), extraídos directamente con sosa diluida
- 2) Acidos húmicos ligados al calcio, extraídos por sosa des

pués de una previa decalcificación.

3) Ácidos húmicos ligados a la arcilla por los iones Fe^{+3} y Al^{+3} ; no se disuelven en sosa mas que por tratamientos precedentes seguidos de una eliminación de sesquióxidos con ácido sulfúrico.

Las dos últimas categorías pertenecen a la denominación " grises " .

La valoración cuantitativa de ácidos húmicos grises y pardos no se puede hacer por métodos químicos ordinarios y por esta razón hay que acudir a técnicas relacionadas con sus propiedades físico-químicas tales como la diferente movilidad iónica y el tamaño molecular

1) ESTUDIO ELECTROFORÉTICO

Métodos electroforéticos.-

La electroforesis sobre papel permite un fraccionamiento de las sustancias húmicas en función de las diferencias de movilidad en un campo eléctrico. Es preciso tener en cuenta varios factores: a) factores externos: diferencia de potencial, naturaleza de la solución tampón y fuerza electroosmótica. b) factores internos: tamaño molecular, grupos funcionales y grado de unión a la materia mineral.

El desplazamiento de las sustancias húmicas varía en función del voltaje aplicado; si es alto se favorece la movilidad y por

,pero aparecen fenómenos secundarios como el calentamiento. Normalmente oscila entre 5-20 voltios/cm. Se recomienda refrigerar para evitar evaporación.

La naturaleza de la solución tampón no interviene mas -- que en el caso de que exista una posibilidad de reacción entre -- dicha solución y las sustancias húmicas; por el contrario, la influencia del pH es muy importante: Coulson (1959) observa que a pH:3 no se registra ninguna movilidad pero si se aprecia ya a -- pH:6. Se suelen utilizar dos tampones principalmente:

1º Tampón de Clark y Lubs descrito por Brunel (pH:7,4)

- Sol. de fosfato monopotásico M/5.... 50 ml.
- Sol. de NaOH N/5..... 30 ml.
- Agua destilada hasta completar a200 ml.

2º Tampón Borax descrito por Coulson y Evans (pH:9)

- 9,54 gr. de tetraborato sódico en 1 litro de agua

Además de la fuerza electroforética, también actúan sobre las sustancias emigrantes la fuerza electroósmica producida -- por la carga eléctrica que el papel de filtro, como sistema capilar, adopta frente al líquido tampón. Por tanto, se transmite al líquido del tampón, que muestra carga eléctrica positiva frente al papel, y en consecuencia, ofrece una corriente en sentido del cátodo; de esta manera, la movilidad de los iones cargados positivamente se incrementará, mientras que la de los iones negativos disminuirá.

La verdadera velocidad de desplazamiento para una proteína con carga negativa sería:

$$d = d_e - (d_o + d_v)$$

siendo:

d_e : distancia recorrida por electroforesis

d_o : desplazamiento de electroósmosis

d_v : desplazamiento causado por evaporación

En cuanto a los factores internos, se ha demostrado que la movilidad es tanto mayor cuanto mayor es el contenido de grupos funcionales y menor es el contenido de arcilla y el tamaño -- molecular

Aparatos y métodos.-

En esencia, cualquier aparato de electroforesis consiste en dos cubetas en las que se deposita una mezcla tampón al pH y fuerza iónica conveniente; la comunicación entre ambas cubetas se lleva a cabo por tiras de papel previamente humedecidas con la misma mezcla tampón; en este papel se deposita la muestra cuyos componentes queremos separar.

El aparato completo consta de:

a) Cubetas y dispositivo para mantener la mezcla tampón y el papel.

b) Fuente de energía para producir una corriente continua con un voltaje graduable.

Hoy, la cámara electroforética se fabrica para que el papel ocupe una posición horizontal. Las dos cubetas de los electrodos se comunican por medio de un tubo de caucho; las cubetas se dividen cada una por un tabique en dos compartimentos, asegurándose la comunicación por un orificio relleno de lana de vidrio que impide la difusión de los productos de la reacción. Se reco-

-mienda invertir los electrodos de vez en cuando para evitar toda polarización unilateral.

Los ácidos húmicos precipitados con ClH (mejor que con SO_4H_2 que perjudica al desarrollo electroforético) se disuelven en NaOH 0,5N en una proporción aproximada de 20 mgC/ml. de NaOH y se aplican sobre el papel 5-10 μ l. El tiempo de desarrollo para tira de papel de 32 x 4,5 cm. es de 3 horas.

Los electroforegramas se secan horizontalmente al aire y a la temperatura del laboratorio.

Lectura de los electroforegramas.--

1º Luz visible.-- El examen de los electroforegramas -- muestra inmediatamente un fraccionamiento de los ácidos húmicos en varias bandas coloreadas. Estas bandas más o menos difusas -- caracterizan el poder migratorio de un campo eléctrico. La observación directa da una primera estimación; sin embargo es preciso acudir a un método más preciso para determinar con rigor la posición y la importancia de cada fracción

2º Con Fotómetro registrador ZEISS II.-- Este aparato -- permite medir de una manera automática la intensidad de la coloración de las diferentes bandas. Así se puede construir una gráfica de %T frente a la distancia recorrida por la fracción desde el origen.

La evaluación de las superficies delimitadas por los sectores correspondientes a las bandas coloreadas permite obtener la proporción de diferentes ácidos húmicos así separados. -- (móviles e inmóviles y su relación).

3º Con lámpara ultravioleta.-- La exposición de los -- electroforegramas sea a los vapores ácidos o amoniacaes, permite observar diferencias.

4º Densitómetro "Chromoscan".-- Representa directamente el %T frente a los cm. recorridos por la muestra y permite una lectura directa del área de las distintas fracciones separadas. Este ha sido el aparato utilizado.

La velocidad de la línea de base fue de 60 cuentas/mi nuto.

Los electroforegramas de los ácidos húmicos son exactamente los obtenidos por el aparato directamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

La electroforesis permite separar netamente dos fracciones principales: la una, generalmente de color gris y débil movilidad; la otra, siempre de color pardo y de fuerte movilidad. La relación fracción inmóvil/fracción móvil nos da idea del grado de polimerización .

Esta separación ha sido ya obtenida por diferentes investigadores, Coulson (1959), Kauritcher (1960) y Duchaufour (1963).

Hemos hecho un estudio cuantitativo utilizando los -

pH antes mencionados. La diferencia fundamental estriba en que a pH más bajo la movilidad disminuye como se demuestra en la figura 3, en donde se comparan los electroforegramas de los ácidos húmicos (extraídos con pirofosfato-hidróxido sódico) de un rancker de tangel y de una rendsina, con las dos diferentes soluciones tampones. En el caso del rancker, hay una disminución de la movilidad electroforética tanto en los ácidos húmicos más -- polimerizados como en los menos, mientras que en los de rendsina solo se aprecia esta disminución en el caso de los ácidos -- húmicos má móviles. Las condiciones experimentales de trabajo fueron las mismas en los dos casos: la única variación ha sido el pH.

Para este estudio cuantitativo se siguieron los criterios de Duchaufour y Jacquin, que utilizan el pH neutro.

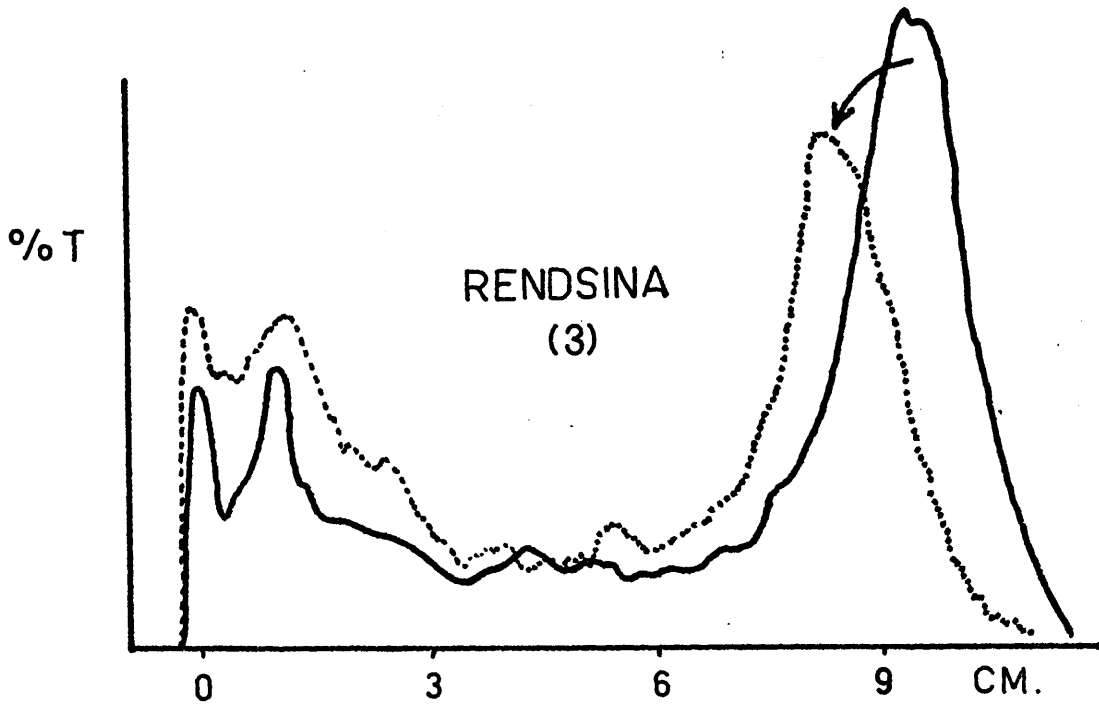
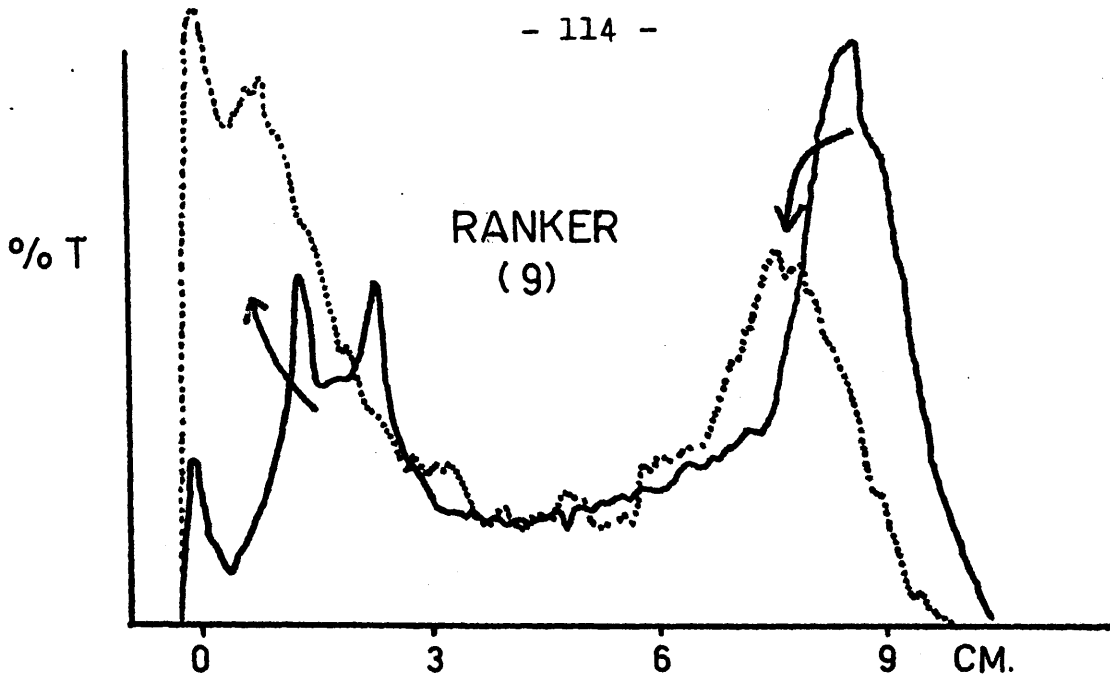


FIG.3 INFLUENCIA DEL pH EN LA ELECTROFORESIS DE A. HUMICOS: ——— pH=9
----- pH=7,2

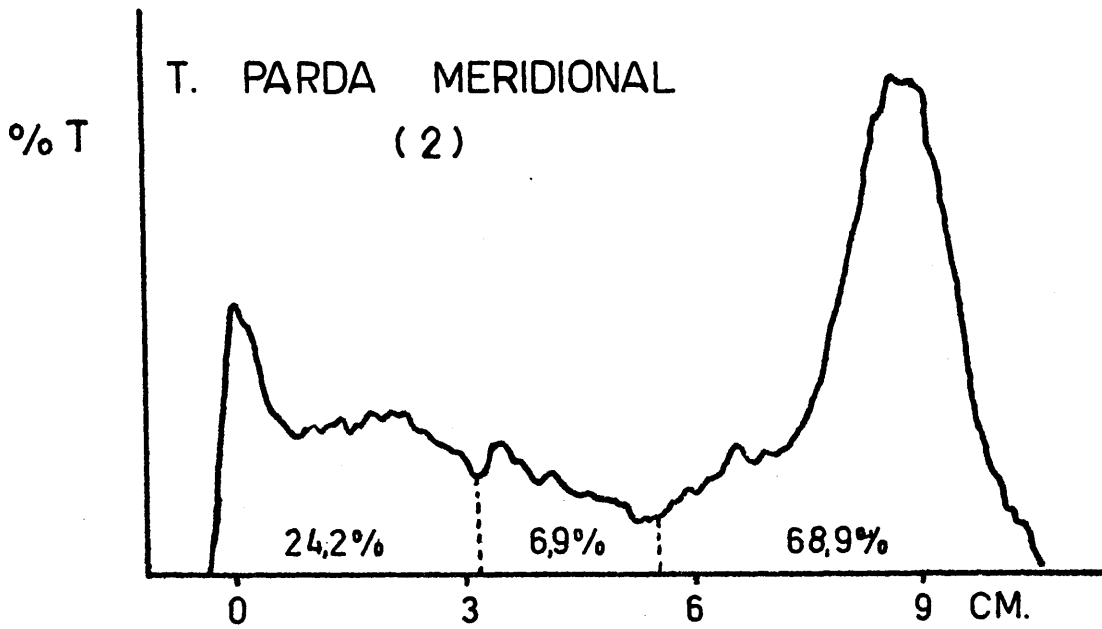
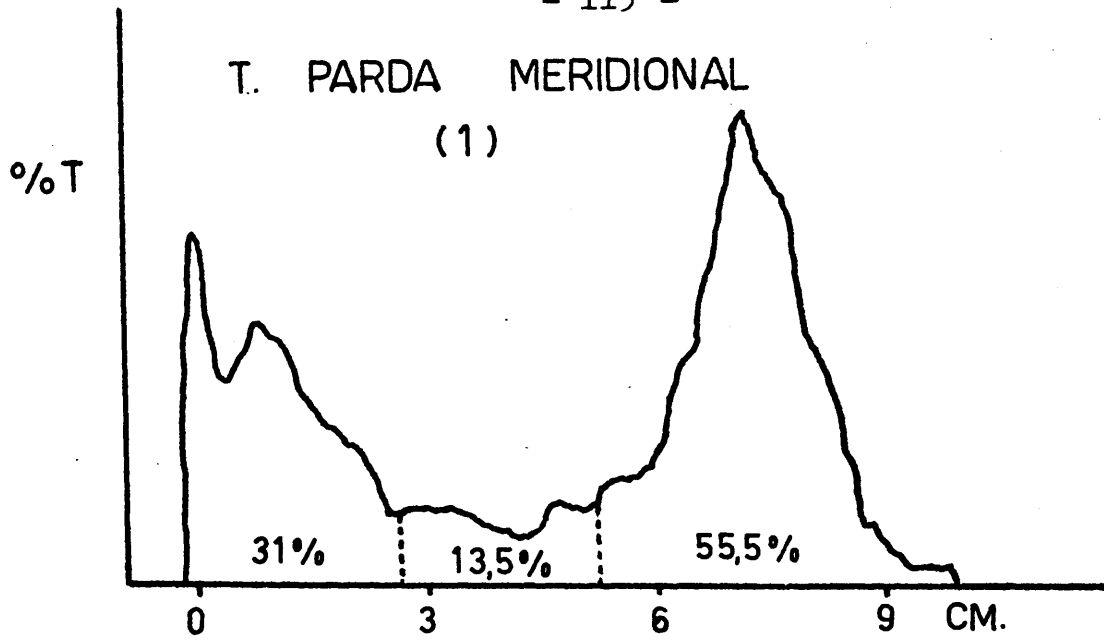


FIG. 4 ELECTROFOREGRAMAS DE A. HUMICOS

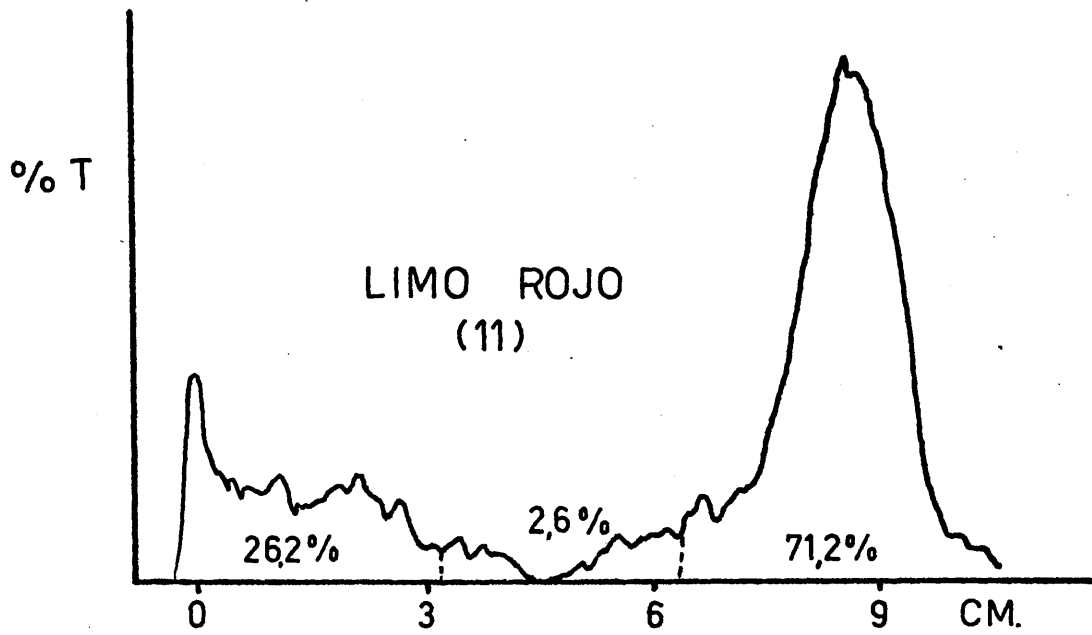
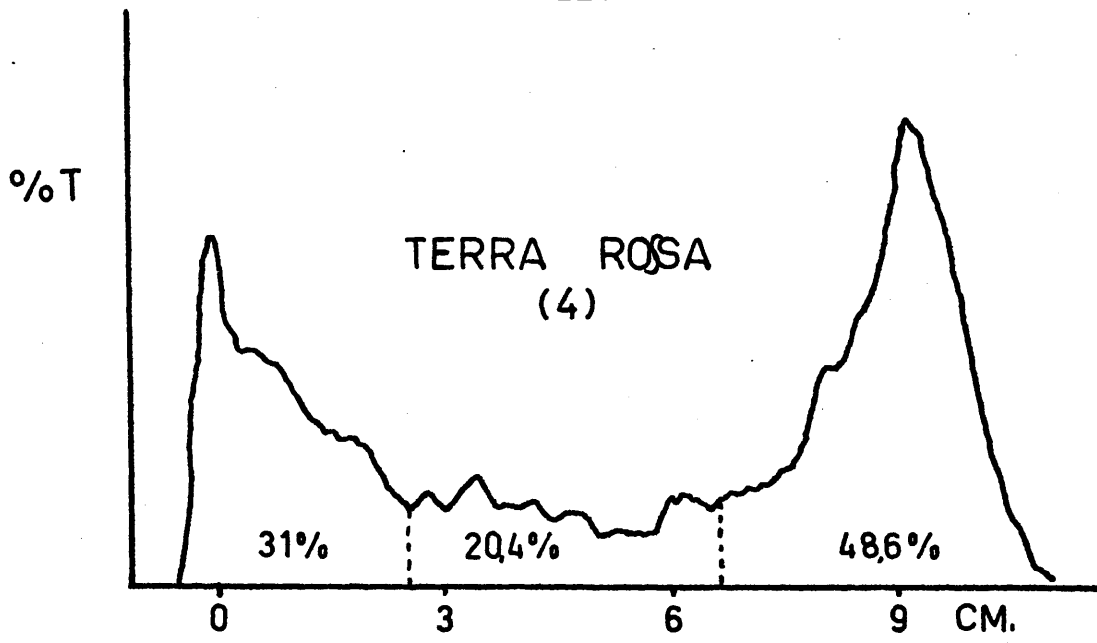


FIG. 5 ELECTROFOREGRAMAS DE A. HUMICOS

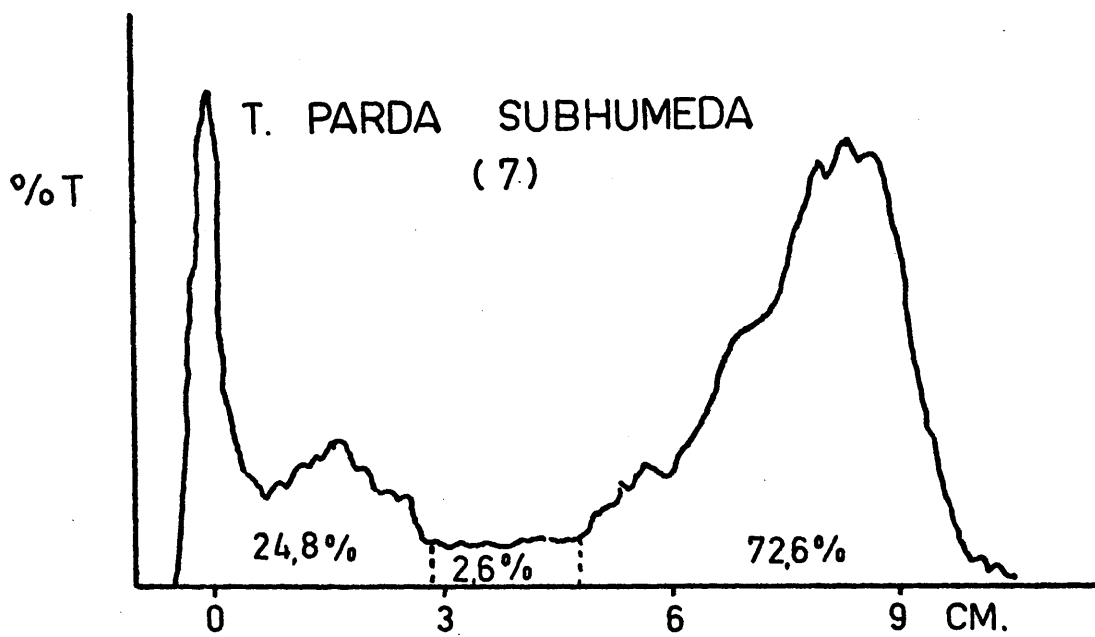
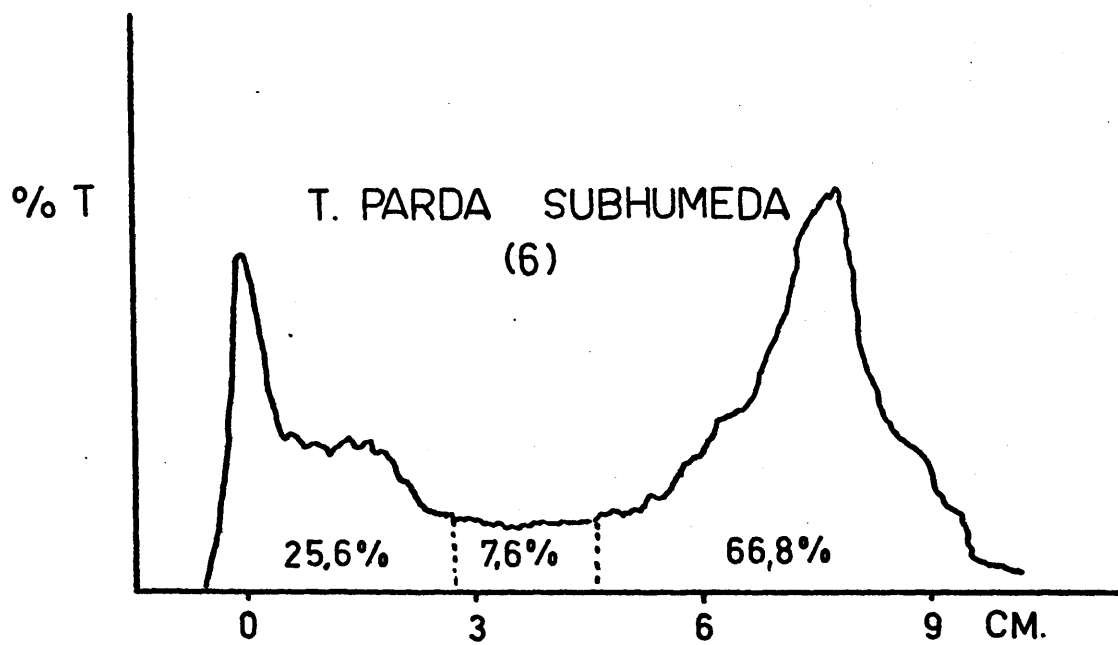


FIG.6 ELECTROFOREGRAMAS DE A. HUMICOS

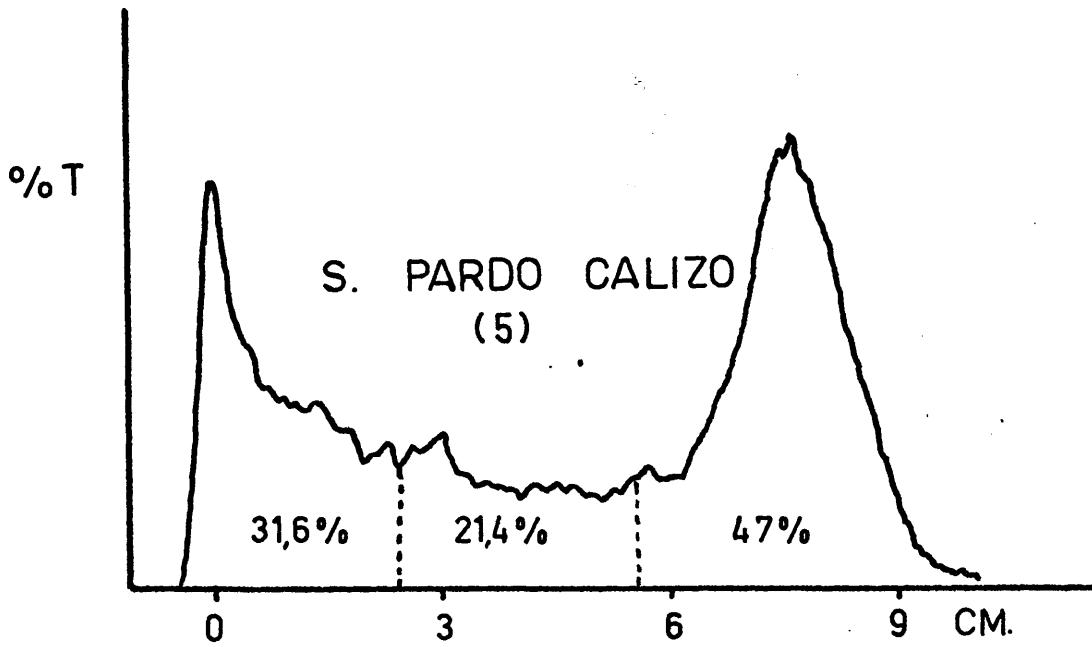
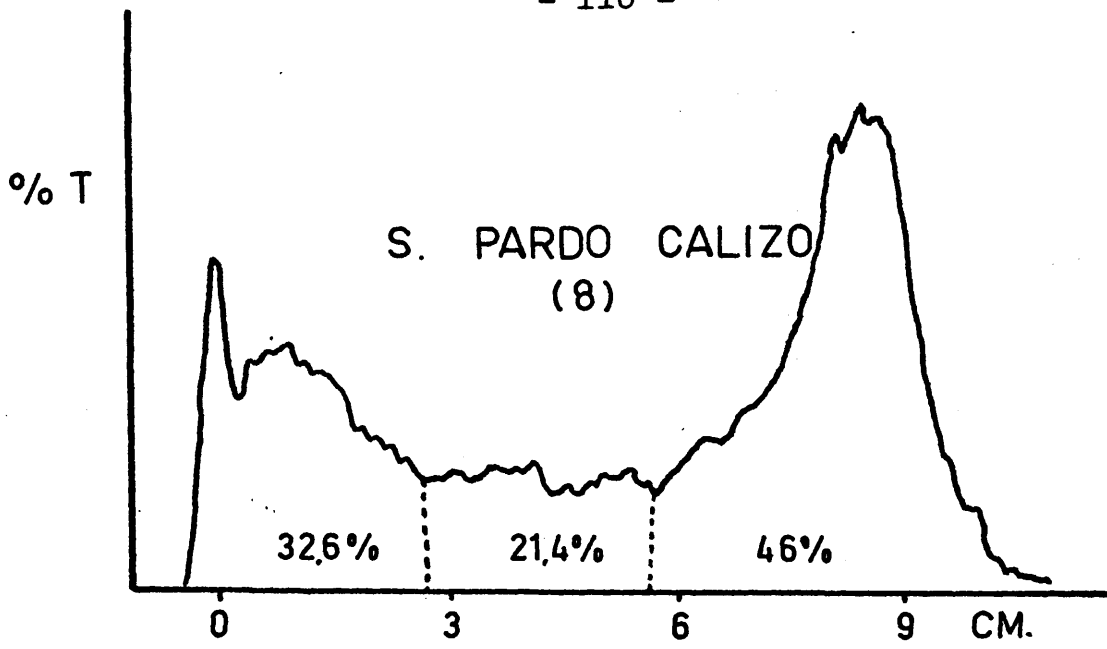


FIG.7 ELECTROFOREGRAMAS DE A. HUMICOS

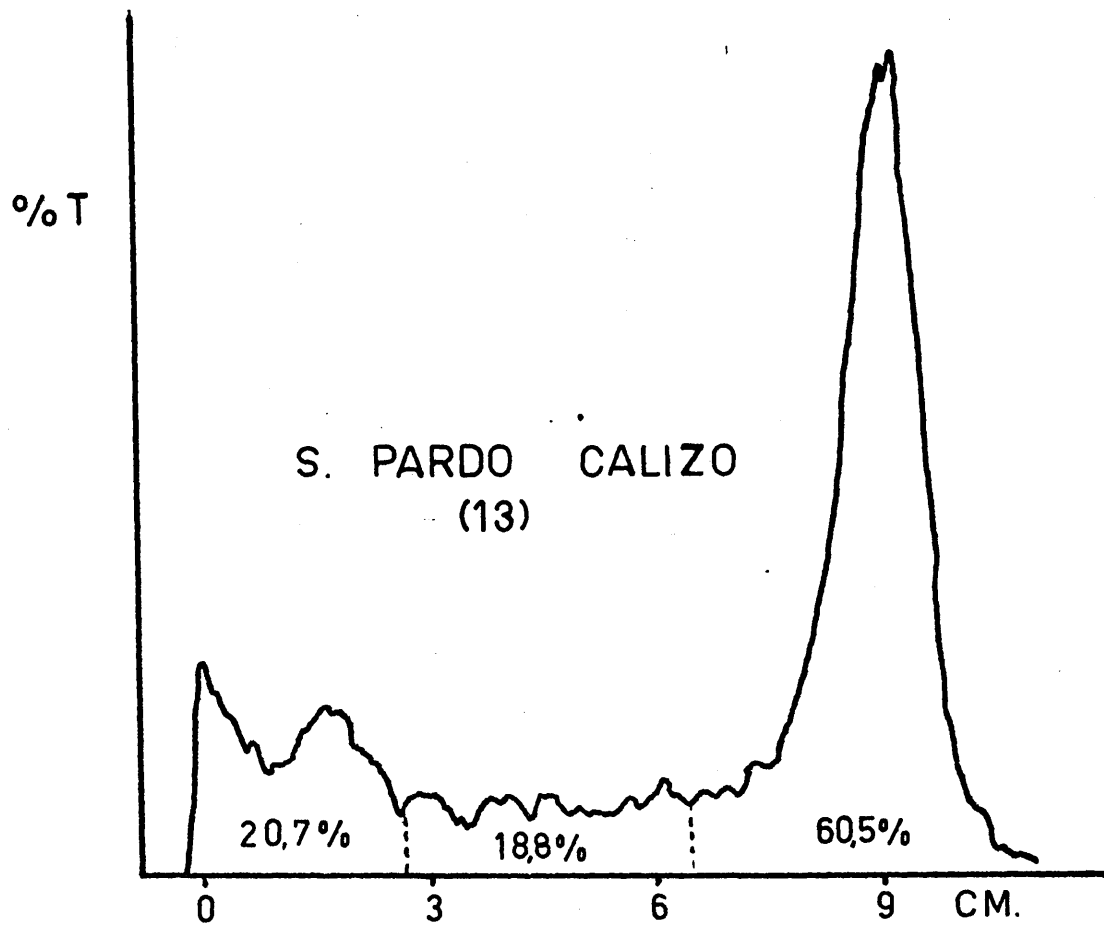
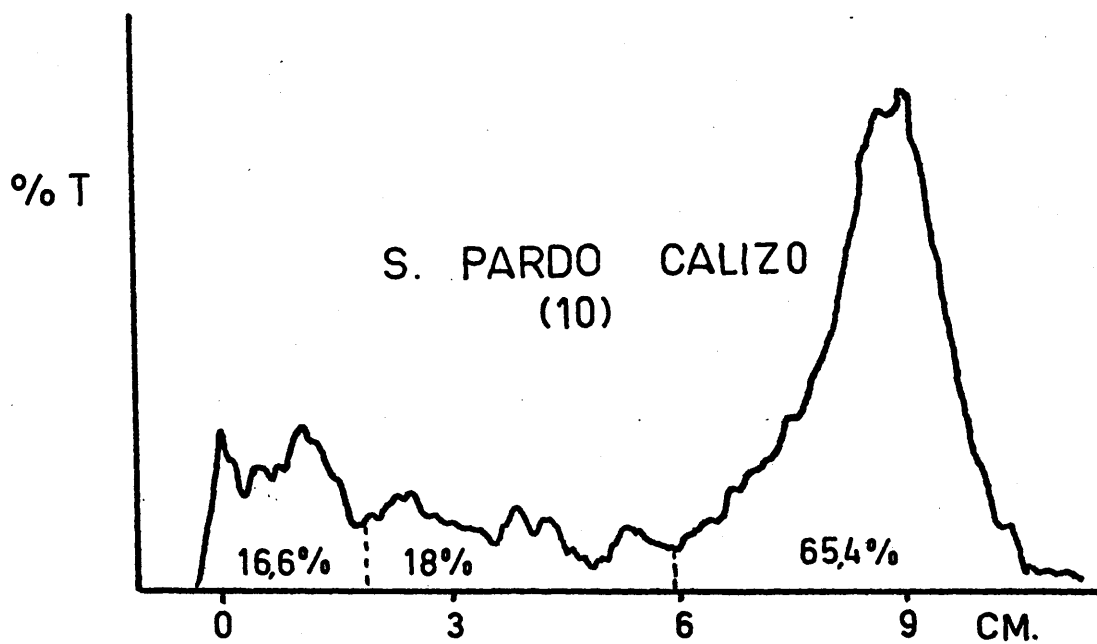


FIG. 8: ELECTROFOREGRAMAS DE A. HUMICOS

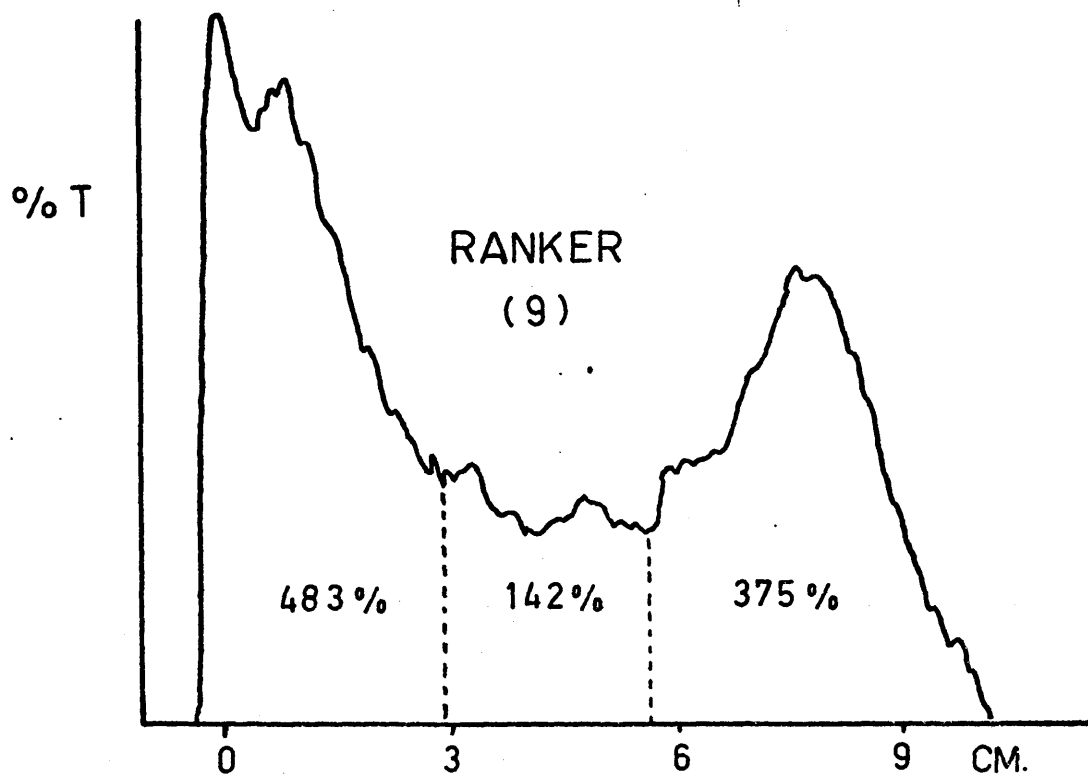
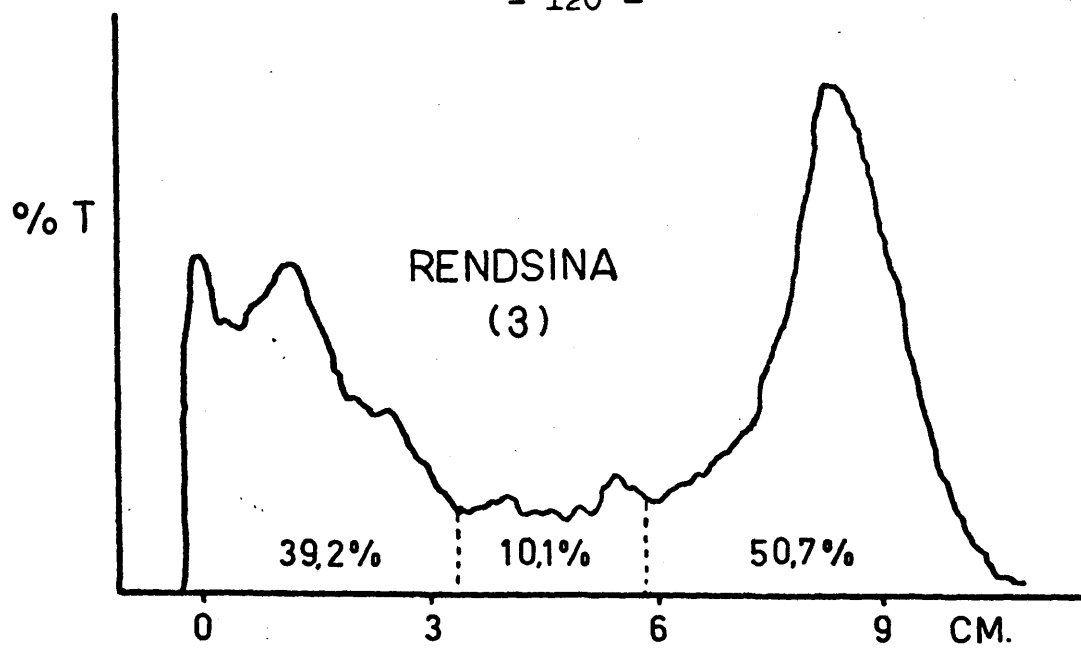


FIG. 9 ELECTROFOREGRAMAS DE A. HUMICOS

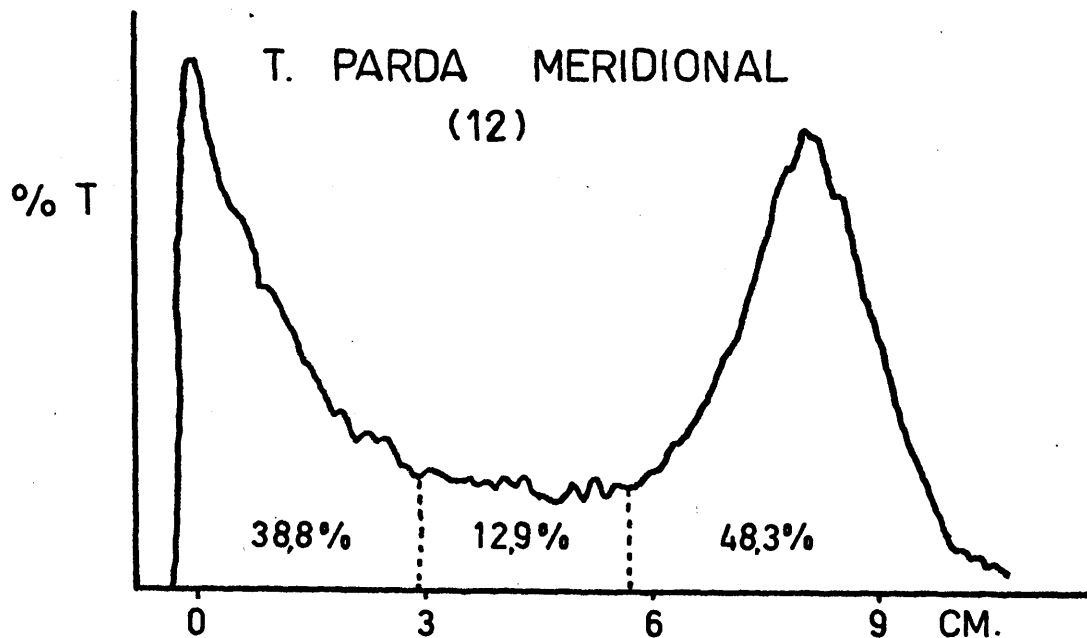


FIG.10 ELECTROFOREGRAMA DE A. HUMICOS

Valoración de ácidos húmicos móviles e inmóviles por electroforesis de papel.

Muestra	Acido húmico			Rf/3
	inmóviles	intermedios	móviles	
8	32,6	21,4	46,0	0,71
1	31	13,5	55,5	0,56
6	25,6	8,6	66,8	0,38
4	31	20,4	48,6	0,64
12	38,8	12,9	48,3	0,8
7	24,8	2,6	72,6	0,34
9	48,3	14,2	37,5	1,29
10	16,6	18	65,4	0,25
5	31,6	21,4	47	0,67
3	39,2	10,1	50,7	0,77
2	24,2	6,9	68,9	0,38
11	26,2	2,6	71,2	0,36
13	20,7	18,8	60,5	0,34

C de ácidos húmicos móviles e inmóviles referidos a 100 g. de -
suelo (numerador) y al C total del suelo (denominador).

<u>Muestra</u>	<u>Móviles</u>	<u>Inmóviles</u>
1	0,42/11	0,23/6,10
2	0,98/17,34	0,34/5,8
3	0,89/12,34	0,69/9,60
4	0,61/10,85	0,39/6,95
5	0,44/9,59	0,29/6,32
6	0,73/15,37	0,28/5,8
7	1,2/13,11	0,41/4,48
8	0,74/9	0,53/6,44
9	0,73/11,74	0,94/15,11
10	1/9,67	0,25/2,41
11	0,54/10,58	0,20/3,90
12	0,25/10	0,20/8,00
13	0,87/14,62	0,21/3,54

El grado de polimerización, que está estrechamente ligado con la razón a. húmicos móviles/a. húmicos inmóviles, disminuye en el sentido:

$$9 > 12 > 3 > 8 > 5 > 4 > 1 > 2 > 6 = 11 > 7 = 13 > 10$$

Comentario:

a) Tierras pardas meridionales.-

Suelos desarrollados sobre la misma roca madre y sometidos a parecidas condiciones climáticas. La influencia de la vegetación en el grado de polimerización es decisiva y disminuye en el sentido:

C. Sativa > Q. ilex > J. oxycedus (0,8- 0,56- 0,38).

Si bien el % de ácidos húmicos inmóviles es menor en la primera (0,2%), sin embargo al referirlo al carbono del suelo es sensiblemente más alta que los otros dos. Hay que señalar que el sotobosque correspondiente a la muestra de Q. ilex estaba formado por Cistus ladaniferus, especie que no favorece la buena humificación.

b) Tierras pardas subhúmedas.-

El grado de polimerización es mayor en la muestra 6 (mull forestal) que en la 7 (moder forestal) a pesar de que en esta última el porcentaje de ácidos húmicos inmóviles sea mayor, debido a las condiciones microclimáticas favorables de este suelo.

c) Suelos pardos calizos forestales.-

El grado de polimerización disminuye en el sentido:

8 > 5 > 13 > 10

En la muestra primera las condiciones climáticas y la vegetación a base de gramíneas y de Qercus ilex favorecen una buena polimerización de los compuestos húmicos.

Las muestras 5 y 10 presentan diagramas monotérmicos muy semejantes pero la vegetación es muy diferente. Los ácidos húmicos inmóviles del sabinar solo representan el 2,54% del C total del suelo.

A pesar de las desfavorables condiciones para la humificación que proporcionan los restos vegetales del Pinus halepensis, la influencia de la roca madre es decisiva y por eso los ácidos húmicos grises ya representan un 3,54% del C total; en condiciones ácidas se hubiera formado un morcon un grado de polimerización mucho más bajo.

Los ácidos húmicos del sabinar están ligeramente menos polimerizados que los del pinar; sin embargo, hay que acudir a otras técnicas experimentales que aclaren más su naturaleza, debido al gran contenido de ácidos húmicos intermedios y a la complejidad del electroforegrama, que hace difícil una separación neta entre las diversas fracciones.

d) Ranker de tangel .-

S. purgans y J. communis ssp. nana producen una gran cantidad de restos vegetales que se mineralizan rápidamente al mismo tiempo que se produce una síntesis de ácidos húmicos muy polimerizados en razón de las alternancias microclimáticas de hu-

-medad y sequedad que hay en el Puerto de Navacerrada. Representan el 48,3% de los ácidos húmicos totales y el 15,1% del carbono total.

En este caso la influencia del clima en el proceso de humificación impera sobre la naturaleza ácida de la roca madre.

e) Rendsina.-

Ácidos húmicos bastante polimerizados. El porcentaje de grises (39,2%) es menor que en el ranker

Compuestos húmicos formados en presencia de calcio activo (11% en el horizonte A₁). Hay formación de un complejo precoz arcillo-húmico por la acción de las lombrices, a expensas de restos finamente divididos pero poco transformados químicamente. La acción del calcio y de la arcilla frena la mineralización de los compuestos húmicos y favorecen su polimerización.

f) Limos rojos .-

Los ácidos húmicos de la terra rossa (roca básica) - presentan un grado de polimerización mayor que el limo rojo sobre material silíceo.

Mientras que en los primeros los ácidos húmicos grises representan el 6,95% del carbono total, en los segundos solo suponen el 3,9%

2) G E L - F I L T R A C I O N C O N S E P H A D E X

Generalidades sobre tamices moleculares: Sephadex .-

El Sephadex es un dextrano modificado. Las moléculas del dextrano constituyen un retículo de tres dimensiones formado por cadenas de polisacáridos. A causa de este alto contenido de grupos hidrofílicos, el Sephadex tiene fuerte afinidad por el agua y además se hincha en la misma, así como en soluciones de electrolitos.

El grado de hinchamiento es muy importante y característico del gel. Geles en los cuales la matriz es un componente pequeño se usan para el fraccionamiento de sustancias de alto peso molecular, mientras que geles compactos se usan para separar los de bajo peso molecular.

El polisacárido dextrano usado en la fabricación del Sephadex se sintetiza microbiológicamente por la acción del *Lentostoc mesenteroides* (raza NRRL B-512) en sacarosa. El producto nativo dextrano es un polisacárido de alto peso molecular que contiene 90-95% de enlaces α -1,6 glucosídicos. El resto lo componen moléculas con enlaces del tipo 1,3 glucosídico.

El peso molecular del dextrano puede ser reducido por parcial hidrólisis de los enlaces glucosídicos a elevada temperatura y en presencia de ácidos minerales.

En condiciones adecuadas se puede llevar esta hidrólisis

hasta obtener el grado o rango de peso molecular deseado. La hidrólisis total conduce a la glucosa.

El Sephadex es insoluble en todos los disolventes orgánicos (a menos que no esté químicamente degradado). Es estable en agua, soluciones alcalinas y débilmente ácidas, en soluciones salinas y en solventes orgánicos

En soluciones fuertemente ácidas, los enlaces glucosídicos se rompen. Sin embargo, puede utilizarse durante 1-2 horas - sin señalados efectos con ClH 0,1 M y puede estar en contacto durante seis meses con ClH 0,02 M.

Se puede esterilizar en autoclaves durante 40 minutos a 110° C sin producir cambio en sus propiedades.

Mecanismo de la gel-filtración : coeficientes.-

La gel-filtración es un procedimiento cromatográfico. Las sustancias se transportan a través de un lecho de gel (empaquetado en forma de columna) por un eluyente y la velocidad de transporte depende del tamaño molecular de las mismas. Las moléculas del tamaño mayor que los poros del gel hinchado no pueden penetrar en el interior del mismo, y por lo tanto, pasan por el lecho a través de la fase líquida existente entre las partículas -- del gel.

Se dice que estas sustancias son excluidas por el rango del gel. Sin embargo, las moléculas de tamaño menor, penetran en las partículas del gel a diferentes profundidades, dependiente de su tamaño y configuración.

Las moléculas de este tipo (retenidas) son llevadas por el eluyente a través del lecho del Sephadex en orden decreciente

del tamaño molecular.

Es usual en cromatografía definir un parámetro: el coeficiente de distribución (k_d) es la relación entre la concentración del soluto en la fase móvil y en la fase estacionaria. Este parámetro en la gel-filtración es muy conveniente:

$$k_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

La fase estacionaria es aquí el agua imbibida en las partículas del gel y la fase móvil es el agua que se mueve en el espacio vacío (V_o) existente entre las partículas.

V_t = volumen de la columna que ocupa el gel

V_e = volumen de elución, es el volumen de eluyente recogido en la elución de la columna, desde que se aplica la muestra hasta el máximo de %T del pico de la curva correspondiente

V_o = es el volumen de elución que corresponde a una sustancia de peso molecular tan elevado que no se retiene nada por el gel y pasa por los espacios intergranulares del mismo. Se utiliza un producto conocido con el nombre de Blue dextrano 2000 (dos millones de peso molecular).

Cuando k_{av} es próximo a 1, las moléculas pequeñas penetran dentro del gel sin impedimento y así se distribuyen, casi igualmente entre la fase gel y la fase líquida; por el contrario cuando k_{av} está próximo a 0 son las grandes moléculas las que no pueden penetrar dentro del gel.

Los límites de acción de la columna vienen dados por V_o y V_t ; si $V_e > V_t$ hay fenómenos de adsorción. Para evitar esto Posner y otros investigadores utilizan sales como eluyentes, pero

nosotros no estamos muy de acuerdo con estos resultados: lo que se gana al eliminar el fenómeno de adsorción se pierde en perfección en el desarrollo cromatográfico de la sustancia a través de la columna.

La gel-filtración permite fraccionar los compuestos - de acuerdo con el tamaño molecular de sus componentes.

Hay diferentes tipos de Sephadex con diferentes rangos de peso molecular, siendo los más usados los siguientes:

<u>Tipos de Sephadex</u>	<u>Rango de peso molecular</u>
G-- 25	100 - 5000
G - 50	500 - 10.000
G - 75	1.000 - 50.000
G - 100	1.000 - 100.000
G - 150	1.000 - 150.000

Factores que influyen.-

a) Cantidad de muestra.- Cuando la concentración de la muestra añadida es mayor de 1,5 mg. de carbono no se obtiene una separación muy neta, tal como se demuestra en la fig. 18 en donde se comparan las curvas de elución de los ácidos húmicos de un -- suelo pardo calizo cromatografiados a través de Sephadex G-100. Mientras que si se añaden 2 mg. de carbono la separación no es muy buena y solo se obtienen dos picos, al reducir la cantidad a 1,5 mg. se separan perfectamente cuatro fracciones.

b) Flujo del eluyente.- Un flujo muy alto impide una - separación neta. Hemos utilizado 30 gotas por minuto.

c) Longitud de onda.- Se utilizan principalmente dos: 450 y 270 m μ ; hemos utilizado la primera.

d) Naturaleza del Sephadex.- Debido a la carga eléctrica negativa del Sephadex las sustancias con carga negativa - se eluyen antes que las positivas. También se ha demostrado que los compuestos aromáticos (principalmente fenoles) experimentan por parte de las partículas del gel una retención; este efecto se elimina utilizando un eluyente cuya carga iónica sea superior a 0,02.

Las técnicas de separación, que consiste en utilizar - sucesivamente geles de tamaño de poros diferentes, se efectúan - siguiendo uno de los siguientes protocolos:

- cromatografiar sucesivamente por cada gel
- los compuestos orgánicos se cromatografían sobre un determinado gel y las fracciones excluidas se pasan por geles de rango molecular inmediatamente superior.
- los compuestos orgánicos se cromatografían por gel de rango molecular alto y las fracciones retenidas - se pasan por geles de rango inferior.

El segundo proceso es el mejor:

RESULTADOS Y DISCUSION

1) Condiciones de trabajo.-

Cantidad de sustancia= 1,5 mg. de C

Flujo = 30 gotas por minuto

Eluyente = agua destilada

Columna = K 25/45

Sistema de cubetas = flujo continuo

Espectrofotómetro = ZEISS PMQ II con registrador incorporado

Ácidos húmicos = extraídos por el método Kononova del horizonte A₁ de los diferentes suelos

2) Técnica operatoria.-

Los ácidos húmicos disueltos en NaOH 0,5N se cromatografían a través de Sephadex G-50 y G-100. Construyendo la curva %T frente al volumen de elución se pueden valorar cuantitativamente los porcentajes de las diferentes fracciones separadas

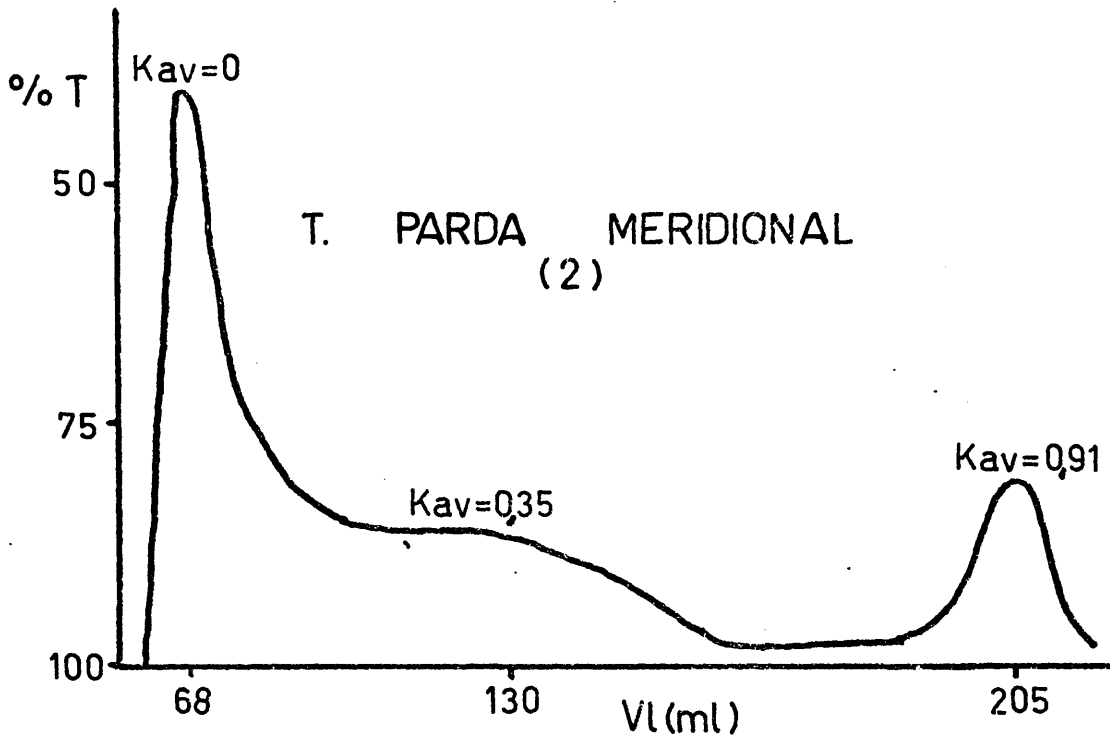
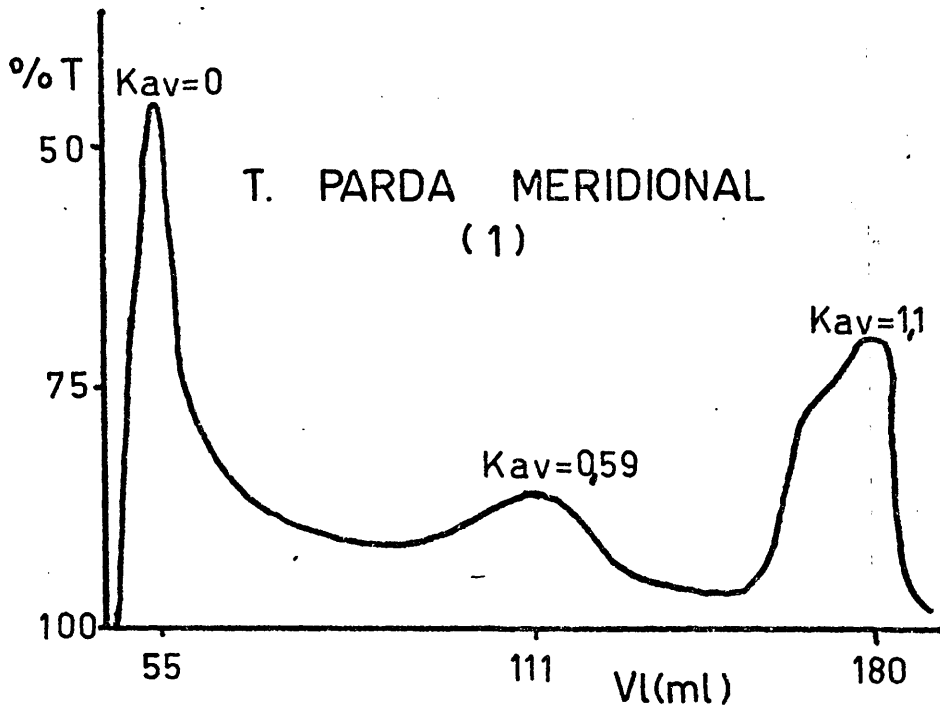


FIG.11 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-50

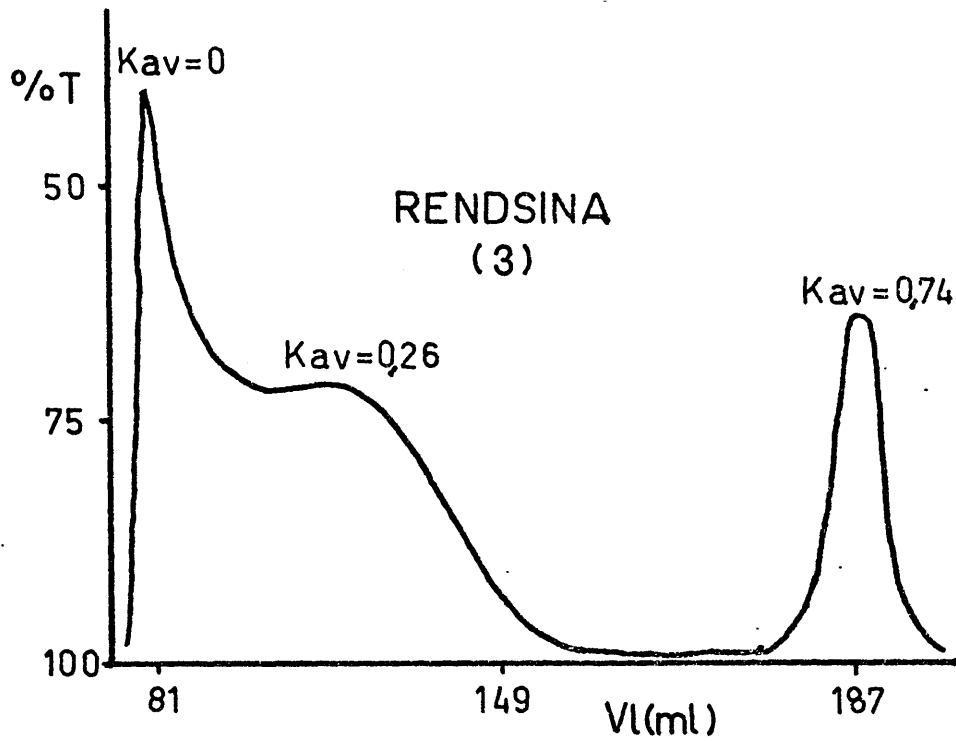
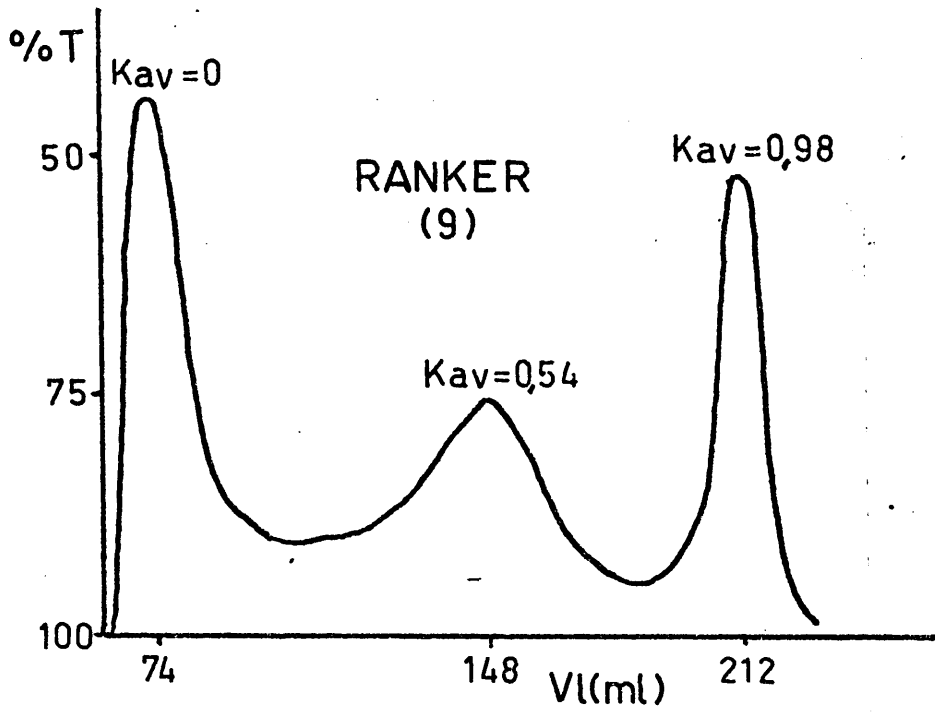


FIG.12 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-50

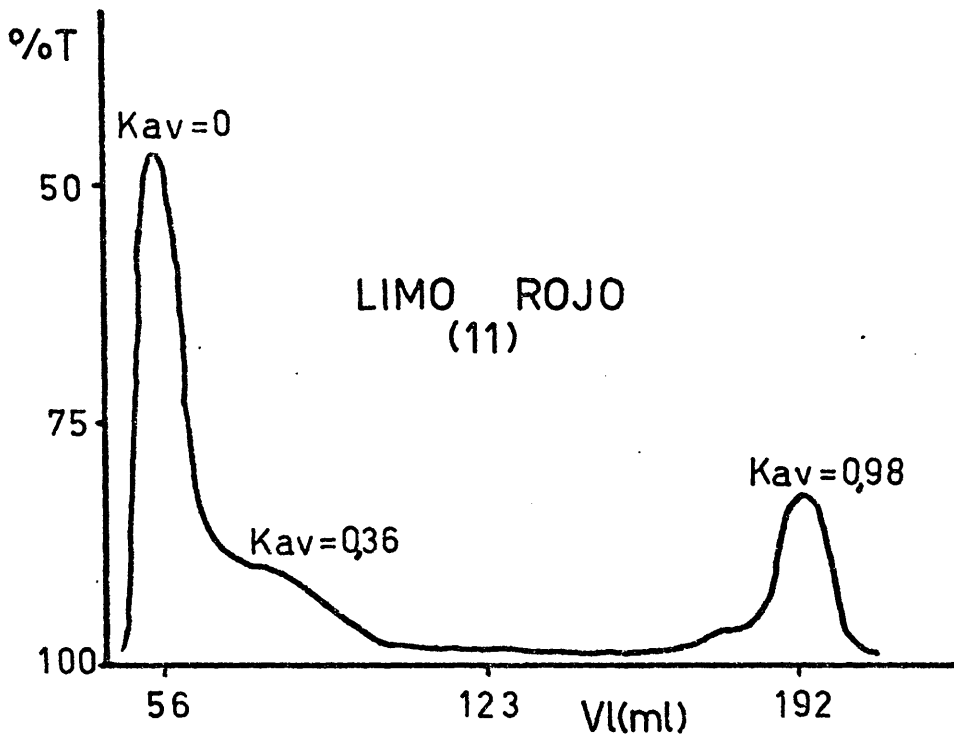
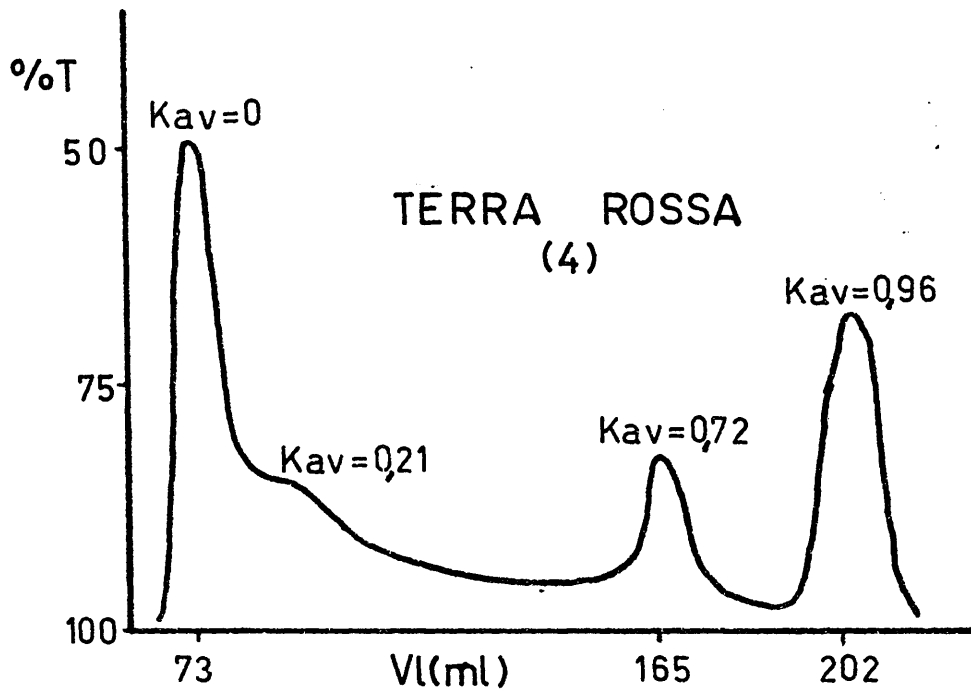


FIG.13 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-50

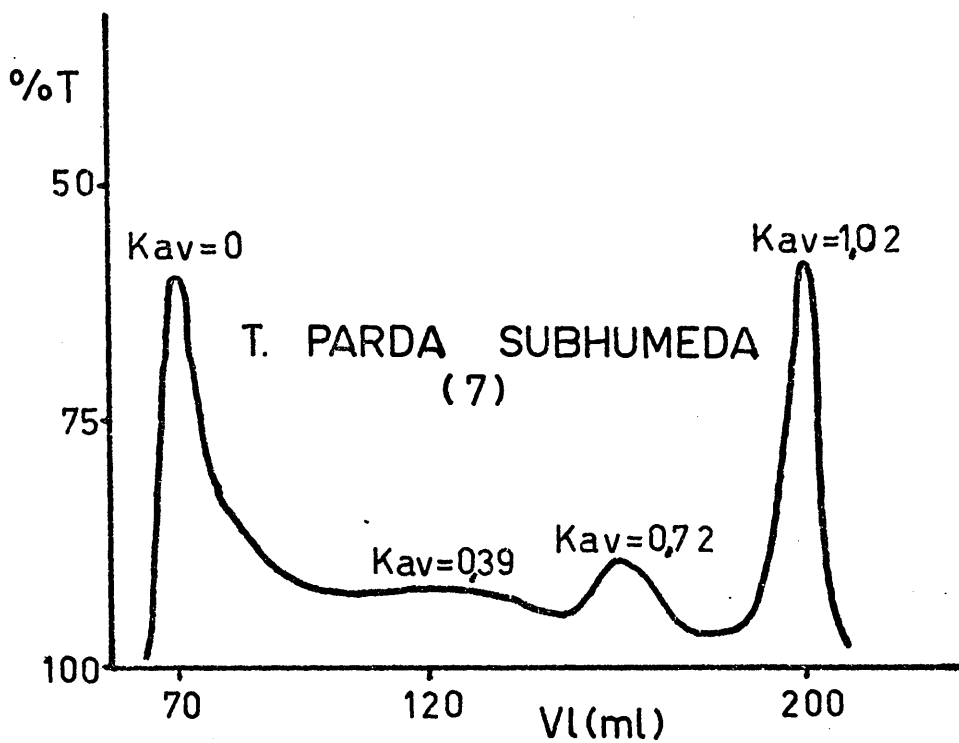
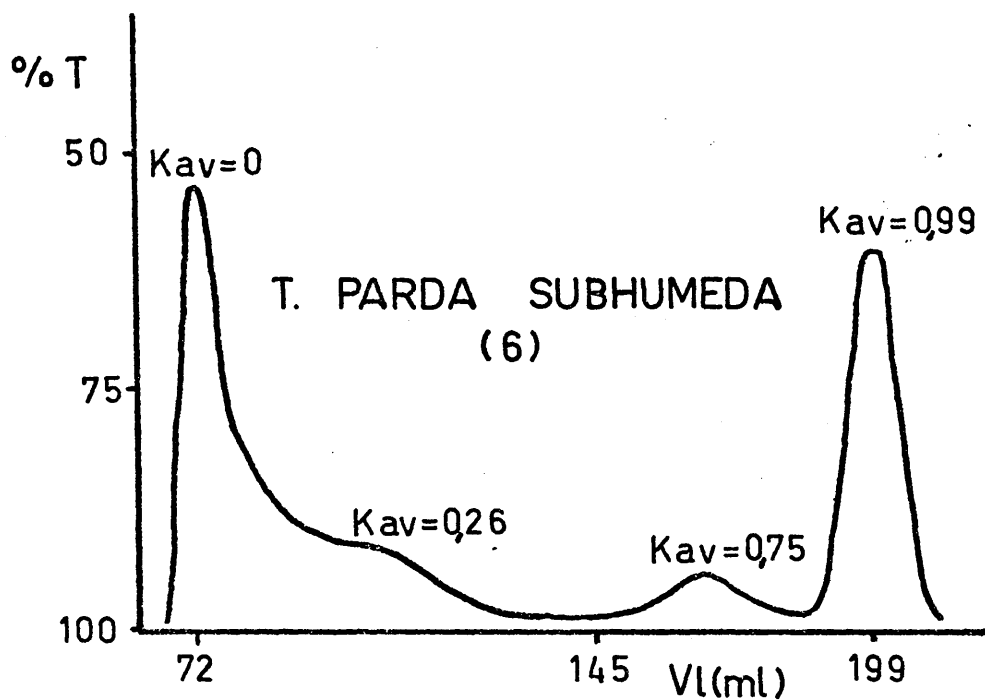


FIG. 14 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-50

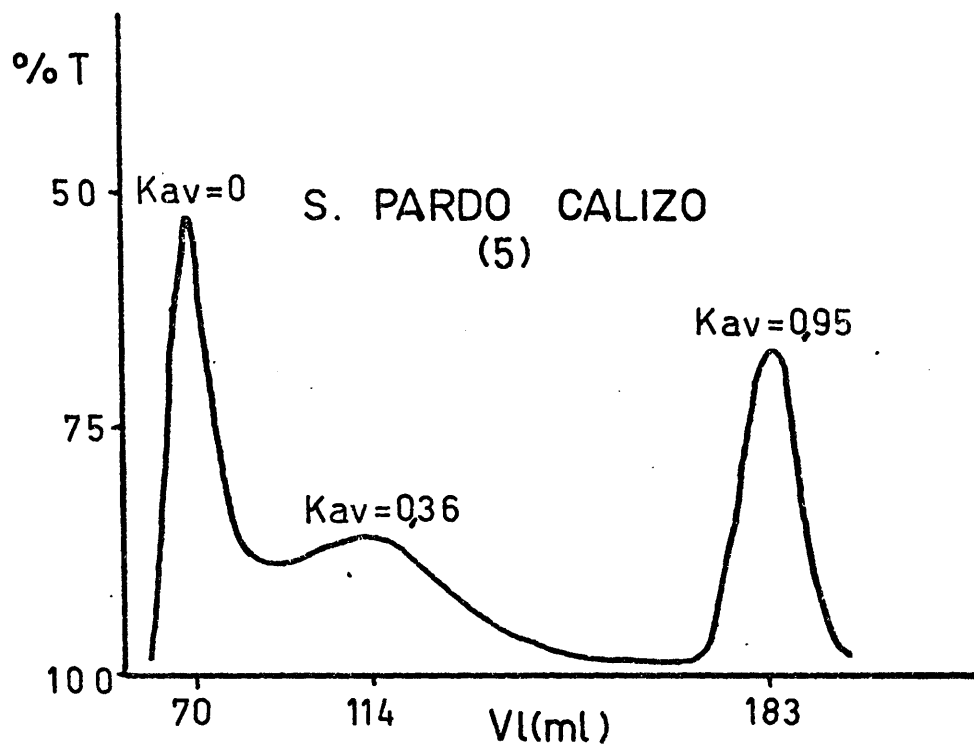
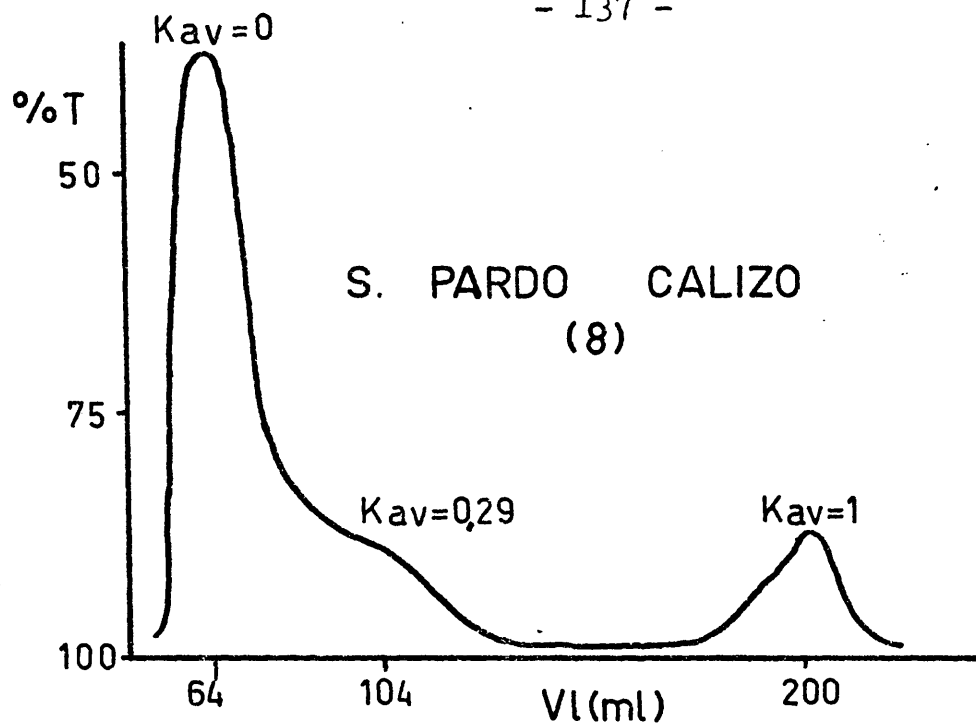


FIG.15 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-50

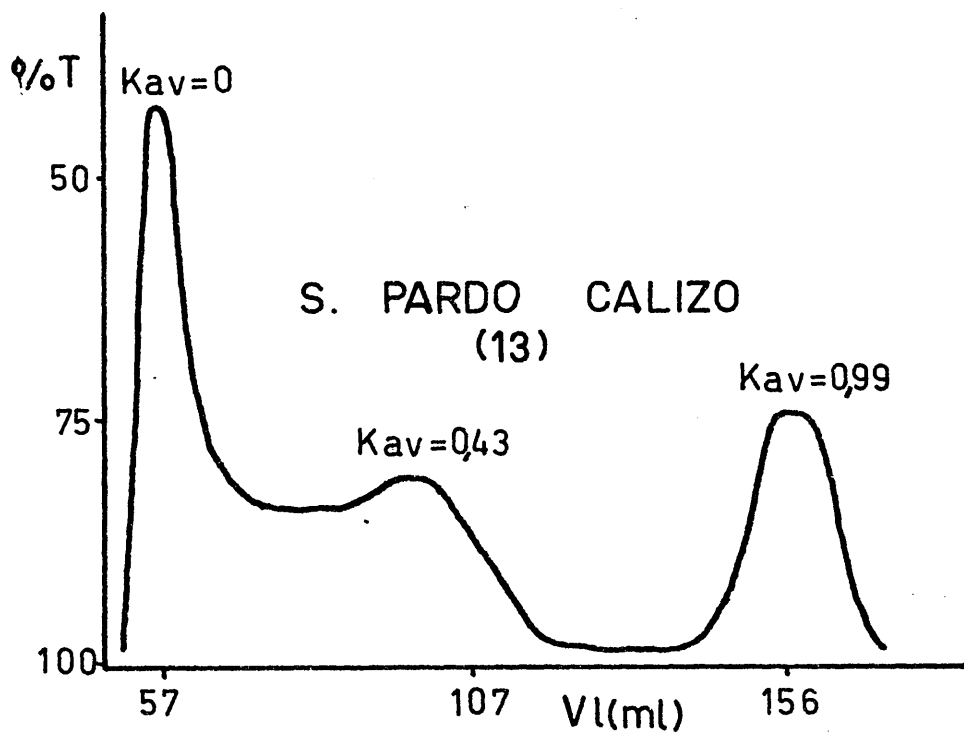
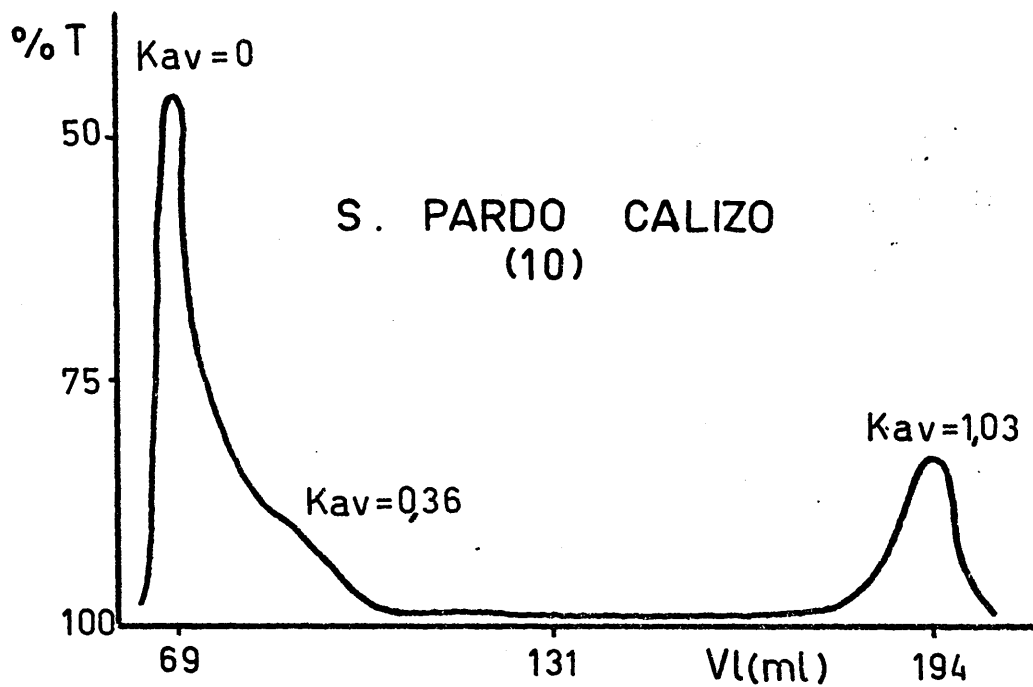


FIG. 16 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-50

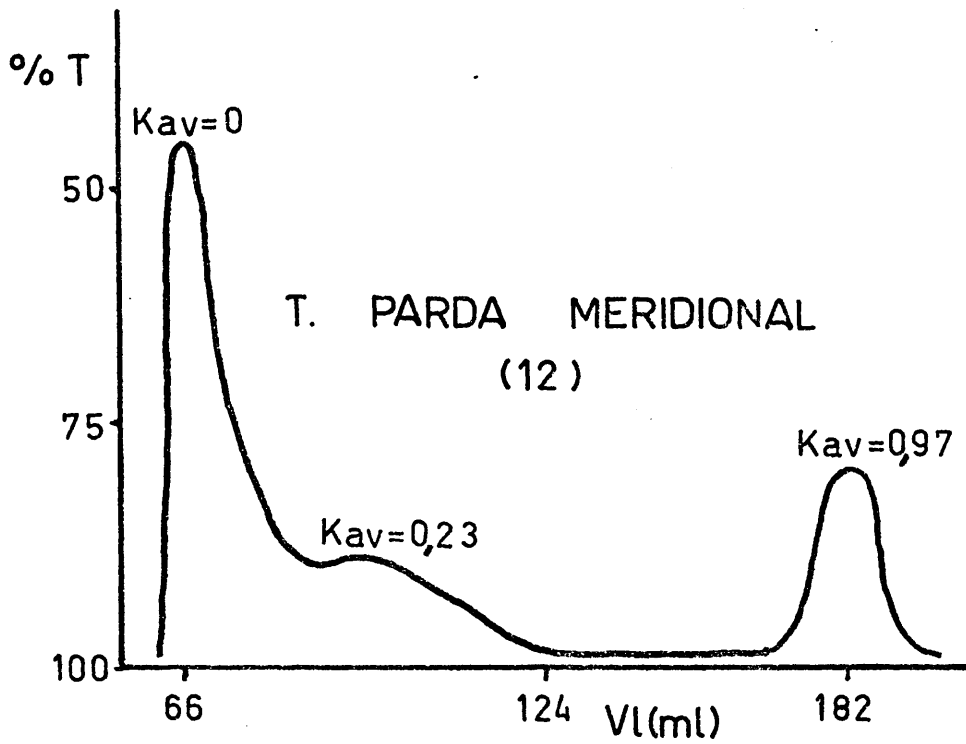


FIG.17 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-50

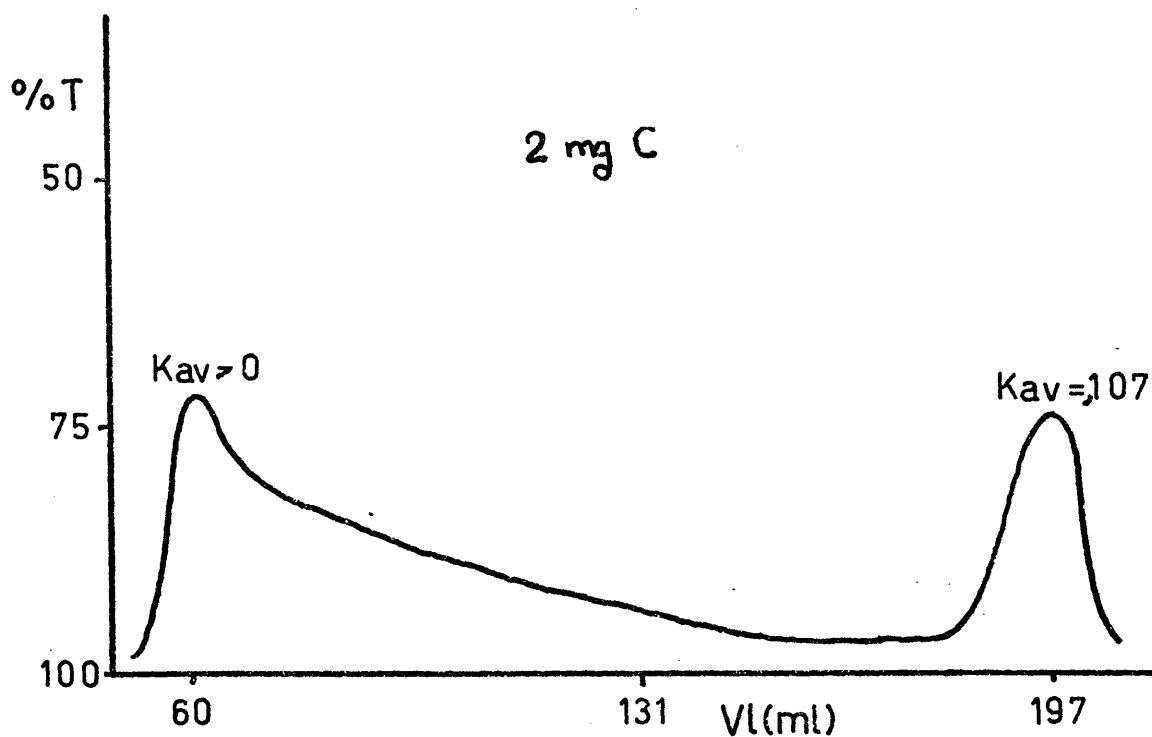
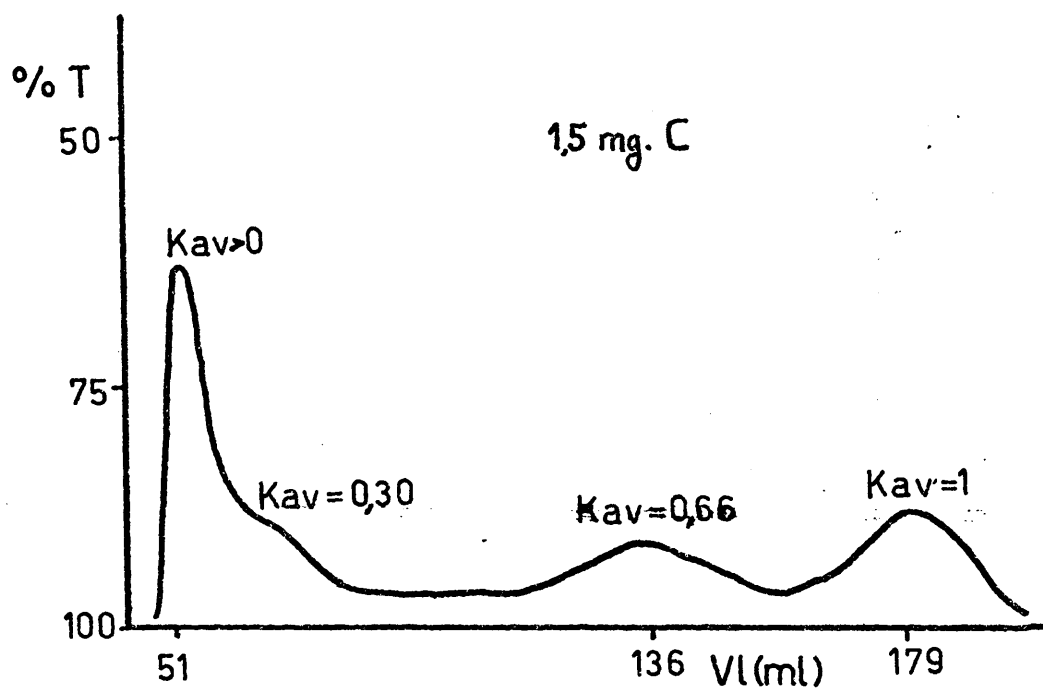


FIG.18 INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE MUESTRA EN LA GEL-FILTRACION CON SEPHADEX G-100 DE LOS A. HUMICOS DE UNA TERRA ROSSA

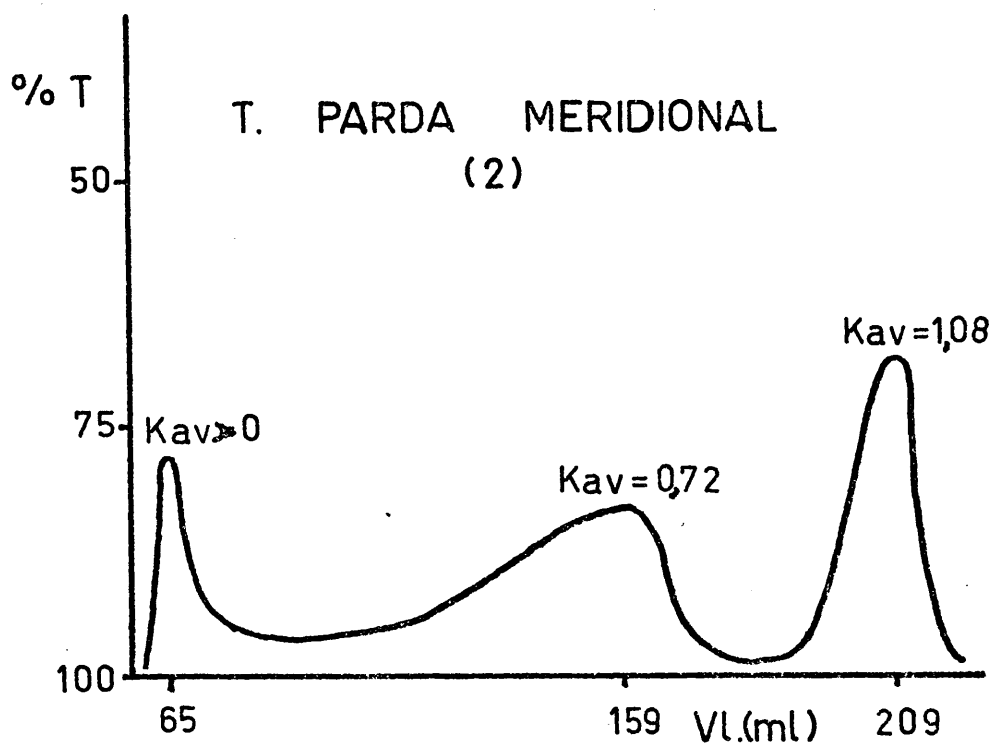
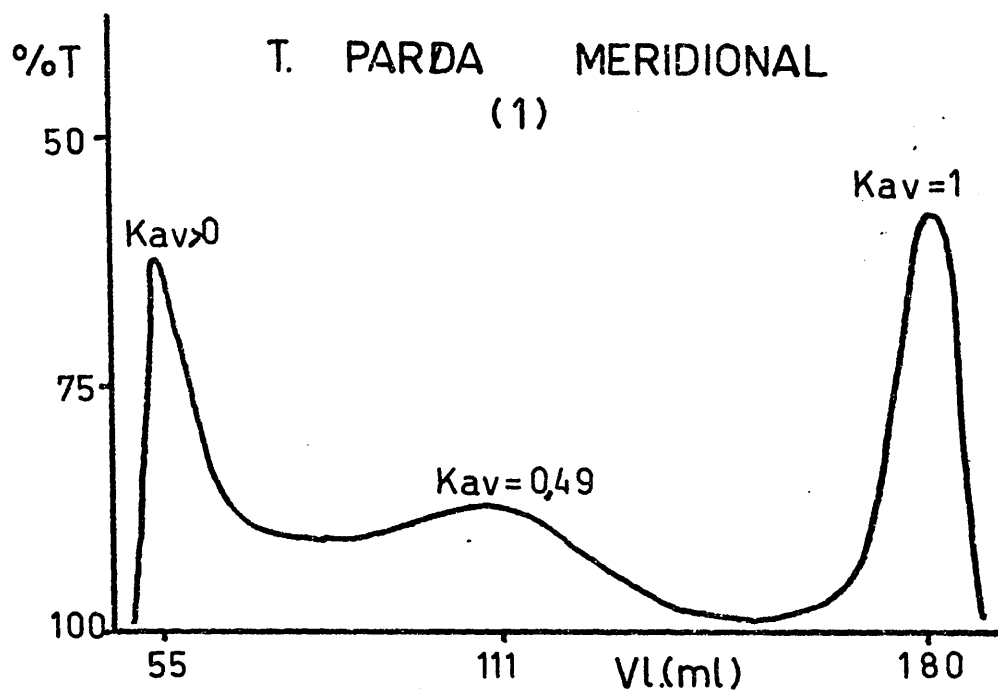


FIG.19 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-100

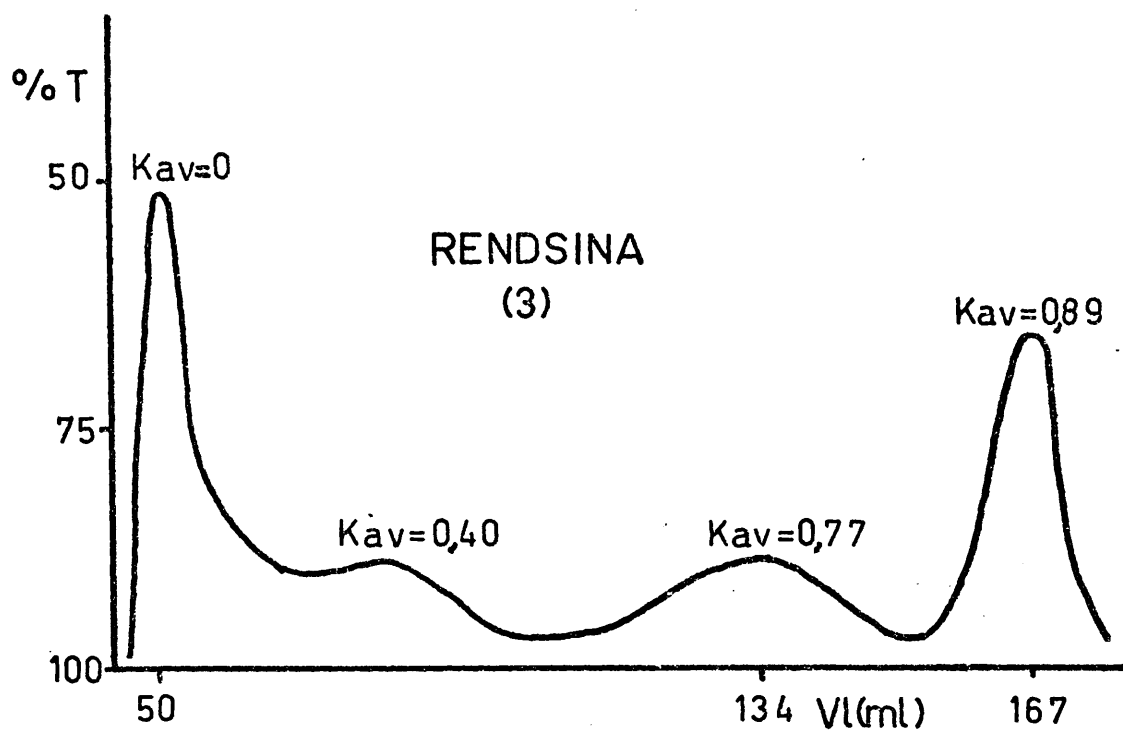
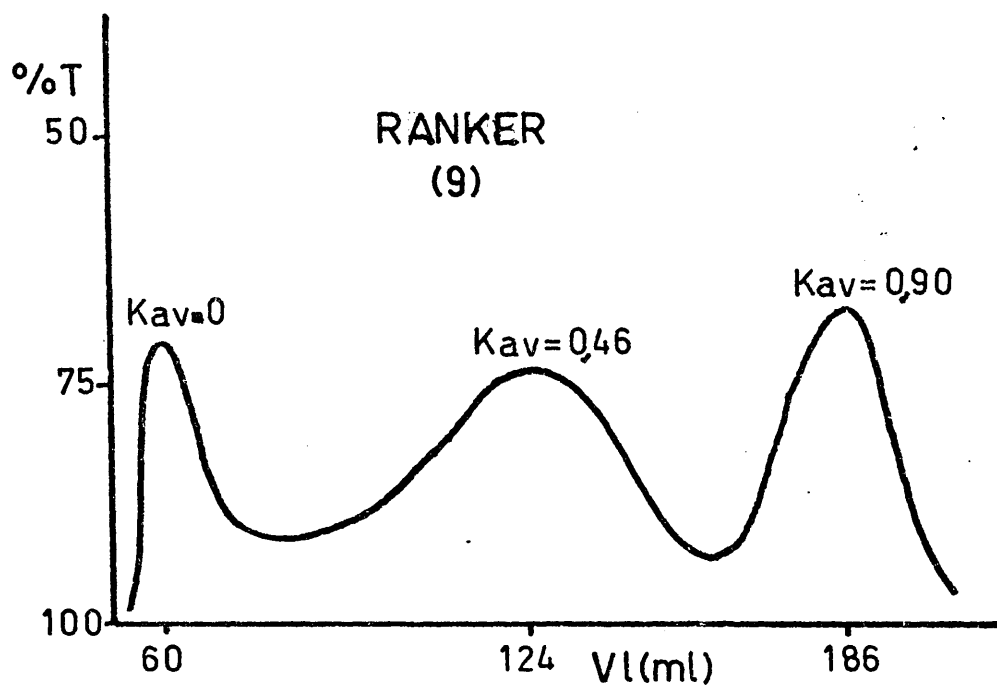


FIG. 20 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-100

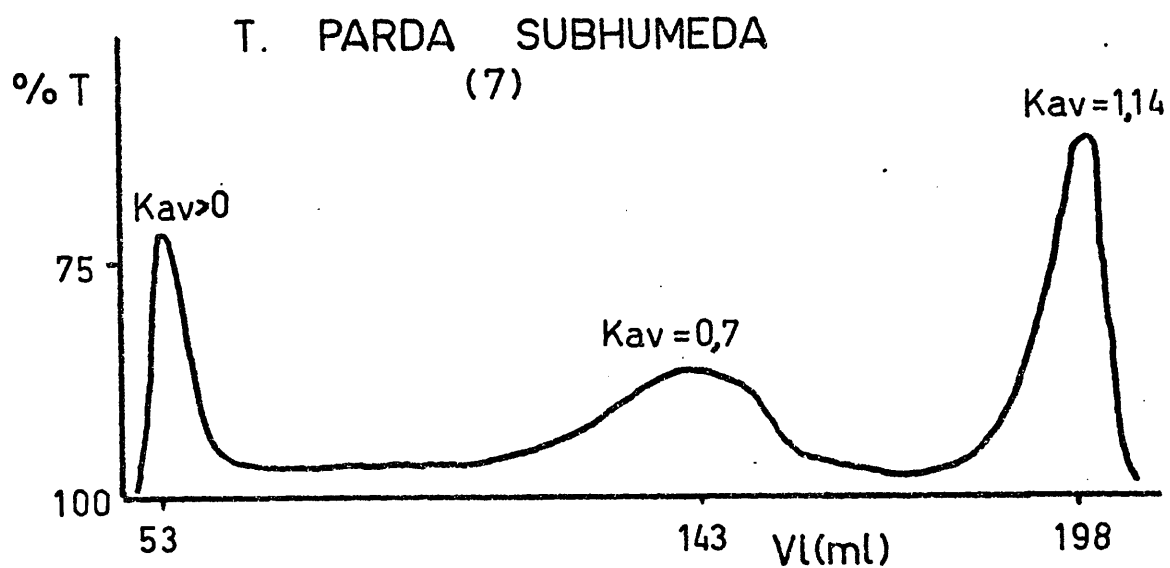
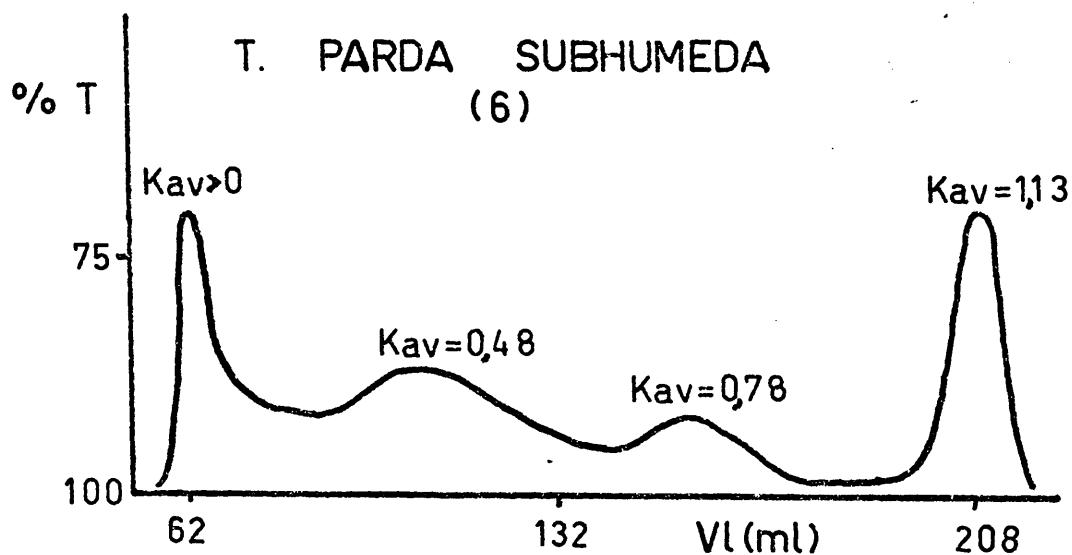


FIG. 21 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-100

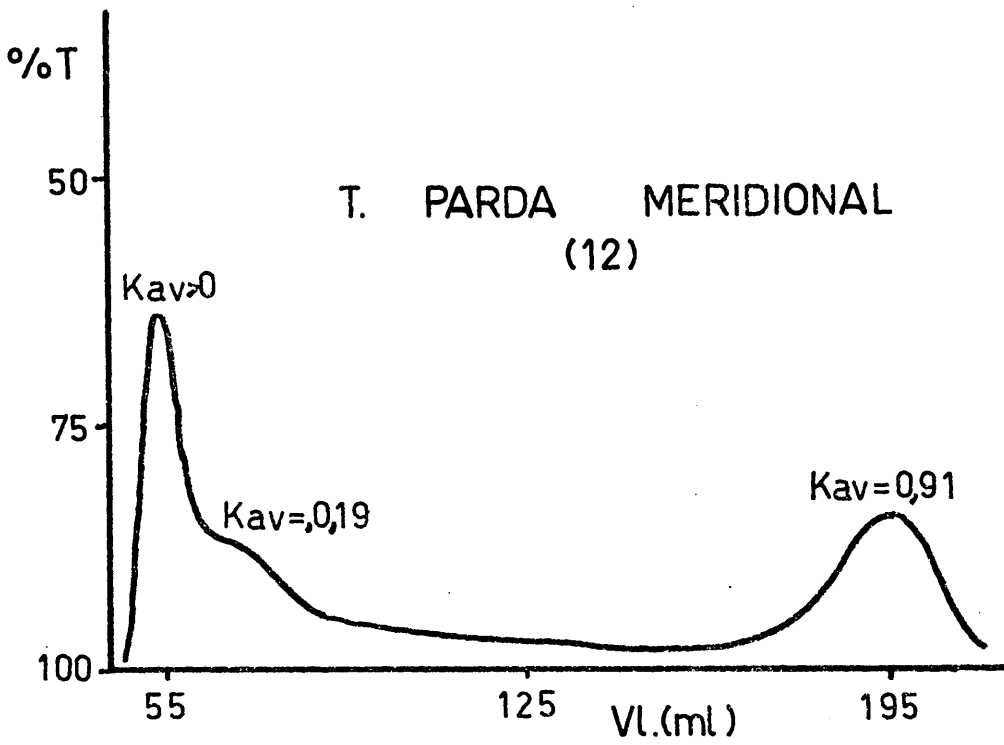
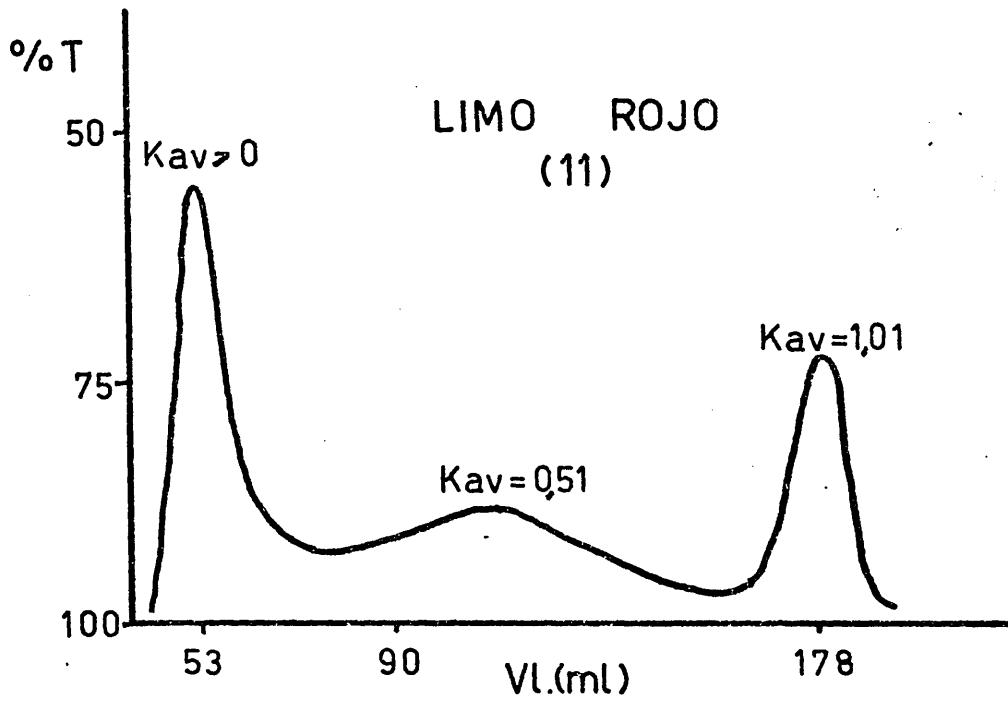


FIG. 22 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-100

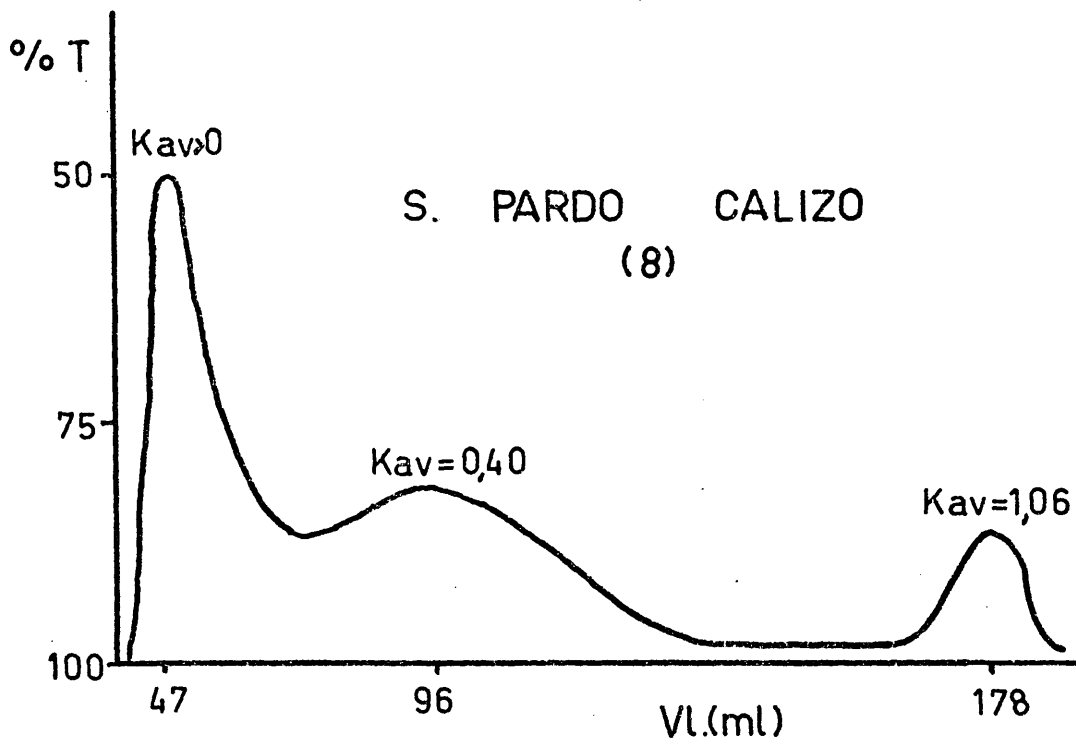
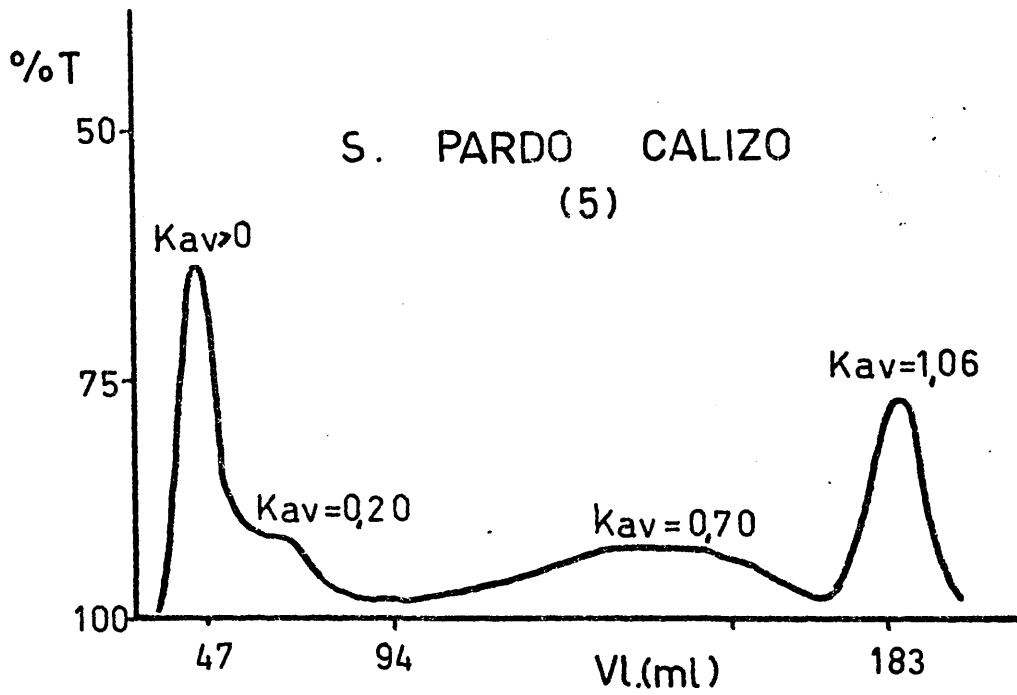


FIG. 23 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-100

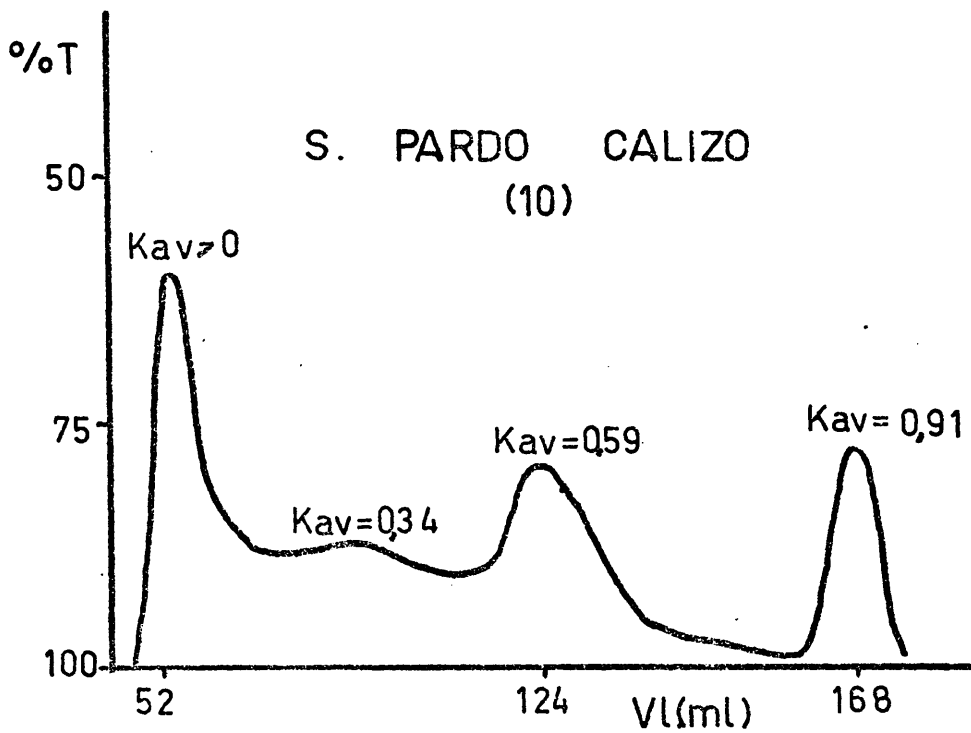
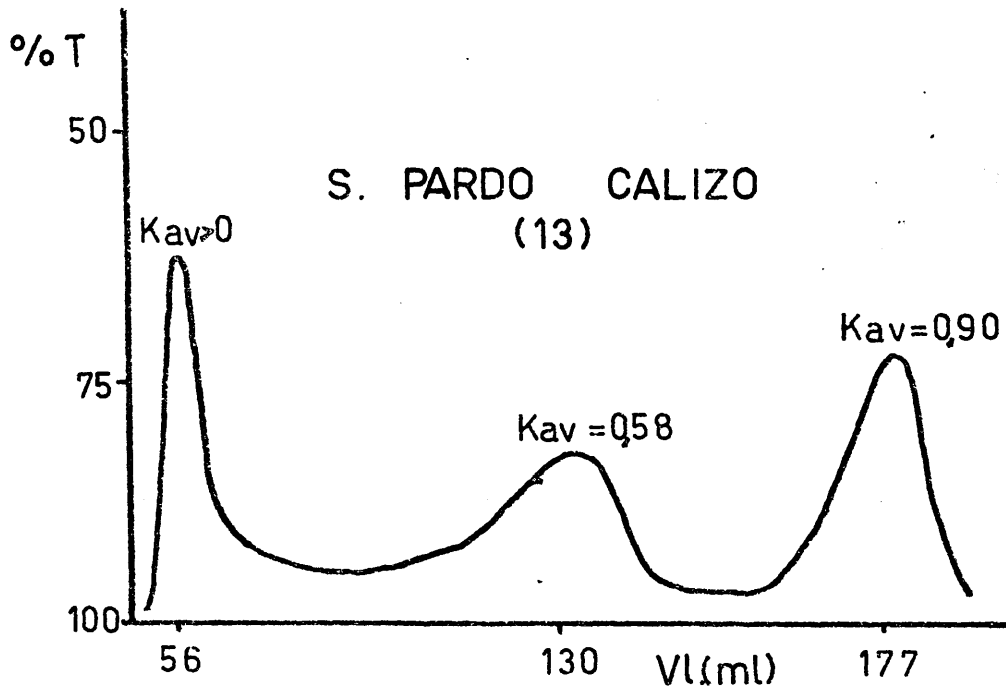


FIG. 24 GEL-FILTRACION DE A. HUMICOS CON SEPHADEX G-100

a) Gel-filtración de ácidos húmicos con Sephadex G-50

Porcentaje de ácidos húmicos según el peso molecular (%)

a.húmicos	%fracción excluida	% fracción retenida		
	Kav=0 PM > 10.000	Kav=0-0,95 PM=500-10.000	Kav ≈ 1 Kav	PM < 500 %
1	54,7	16,2	1,1	29,1
2	63,1	26,8	0,92	10,1
3	58,1	41,9		
4	55,3	20,5	0,96	24,2
5	55,4	22,4	0,95	22,2
6	44,2	31,5	0,99	24,3
7	46,1	31,4	1,02	21,5
8	67,5	22,5	1	10
9	47,50	29,5	0,98	23
10	65,7	9,1	1,03	23,2
11	48,5	28,2	0,98	23,5
12	60,9	15	0,97	24,1
13	47,6	22,4	0,99	30

Kav y porcentajes de ácidos húmicos de la fracción retenida por
Sephadex G-50 (PM= 500-10.000)

a. húmicos	$k_{av} = 0-0,5$	%	$k_{av} > 0,5$	%
1			0,59	14,6
2	0,35	25,5		
3	0,26	20,2	0,74	21
4	0,21	16,1	0,72	8,9
5	0,36	23		
6	0,26	20,1	0,75	4,1
7	0,39	28,2	0,72	3
8	0,29	21,3		
9			0,54	25,1
10	0,36	7,8		
11	0,36	26,3		
12	0,23	14		
13	0,43	23,1		

b) Gel-filtración de ácidos húmicos con Sephadex G-100

Porcentaje de ácidos húmicos según el peso molecular

a.húmicos	%fracción excluida		% fracción retenida		
	Kav=0 PM > 100.000	Kav=0-0,1 PM=100.000	Kav=0,1-0,95 PM=1000;100.000	Kav=1 Kav	PM=1000 °
1		25,8	42,1	1	32,1
2		22,5	53,9	1,08	23,6
3	16,3		48,7	0,89	35
4		27,5	52,5	1	20
5		35,5	34,2	10,6	29,3
6		21,2	48,4	1,13	30,4
7		18,1	43,8	1,14	38,1
8		35,7	49,2	1,06	15,1
9	20,1		49,8	0,9	30,1
10		20,5	61	0,96	18,5
11		20,2	46,7	1,01	33,1
12		49,2	26,8	0,91	24
13		18,8	43,8	0,90	39,4

Kav y porcentajes de ácidos húmicos de la fracción retenida de peso molecular comprendido entre 1000 y 100.000

a. húmicos	Kav=0-0,5		Kav >0,5	
		%		%
1	0,49	34,8		
2			0,72	39,2
3	0,4	12	0,77	31
4	0,30	25	0,66	20
5	0,20	11,5	0,70	22,8
6	0,48	36,3	0,78	12,1
7			0,70	17,3
8	0,4	31,1		
9	0,46	40		
10	0,34	25	0,59	28,6
11			0,51	38,3
12	0,19	25		
13			0,58	33,1

Del estudio de la gel-filtración a través de Sephadex - G-50 se deduce que aproximadamente el 50% de la fracción de ácidos húmicos tiene peso molecular superior a 1000 y el 20% del -- orden de 500.

El porcentaje de fracción excluida disminuye en el sen tido:

8 > 10 > 2 > 12 > 3 > 9 > 5 > 4 > 1 > 11 > 13 > 7 > 6

No puede decirse que esta fracción se corresponda con - los ácidos húmicos inmóviles de la electroforesis ya que su peso molecular es solo superior a 10.000. Hay que acudir a un Sephadex de rango superior (en nuestro caso G-100) para observar que efectivamente hay una gran semejanza entre la fracción de K_{av} próximo a 0 y el porcentaje de ácidos húmicos grises obtenidos por -- electroforesis.

De acuerdo con la gel-filtración el grado de polimerización (fracción de $K_{av} \approx 0$) disminuye en el sentido:

9 > 3 > 12 > 8 > 5 > 4 > 1 > 2 > 6 > 10 > 11 > 13 > 7

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por electroforesis y sirven de aclaración acerca de la naturaleza de varios ácidos húmicos; en las muestras 3 y 12 con una relación de - ácidos húmicos inmóviles a móviles muy parecida, se demuestra con el Sephadex que el peso molecular es mayor en la renésina que en la tierra parda.

Igualmente pasa con las muestras 2-6 y 13-7: hay mayor porcentaje de ácidos húmicos de alto peso molecular en las tierras pardas meridionales que^{en} las subhúmedas.

Este estudio ha permitido definir claramente la comple-

-jidad de los ácidos húmicos de la muestra 10 (suelo pardo calizo forestal). De acuerdo con la electroforesis, la razón ácidos-húmicos inmóviles a móviles era muy baja lo que significaría un bajo grado de polimerización; sin embargo, no se tienen en cuenta los ácidos húmicos intermedios. Comparando las curvas de gel-filtración de las muestras 10 y 13 se comprueba la naturaleza menos compleja de los ácidos húmicos del pinar que del sabinar.

Todos los estudios realizados con gel-filtración con Sephadex solo establecen intervalos de pesos moleculares pero no permiten obtener sus valores absolutos. Se han intentado construir curvas de k_{av} frente a pesos moleculares de dextranos conocidos, pero es evidente que no todas las sustancias se comportan igual en la gel-filtración y que la naturaleza de los dextranos no es idéntica a la de los ácidos húmicos por lo que la curva patrón obtenida no es representativa.

Su conocimiento permitiría sacar valiosas conclusiones ya que nos permitiría seguir perfectamente el proceso de humificación del suelo.

Se han utilizado varias técnicas:

- 1) Ultracentrifugación (Flaig: 30.000-50.000 de P.M.)
- 2) Crioscopia (Schnitzer)
- 3) Tamices moleculares: basándose en las gráficas establecidas por Andrews para las proteínas, es posible extrapolar los pesos moleculares de los ácidos húmicos. Estas gráficas representan las variaciones de una relación definida (k_{av} ,) con el logaritmo del peso molecular.

Creemos que el único camino a seguir es el siguiente: Conse-

-guir unas series puras de distintas fracciones de Kav diferentes a través de diferentes tipos de Sephadex y de acuerdo con los intervalos de peso molecular entre los que se encuentra la sustancia. Obtener el peso molecular de esas fracciones y entonces sí es posible construir unas curvas de Kav de ácidos húmicos frente al p.m. de ellos.

CAPITULO VII

CONTRIBUCION AL ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS.

GRUPOS FUNCIONALES

La presencia de grupos carboxilos y grupos hidroxilos fenólicos explica una importante propiedad de los ácidos húmicos: su participación en las reacciones de intercambio.

Utilizando valoraciones potenciométricas se demuestra - que a pH:7, el hidrógeno de los grupos carboxilos es reemplazado y que la sucesiva alcalinización del medio origina un salto en - la curva, que coincide con el reemplazamiento del hidrógeno en - los grupos fenólicos.

La acidez de los ácidos húmicos y fúlvicos es debida a la presencia del hidrógeno dissociable de los grupos carboxilos - aromáticos y alifáticos y a los grupos hidroxilos fenólicos y alcohólicos.

Dado el caracter de estos compuestos es indudable que un conocimiento cuantitativo de estos grupos nos ayudará a conocer más su estructura.

Ya Stadnikov y colaboradores comprobaron que la cantidad de Ba(OH)_2 absorbida por los ácidos húmicos era proporcional a los grupos carboxilos y fenólicos, mientras que la de acetato de calcio lo era a la cantidad de grupos carboxilos. (por diferencia se obtienen los grupos fenólicos).

Druganova demostró que la reacción con Ba(OH)_2 era complicada debido a la adsorción del bario y por eso modificó el método utilizando Cl_2Ba para determinar los grupos totales

Schnitzer emplea Ba(OH)_2 0,25 N y Ac_2Ca 1 N, realizando la operación en atmósfera inerte de nitrógeno para impedir la oxidación de los grupos fenólicos a quinonas.

Argushevich hace un estudio parecido pero trabajando con soluciones más diluidas (0,06N Ba(OH)_2 y 0,04N Ac_2Ca).

Tras el estudio de los diferentes métodos actuales sobre determinación de grupos funcionales y después de varias experiencias realizadas con muestras patronas, hemos puesto a punto un método sencillo para la determinación cuantitativa de estos grupos.

La reacción se ha llevado a cabo en atmósfera de nitrógeno, utilizándose el acetato cálcico 1N para la valoración de los grupos carboxilos y el hidróxido bórico 0,05N para la valoración de los grupos totales.

Los ácidos húmicos estudiados en todos estos análisis se han obtenido utilizando como solución extractante pirofosfato-hidróxido sódico (Kononova).

GRUPOS CARBOXILOS

GRUPOS FENÓLICOS Y CARBOXILOS
(totales)

70-100 mg. de a. húmico pulverizado se colocan en un erlermeyer con tapòn esmerilado de 125 cc. de capacidad.

10 ml. de Ac_2Ca 1N
40 ml. de agua libre² de CO_2

50 ml. de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05N

Agitar 3-4 días fuertemente

Filtrar y lavar el ppdo. con agua libre de CO_2

El filtrado se titula potenciométricamente (con electrodos vidrio calomelanos) hasta pH determinado

Hasta pH: 9,8 con NaOH 0,1N factorada (f) y libre de -- carbonatos

$$\text{meq/l gr.} = \frac{(-V + V') 0,1f}{M}$$

Hasta pH: 8,4 con ClH 0,1N factorado (f')

$$\text{meq/l gr.} = \frac{(V - V') 0,1f'}{M}$$

V= volumen de reactivo gastado en la prueba en blanco

V'= volumen de reactivo gastado en la valoración de la solución problema

M= peso en gramos de ácido húmico libre de cenizas.

Grupos funcionales de ácidos húmicos referidos a 100 -
gramos de muestra libre de cenizas:

El orden va de mayor a menor grado de polimerización

Muestra	meq. totales	meq. COOH	meq. fenoles
9	488	284	204
3	456	251	205
12	364	249	115
8	424	249	174
5	583	274	309
4	530	254	276
1	540	236	304
2	671	226	465
6	502	186	416
11	609	224	385
7	589	202	367
13	590	204	386
10	509	187	322

De acuerdo con esta tabla, parece ser que a medida que --
disminuye el grado de polimerización también disminuye la canti--
dad de grupos carboxilos. En cuanto a los grupos fenólicos, no pa--
rece haber una relación muy clara, aunque se aprecia una Tígera --
tendencia a disminuir al aumentar el grado de polimerización.

ANALISIS ELEMENTAL

Se utilizó un microanalizador Hewlett Parckard 185.
Los resultados están referidos a la muestra libre de cenizas.
El porcentaje de oxígeno se obtiene por diferencia.

a) ACIDOS HUMICOS

Muestra	% C	% H	% N	% O	C/H	O/H
9	59,70	4,42	4,04	31,84	13,50	7,20
3	57,58	4,75	3,5	34,17	12,12	7,19
12	54,2	4,72	3,96	36,58	11,26	7,75
8	57,59	4,51	3,08	34,34	11,54	7,60
5	56,14	4,44	4,54	35,02	10,24	7,88
4	50,14	4,53	3,58	35,75	10,27	7,89
1	47,88	4,49	3,35	43,77	10,66	9,74
2	55,14	4,06	3,08	36,54	10,54	8,98
6	50,43	4,59	3,39	41,05	8,17	8,93
11	48,11	4,64	3	44,25	8,53	9,53
7	48,45	4,72	3,89	42,94	8,47	9,10
13	47,72	4,5	2,03	45,75	8,67	10,16
10	40,41	4,79	1,4	46,60	8,43	9,68

b) ACIDOS FULVICOS

Muestra	%C	%H	%N	%O	C/H	O/H
9	47,40	4,78	1,96	45,86	9,91	9,95
3	50,55	5,12	1,17	43,16	9,87	8,42
12	30,40	5,60	2,03	61,97	5,42	11,06
8	46,09	4,63	1,21	48,07	9,95	10,38
5	48,31	5,30	2,31	44,08	9,12	8,32
4	43,11	5,04	1,25	50,60	8,55	10,03
1	46,21	4,62	1,41	47,76	10,01	10,33
2	46,66	4,62	1,87	46,85	10,04	10,14
6	42,41	5,11	1,19	51,29	8,39	10,03
11	40,36	4,96	1,72	52,96	8,13	10,67
7	49,01	5,20	1,42	44,37	9,42	8,53
13	40,41	4,79	1,14	46,60	8,42	9,73
10	47,98	5,15	0,95	45,92	9,31	8,91

Comentario.-

a) Acidos húmicos.- Los valores de los porcentajes oscilan entre :

C 40-60%
N 1,5-4,5%
H 4,4-4,8%
O 31-46%

En general, se aprecia un porcentaje mayor de C e H - en los ácidos húmicos más polimerizados que en los menos. Asimismo, en éstos últimos el porcentaje de oxígeno es mayor.

La relación C/H no es muy alta lo que indica que no existe en estos suelos un grado de aromaticidad muy alto. Es -- más baja en los compuestos menos complejos, al contrario que la relación O/H.

La relación C/H disminuye en el sentido:

9 > 3 > 8 > 12 > 1 > 2 > 4 > 5 > 13 > 11 > 7 > 10 > 6

La relación O/H aumenta en el sentido:

3 < 9 < 8 < 12 < 5 < 4 < 6 < 2 < 7 < 11 < 10 < 1 < 13

b) Ácidos fúlvicos.- Los valores de los porcentajes oscilan entre:

C	40-50%
N	1-2%
H	4,6-5,6%
O	44-62%

El carbono y el nitrógeno son menores que en los ácidos húmicos, aunque el oxígeno es sensiblemente más alto.

La relación C/H es menor que para los ácidos húmicos y la O/H mayor lo que demuestra un mayor predominio de cadenas alifáticas en los ácidos fúlvicos.

ANÁLISIS ESPECTRAL INFRARROJO

La espectroscopía infrarroja se aplica cada vez más en la investigación de la estructura de las sustancias.

Una molécula no tiene una estructura rígida, sino que, a la temperatura ordinaria los átomos que la componen ejecutan - constantemente vibraciones alrededor de sus posiciones de equilibrio. Las amplitudes de estas vibraciones son muy pequeñas (0,1 a 0,01Å), siendo sus frecuencias relativamente elevadas (10^{13} - 10^{14} ciclos por segundo).

Estas frecuencias son del mismo orden de magnitud que las de la radiación infrarroja, por lo que cabe esperar una interacción de ésta con las vibraciones atómicas de una molécula, - llamadas corrientemente vibraciones moleculares. En efecto, cuando una molécula se ilumina con radiación infrarroja (al no ser - sino una zona del espectro ~~electromagnético~~, cumple con la conocida ley $\lambda \cdot \nu = c$), las vibraciones moleculares que dan lugar a una variación en el momento dipolar de la molécula, llamadas vibraciones activas en infrarrojo, absorben por resonancia, toda o parte de la radiación incidente, cuya frecuencia coincide con la vibración. Si un conjunto de moléculas de una muestra se irradia sucesivamente por una serie de haces infrarrojos monocromáticos y se registra el porcentaje de radiación transmitida, en función de su frecuencia o λ , se obtiene un espectro infrarrojo, íntimamente ligado con la estructura de la molécula.

Por éste método es posible obtener información sobre la

presencia de varios grupos atómicos y funcionales en la sustancia sin destruir su integridad química.

El estudio de las diferentes bandas de absorción nos lleva a las siguientes consideraciones.

1º) Bandas de vibración de hidroxilos.-

Entre 3400 y 3400 cm^{-1} se aprecia en todos los espectros una fuerte absorción debida principalmente a las vibraciones de valencia de los hidroxilos alcohólicos y fenólicos, ligados a las moléculas de los compuestos húmicos. También aparece el agua y los hidroxilos de los silicatos. Los compuestos nitrogenados (enlaces N-H) absorben también hacia 3200 cm^{-1} . Como el contenido en nitrógeno es menos importante en los compuestos húmicos, esta absorción es débil comparada con la de los grupos OH.

La banda es más aplanada para los ácidos húmicos pero presenta un máximo neto hacia los 3400 cm^{-1} para los ácidos fúlvicos.

2º) Bandas de absorción de C-H alifáticos.-

Las vibraciones de valencia C-H dan lugar a dos bandas hacia 2920 - 2850 cm^{-1} ; la primera es la más intensa. También aparece una banda a 1375 correspondiente a los CH_2 y CH_3 alifáticos.

3º) Bandas características de ácidos carboxilos y carboxilatos.-

Hacia 1720 - 1710 cm^{-1} se aprecia una fuerte banda que es atribuida a la vibración de valencia del grupo C=O en los ácidos carboxilos y en las cetonas

La banda es un poco menos fuerte para los ácidos húmi-

-cos que para los fúlvicos. Según Bellamy (1958) los ácidos alifáticos saturados absorben entre 1725 y 1705 cm^{-1} . Entre 1300 y 1200 cm^{-1} hay una banda ancha atribuida al enlace C-O de los ácidos carboxilos y fenoles. El doblete de 1285-1235 sería característico de ácidos alifáticos.

La salinificación provoca la desaparición de la banda a 1720 cm^{-1} .

Las dos nuevas bandas que aparecen son características de vibraciones de valencia asimétrica (1610 cm^{-1}) y simétrica (1380 cm^{-1}) del ión carboxilo. La neutralización provoca la desaparición de la banda a 1285. Existe sin embargo una absorción hacia 1200 - 1230 que es importante y que podría atribuirse a los grupos fenólicos.

4º) Bandas atribuidas a C=C aromáticos.-

Las principales vibraciones de absorción de los núcleos aromáticos están a 1600 y 1510 cm^{-1} . En efecto, la absorción a 1510 es utilizada para establecer relaciones de densidad óptica. Hacia 1600 interfieren varias vibraciones con las de C=C aromático y las bandas correspondientes son muy débiles.

De acuerdo con Theng y Wake (1967) las bandas C=C aromáticas son débiles cuando las materias húmicas se extraen con pirofosfato; la extracción con sosa produce bandas más intensas. Depuis y Janabu (1969) han utilizado pirofosfato y han encontrado un débil hombro a 1510 para los ácidos húmicos. La banda no es muy neta para los ácidos fúlvicos. La absorción se desplaza con la posición de los sustituyentes en el núcleo aromático y así encontraron que, para los ácidos fúlvicos, aparece a 1550 cm^{-1} .

un hombro más nro que a 1510 cm^{-1}

5º) Absorción entre 1200 y 1000 cm^{-1} .-

Esta región engloba el dominio de vibraciones de la función alcohol. Hay también bandas de vibración del enlace Si-O y por lo tanto es muy difícil interpretar las bandas aparecidas en esta región.

Lavina y Egoreva (1956) atribuyen la banda a los alcoholes terciarios a 1150 y a 1130 a los alcoholes primarios. La banda a 1030 está generalmente atribuida a la presencia de silicatos.

También aparece en esta región la banda de vibración correspondiente al C-O en ésteres cíclicos y alifáticos.

La variación de la pendiente de la línea base en la región del espectro infrarrojo comprendida entre 2500 y 1800 cm^{-1} aporta datos interesantes. Si se traza la línea base (tangente al espectro) entre 2100 y 1850 cm^{-1} se observa que la pendiente de esta recta permite distinguir los ácidos fúlvicos de los húmicos. Para los primeros, la pendiente es negativa y para los segundos es positiva o nula.

Dormarr (1967) estima que la pendiente de la línea base en la región considerada del espectro infrarrojo está en relación con el grado de polimerización del humus. Demuestra que una pendiente negativa o nula corresponde a los compuestos menos polimerizados, por ejemplo compuestos húmicos del tipo "podsol". Al contrario, para los compuestos fuertemente polimerizados del tipo chernozemla la pendiente es positiva.

Efectivamente, esto se cumple para los ácidos húmicos

y fúlvicos de los diferentes suelos, pero hay muy poca diferencia entre las pendientes de los ácidos húmicos, lo cual demuestra que ninguno presenta una fuerte polimerización del tipo chernozem. Solamente en el caso del ranker y la rendsina se aprecia una pendiente ligeramente superior a los demás.

Calculando la relación de densidades ópticas de dos -- bandas, se puede comparar las variaciones relativas entre grupos funcionales.

Las relaciones más importantes que permiten poner en evidencia las variaciones de estructura entre diferentes muestras son:

<u>Densidad óptica</u>	<u>Grupos funcionales</u>
3400/1510	(OH/C=C aromáticos)
3400/2920	(OH/C-C alifáticos)
2920/1510	(C-H alifáticos/C=C aromáticos)
1720/1510	(C=O/C=C aromáticos)
1720/2920	(C=O/C-C alifáticos)

Estas importantes relaciones permiten comparar los compuestos húmicos de diferentes tipos de suelos; (tablas 1.1 y 1.2); en general, las dos primeras relaciones son mayores en los ácidos fúlvicos que en los húmicos lo que demuestra un mayor predominio de grupos OH en los primeros. De todas, la más importante es la tercera ya que nos define como está el carbono de la molécula; cuanto menor sea esta relación mayor será el predominio de ani-

Tabla 7, I.- Relación de densidades de s. húmicas
(ópticas)

D.O.		1	2	3	4	5	6
3400/1510	Húmicos	0,88	0,89	0,23	0,87	0,25	1,07
	Fúlvicos	1	1,23	0,78	0,92	1,21	1,19
3400/2920	Húmicos	0,95	1,13	0,64	1	1,2	1,15
	Fúlvicos	0,98	1,2	0,80	1,1	1,3	0,9
2920/1510	Húmicos	0,79	0,9	0,36	0,87	0,76	0,93
	Fúlvicos	1,03	1,04	0,97	0,99	0,94	1,37
1720/1510	Húmicos	0,95	0,9	0,75	1,13	0,76	0,89
	Fúlvicos	1,91	1,71	1,71	1,90	1,66	1,62
1280/1510	Húmicos	0,93	0,88	0,88	0,99	0,97	0,81
	Fúlvicos	1,48	1,37	1,37	1,34	1,49	1,29
1720/2920	Húmicos	1,11	2,09	1,11	2,09	1,29	1
	Fúlvicos	1,63	1,63	1,72	2	1,75	1,18

Tabla 7, II.- Relación de densidades de s. húmicas
(ópticas)

D.O.		7	8	9	10	11	12	13
3400/1510	Húmicos	1,26	1,24	1,19	1,13	1,19	1,23	1,16
	Fúlvicos	1,39	1,25	1,26	1,09	1,33	2,5	1,70
3400/2920	Húmicos	1,41	1,64	1,13	1,43	1,35	1,31	1,09
	Fúlvicos	1,16	1,15	1,49	1,12	1,59	2,6	2,23
2920/1510	Húmicos	0,89	0,76	0,30	0,79	0,88	0,94	0,76
	Fúlvicos	1,20	1	0,89	1	0,83	0,91	1,05
1720/1510	Húmicos	0,97	0,85	1,26	1,06	1,22	0,97	0,97
	Fúlvicos	1,75	1,64	1,71	1,67	0,93	1,3	1,15
1280/1510	Húmicos	0,94	0,7	1,03	1,06	1,04	0,85	1,13
	Fúlvicos	1,31	1,27	2,26	1,50	1,3	1,32	1,20
1720/2920	Húmicos	1,08	1,12	1,36	1,38	1,38	1,03	0,91
	Fúlvicos	1,4	1,60	1,72	1,11	1,11	1,37	1,50

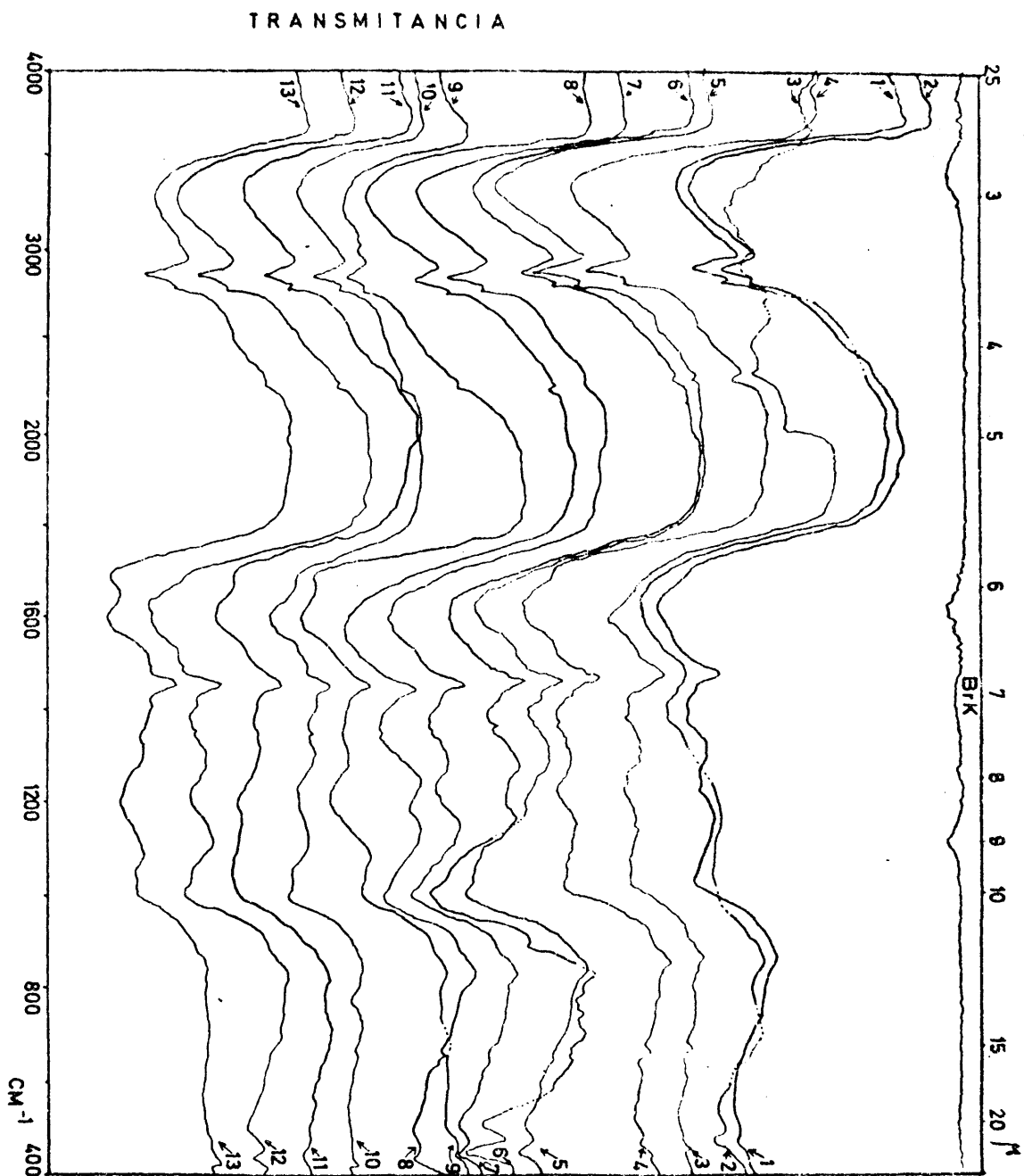


FIG. 25. ESPECTROS INFRARROJOS DE ACIDOS HUMICOS

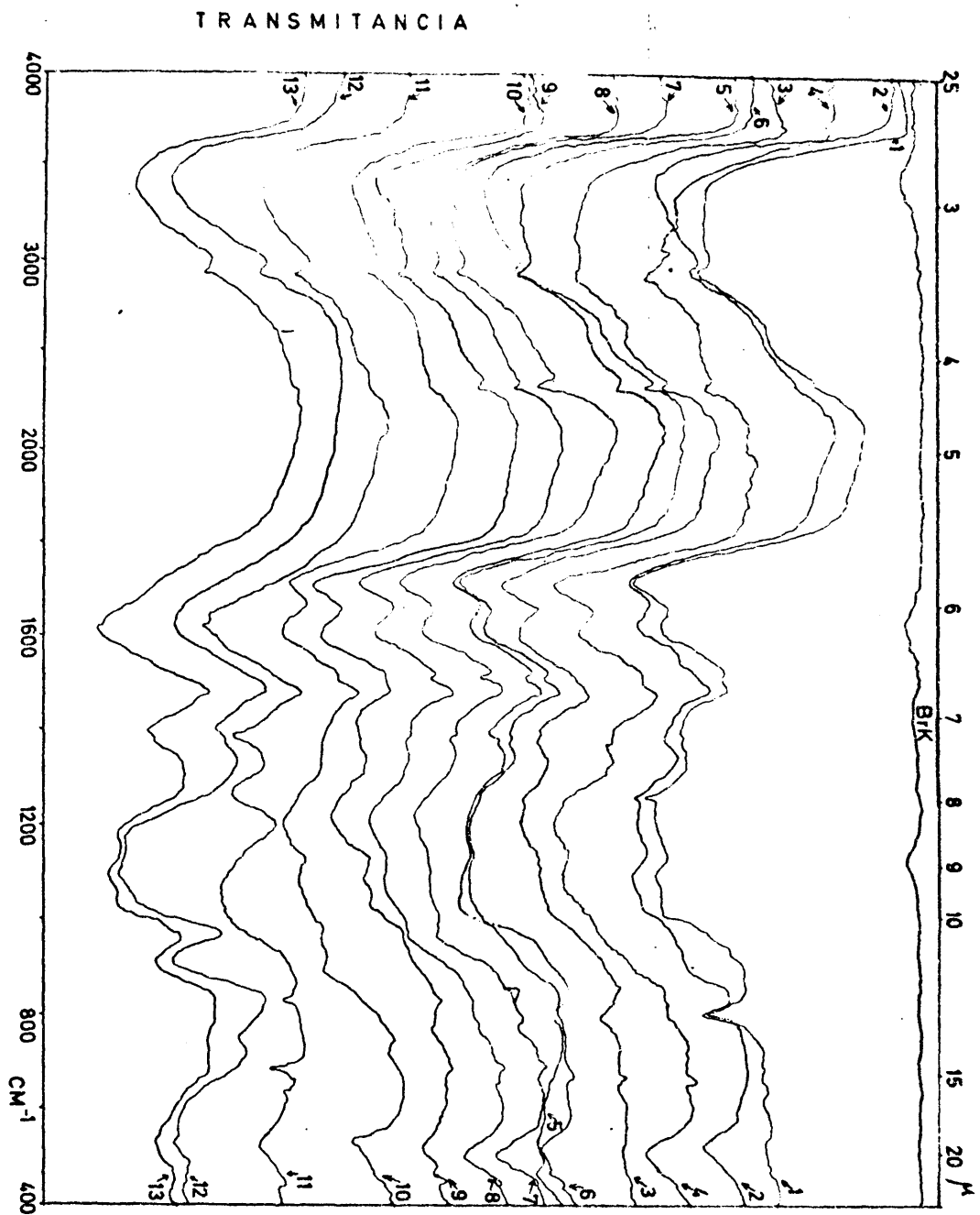


FIG. 26: ESPECTROS INFRARROJOS DE ACIDOS FULVICOS

-llos aromáticos y en consecuencia en el ácido húmico dominará - esta estructura aromática.(ácidos húmicos grises). La relación - es casi siempre mayor en los ácidos fúlvicos, donde predominan - las cadenas alifáticas.

Lo que no se ha conseguido lograr de una manera neta - es la diferenciación de ácidos húmicos grises y pardos. Scharpen - seel (1964) señala solamente que los ácidos húmicos grises presen - tan un espectro infrarrojo donde las bandas están mejor diferen - ciadas pero menos numerosas.

El método de preparar las sustancias es muy importan - te. Se utilizaron pastillas que contienen 300 mg. de BrK y 1,8 - mg. de sustancia.

Para la obtención de los espectros se utilizó un espec - trofotómetro "Perkin-Elmer" 225.

DIFRACCION DE RAYOS X

Los ácidos húmicos no poseen una estructura cristalina clara; todo ésto ha estado sujeto a interpretaciones contrarias; Tyurin (1942) por medio de la difracción de rayos X, encontró -- 2-3 líneas de difracción en los ácidos húmicos de turbas, lo que pondría en evidencia la estructura cristalina.

Sin embargo, estudios posteriores realizados por Flaig y Beutelpacher concluyen que estas líneas de difracción son debidas a una difracción intramolecular y que por lo tanto los ácidos húmicos son amorfos.

Una cosa es evidente y es que esas líneas de difracción existen y Kononova (1956) ha demostrado que son diferentes las de los ácidos húmicos de un chernózem que las de uno procedente de un podsol.

Los estudios realizados en el laboratorio sobre ácidos húmicos de los suelos de nuestro trabajo nos han llevado a la confirmación de que en algunos no aparece ninguna banda y en otros aparece una bastante ancha entre 4,4 - 3,5 Å.

Aparece muy clara en el caso de los ácidos húmicos de un Ranker de Tangel (M-9) del Puerto de Navacerrada y en donde la electroforesis demuestra que hay una elevada proporción de -- ácidos húmicos muy polimerizados. También en dos tierras pardas sub-húmedas con vegetación de Quercus tozza y Fagus silvática -- (M-6 y M-7) y en donde el tipo de humus es un mull forestal y un

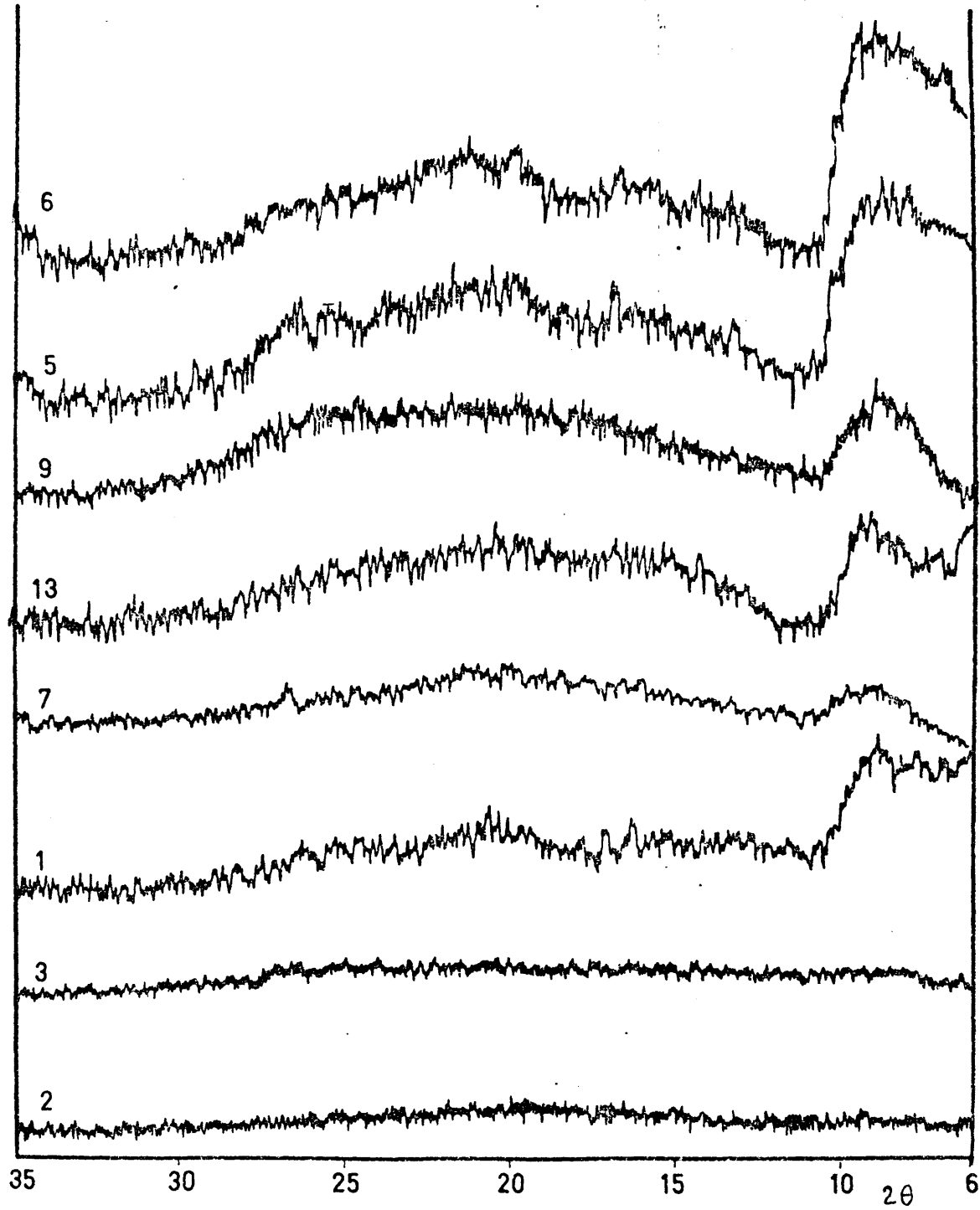


FIG. 27. DIFRACCION DE RAYOS X DE A. HUMICOS

moder forestal respectivamente..Igualmente en dos suelos pardos -- calizos forestales (M-5 y M-13) con vegetación de Quercus lusitana y Pinus halepensis (mull cálcico y mor cálcico respectivamente).

Sin embargo, no se observó en el análisis de difracción de Rayos X de los ácidos húmicos de una rendsina (M-3) y de dos -- tierras tierras pardas meridionales (M-1 y M-2).

Lo que es indudable es que un estudio por difracción -- de Rayos X permite diferenciar los ácidos húmicos por la aparición o no aparición de la citada banda.

En la figura 27 están representados algunos diagramas. Las bandas Y se deben a arcillas (seguramente illitas).

Se ha utilizado para este estudio un Difractómetro Philips modelo PW 1360/00 con contador de centelleo y siendo las -- condiciones técnicas las siguientes:

Radiación= $K\alpha Cu$

Sensibilidad= $\times 1.10^3$

Rendijas= 4° , 0,2 mm.

Muestra= en polvo

Intensidad= 20 mA

Voltaje= 40 Kv

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Tiene un especial interés la observación ultramicroscópica llevada a cabo por Beutelspacher quien llegó a la conclusión de que los ácidos húmicos consisten en partículas esféricas pequeñas capaces de unirse en cadenas y formar agregados en forma de racimos.

A estas mismas conclusiones hemos llegado nosotros. Quizás uno de los mayores problemas sea el de la purificación de las muestras: los ácidos húmicos ya dializados se disuelven en NaOH y se pasan por Sephadex G-50 con el fin de eliminar las sales y de separar las diferentes fracciones a estudiar. Se precipitan dichas fracciones con ClH, se lavan y se añaden a un erlenmeyer con una sol. de ClH a pH= 3,5. De esta forma ya queda preparada la muestra para su estudio.

En las fig. 28 y 29 pueden verse el aspecto que presentan los ácidos húmicos.

Se utilizó un microscopio electrónico Philips 300 y el número de aumentos fué 31.000.

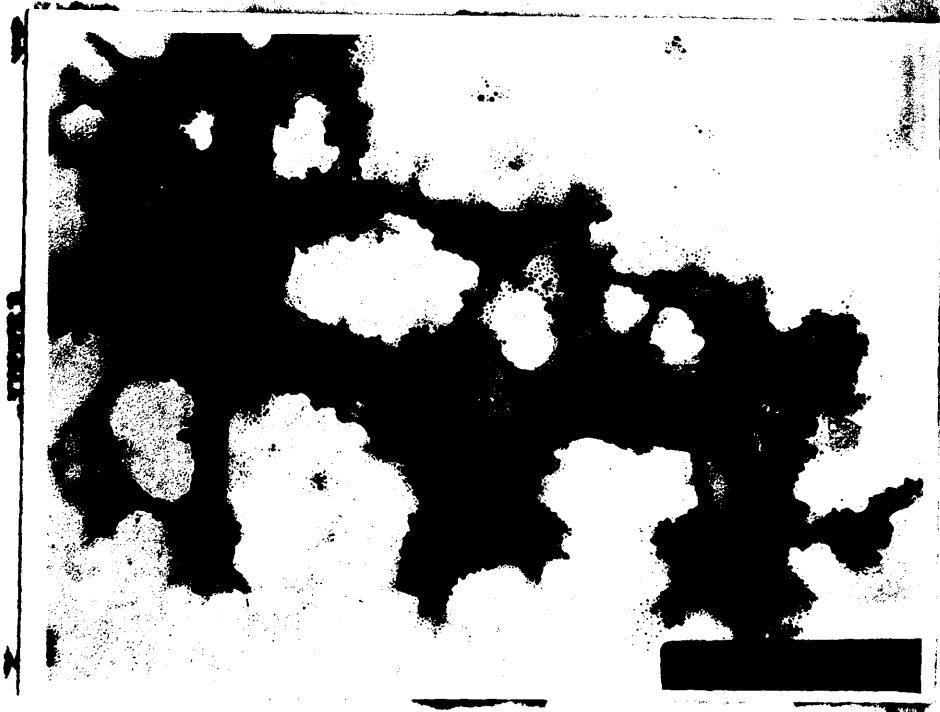


Fig.28.- Acidos húmicos vistos al microscopio electrónico

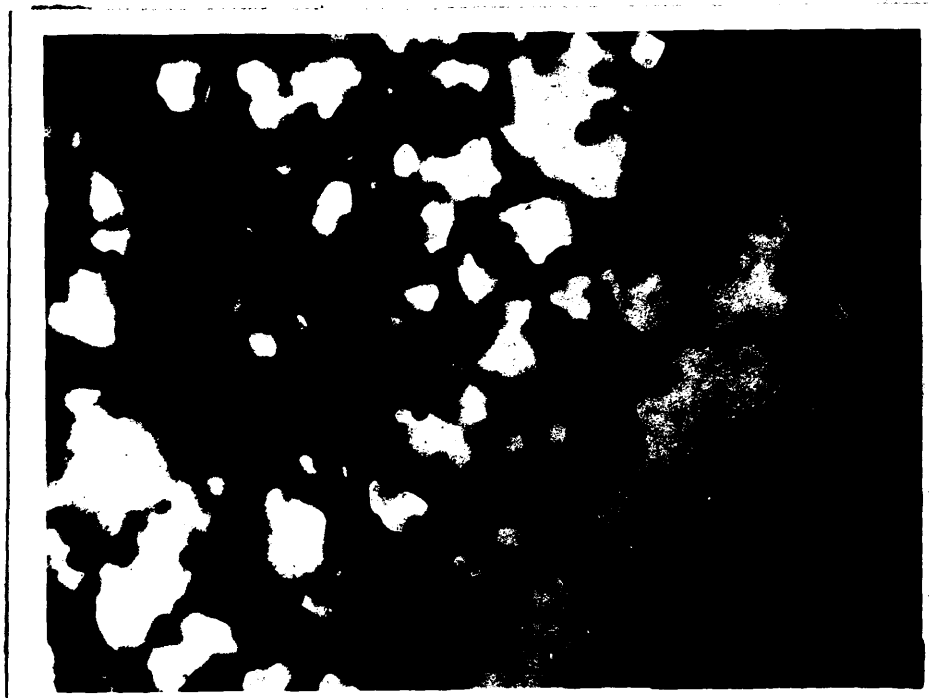


Fig. 28.- Acidos húmicos vistos al microscopio electrónico

CONCLUSIONES GENERALES

Se ha llevado a cabo un estudio de diversos suelos comprendidos en la región semiárida española.

El estudio físico-químico de sus horizontes, así como la naturaleza de las sustancias húmicas de los mismos, han servido para caracterizar, desde el punto de vista edafológico, dicha región.

Las conclusiones generales se pueden incluir en dos -- grupos fundamentales:

- 1) Las que se refieren a la naturaleza de las sustancias húmicas.
- 2) Las relacionadas con los factores que influyen en la humificación.

NATURALEZA DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS

a) Los porcentajes de materia orgánica oscilan entre 4,3 y 18,5%. Expresado en %C respecto del suelo, el porcentaje de ácidos húmicos (0,53 - 1,76%) es superior a~~n~~ de los ácidos fulvicos (0,46 - 1,13%) y el grado de humificación es bajo, oscilando los valores entre 23,7% y 41,3%.

b) Excepto en el ranker y en la rendsina, los valores de la densidad óptica son intermedios (0,7 - 1) lo que indica que el grado de condensación del anillo aromático en la molécula de -

estos ácidos húmicos no es muy bajo.

Excepto en los ácidos húmicos de los dos suelos anteriores que presentan un UMBRAL de coagulación bajo (10 y 15,5 meq. de Cl_2Ca /litro de solución respectivamente) los demás presentan valores más bien altos (20 meq.) lo que indican una relativa resistencia a los electrolitos.

c) Los resultados obtenidos por la electroforesis demuestran que excepto en el ranker, la relación ácidos húmicos inmóviles a móviles es siempre inferior a 0,8 que demuestra un mayor predominio de ácidos húmicos poco polimerizados.

Los porcentajes del carbono respecto a los ácidos húmicos de la fracción inmóvil oscila entre el 16% y el 48,3% y el de fracción móvil entre 37,5% y 72,6%.

d) La gel-filtración con Sephadex G-50 permite demostrar la existencia de una fracción de peso molecular superior a 10.000 que representa aproximadamente el 50% del total.

La utilización de Sephadex G-100 fino permite obtener diferentes fracciones de diferentes peso molecular. En el ranker y la rendsina un 20% aproximadamente tiene un peso molecular superior a 100.000, límite que no se alcanza en ningún otro caso, si bien hay valores que oscilan entre 30-10% de una fracción próxima pero no más altos al límite superior del rango del gel.

De todas las técnicas empleadas es la gel-filtración la que nos permite con mayor precisión separar las distintas fracciones de diferente peso molecular que forman la compleja molécula de los ácidos húmicos.

Teniendo en cuenta que el conocimiento del peso molecu-

-lar de estas fracciones es el dato más importante para caracterizar los compuestos húmicos, es indudable que el empleo de los tamices moleculares es resolutivo, y, si bien de momento, solo podemos hablar de intervalos de pesos moleculares, es indudable que el futuro inmediato nos resolverá completamente el problema.

e) La aplicación de la espectroscopía infrarroja permite poner de manifiesto diferentes grupos funcionales. Las figuras 25 y 26 muestran los espectros infrarrojos de los ácidos húmicos y fúlvicos de los distintos suelos; entre sí, las formas de los espectros es muy parecida lo que demuestra la presencia del mismo tipo de grupos funcionales en la estructura de estos compuestos.

La difracción de rayos X no aclara la naturaleza cristalina de los ácidos húmicos y la microscopía electrónica demuestra la forma esférica de sus partículas y su capacidad de unirse para formar agregados en forma de racimos.

2) FACTORES QUE INFLUYEN EN LA HUMIFICACION

a) Microclima.-- Es una zona bastante seca, donde no hay marcadas diferencias de alternancia de hidromorfía y desecación (factores que son favorables para una buena humificación).-- Del estudio comparativo de los ácidos húmicos de los tres suelos pardos calizos forestales de la zona semiárida con los correspondientes a la de Santander se deduce la importancia de este factor; al aumentar en esta última muestra el periodo húmedo hay mayor solubilización de los compuestos orgánicos solubles que se polimerizarán e insolubilizarán en periodo seco.

b) Roca madre.- La importancia del calcio es extraordinaria; la polimerización de los compuestos húmicos es mayor sobre roca caliza que sobre ácida, siempre que se mantengan constantes - los demás factores que influyan en la humificación, porque por - ejemplo, los ácidos húmicos de las muestras 9 y 12 (sobre roca - ácida) están bastantes polimerizados, aunque aquí es notoria la influencia de la vegetación y del microclima del suelo.

Los mull forestales, todavía ácidos, están caracteriza- dos por el predominio de ácidos húmicos poco polimerizados. Los mull cálcicos de las muestras 8,5 y 10 (mull-moder cálcico) pre- sentan caracteres intermedios entre los mull forestales y el mull cálcico de rendsina donde se realiza una unión íntima entre la - materia orgánica y el calcio del suelo, bien sea por la actividad de las lombrices o bien por la presencia de calcio activo.

Si estas condiciones no se realizan se puede formar mo- der o mor sobre roca caliza. Es lo que sucede en la muestra 13 - (caliza dura y bosque de *Pinus halepensis*).

La diferencia entre los ácidos húmicos de los limos ro- jos 4 y 11 hay que atribuirle también a la roca madre. Sobre roca ácida (11) la humificación es peor.

c) Vegetación.- Se confirma que las coníferas dan restos vegetales que humifican peor que los de las frondosas. Las mues- tras 1 y 2 están tomadas en el mismo sitio y por lo tanto, sola- mente la vegetación es el factor determinante de la distinta natu- raleza de los ácidos húmicos de estas muestras (*Q. ilex* humifica mejor que *J. oxycedrus*).

Las muestras 1,2 y 12 son tierras pardas meridionales. La polimerización de los ácidos húmicos es mayor en la muestra -

Bajo Castanea sativa; también se nota la influencia del sotobosque: las gramíneas presentes en el castañar favorecen más la humificación que las especies tales como Cistus ladaniferus presentes en el encinar.

Dentro de los suelos pardos calizos forestales también se nota la diferencia entre coníferas y frondosas. La humificación disminuye en el sentido:

Q. ilex > Q. lusitanica > J. thurifera > P. halepensis

El estudio de las muestras 6 y 7 nos permite demostrar que la especie Q. tozza humifica mejor que la Fagus silvatica.

Puede establecerse que, en el total de las muestras estudiadas, la humificación disminuye en el sentido:

Coníferas: J. oxycedrus > J. thurifera > P. halepensis

Dentro de las frondosas, Q. ilex humifica mejor que --- Q. lusitanica y Q. coccifera; de ahí, la diferencia entre los ácidos húmicos de las muestras de limos rojos, aparte naturalmente de la influencia de la roca madre.

d) Tipo de humus.-- El tipo de humus que domina es el mull; incorporación total de la materia orgánica a la mineral con formación de complejo arcillo-húmico y transformación biológica fuerte bajo la influencia de las lombrices y bacterias. Este mull puede ser:

- a) cálcico, cuando la roca madre es básica
- b) forestal, cuando es ácida.

No se llega nunca a un predominio de los ácidos húmicos más polimerizados sobre los de menor tamaño molecular.

Puede establecerse el siguiente esquema definitivo:

<u>Muestra</u>	<u>Tipo de suelo</u>	<u>Tipo de humus</u>
1	Tierra parda meridional	mull forestal oligotrofo
2	Tierra parda meridional	mull forestal mesotrofo
3	Rendsina	mull cálcico de rendsina
4	Terra rossa	mull forestal mesotrofo
5	Suelo pardo calizao forestal	mull cálcico
6	Tierraa parda subhúmeda	mull forestal oligotrofo
7	Tierra parda subhúmeda	moder forestal
8	Suelo pardo calizo forestal	mull cálcico
9	Ranker de tangel	tangel
10	Suelo pardo calizo forestal	mull-moder cálcico
11	Rotlehm	mull forestal mesotrofo
12	Tierra parda meridional	moder forestal
13	Suelo pardo calizo forestal	mor cálcico

B I B L I O G R A F I A

- 1) Kononova (1966). " Soil Organic Matter ". Pergamon Press. 2nd ed. 404.
- 2) Kononova, M.M and Titova, N.A 1961.- Use of paper electrophoresis for fractionation of the humic substances of soil - and for study of their complex compounds with iron. Soviet, Soil Sci, n° II, 1230.
- 3) Kononova, M.M and Belchikova, N.P. 1960.- Investigations of - the Nature of soil humus substances. Soviet Soil Science. n° 11, 1149-1155.
- 4) Kononova, M.M et Alexandrova I.V. (1956).- La biochimie des -- processus de formation des matieres humiques. CVI^e Congrès intern Sc. du sol, Paris, 22, vol. C, pag.133
- 5) Kononova, M.M and Belchikova, N.P. 1961.- Quick methods of de- determining the humus composition of mineral soils. Pochvovedenie Iv, pag. 75- 87.
- 6) Druganov (1948). " A comparative study of soil and peat humic - acids ". Pochvovedenis (7), 409.
- 7) Hénin et Turc (1950³). " Essai du fractionnement des matieres - du sol ". IV^e Congrès inter. Sc. du Sol, I, p. 152-154 (Amsterdam).

- 8) Velasco F. (1969). La humificación en los suelos pardos de gradados de Quercus tozza.
Anal. Edaf. y Agrobiol. XXVIII, 7-8, 613.
- 9) Allison, L. E. (1960). Wet combustion apparatus and procedure for organic and inorganic carbon in soil.
Soil.Sci.Soc. of.Am. Proc. 24, 36-40.
- 10) Duchaufour Ph. (1966). "Precis de Pedologie". Masson. Paris.
- 11) Duchaufour Ph. (1970). "Precis de Pedologie". Masson. Paris.
- 12) Duchaufour P. (1960b.). Note sur l'influence des variations du macroclimat du sol dans les processus d'humification.
C.R. Acad-Sci., 250, 4422-4424.
- 13) Duchaufour. Ph. y Jacquin. F. (1963). "búsqueda de un método de extracción y de fraccionamiento de los compuestos húmicos controlados por electroforesis.
Ann. Agron. 14, 885-918.
- 14) Duchaufour. Ph. y Jacquin. F. (1966). Nouvelles recherches - sur l'extraction et le fractionnement des composés humiques.
Bull. Nat. Ecoñ. Sup. Agr. Nancy VIII, Fasc. 1 pag= 3-24.
- 15) Jacquin. F. (1963). Thésés: "Contribution a l'étude des processus de formation et evolution de divers composés humiques.
- 16) Jacquin. F. (1961). Contribution à l'étude d'humus naturels - par electrophorèse sur papier.
Bull. E. N. S. A. N., IV, 2 106-113.

- 17) Jacquin. F. Bruckert S. (1971). Mise au point sur l'utilisation des gels Sephadex pour le fractionnement des composés humiques.
Bull de L'Association Française pour l'Etude du sol n° 2
- 18) Jacquin. F. Calvez C., Dormaar J, (1970). Contribution à l'étude des processus d'extraction et de caractérisation des composés humiques.
Bull AFES, 4, 27-38.
- 19) Tiusley J (1956). "The extraction of organic matter from soils with formic acids".
VI^e Congrès intern. du la Soc. du Sol, Paris, II, 20, - Vol 8 pag. 541-546.
- 20) Monnier, Turc, Jeanson-Lunsing (1962). "Une méthode de fractionnement densimétrique par centrifugation des matières organiques du sol".
Ann. Agron., 13 (1),, 55-63.
- 21) Coulson C.B., Davies R. I. Khan E.J.A. (1959 b.). "Humic acid investigations. II Studies in the fractionation of humic acids.
J. Soil Science 10, 271-283.
- 22) Flodin (1962). "Dextran gels and their applications in gel-filtration".
Pharmacia, UPPSALA-SWEDEN.
- 23) Dorado. E. (1969). "Estudio sobre ácidos húmicos. I fraccionamiento por gel-filtración".
An. Edaf. Agrobiol. 28-269.

- 24) Dorado. E. y del Rio J. (1969). "Estudio de ácidos húmicos (II).
Anal. Edaf. Agrobiol. 28, 869.
- 25) Ferrari. G.; G Dell Agnole (1963).
Soil Science, 96, 418.
- 26) Hubacher, M.H. (1949). "Determination of carboxy groups in aromatic acids".
Anal Chem. 21: 945-947.
- 27) Schnitzer, M. and Gupta C. (1965). "Determination of acidity in soil organic matter".
Soil Sci of Amer. Proc 29, 274.
- 28) Argushevich (1965). "Determination of acid groups in some organic compounds".
Soviet Soil Science 4- Abril. pag. 416.
- 29) Melich. A. (1948) "Determination of cation and anion exchange properties of soils.
Soil. Sci. 66, 429-45.
- 30) Hermando. V. y Sánchez Conde. P. (1954). Estudio del pH en suelos de distintas características
And Edaf y Fisiol. Veg. XIII, 11, 736-66.
- 31) Velasco. F. (1966). Modificaciones del método de Bel'Chikova para la determinación de las propiedades ópticas y el umbral de coagulación
Anal. Edaf. y Agrobiol. XXV, 367-70.

- 32) Alexandrova L.N. (1960 a.). On the use of sodium pirophosphate for isolating free humic substances and their organo-mineral compounds from the soil.
Soviet Soil Sci, 2, 90-97.
- 33) Burges A. (1960aa). Physico-chemical investigations of humic acid.
VII^e Cong. Inter. Soil. Sci., Madison II, 18, 128-133.
- 34) Depuis, et Jambu, P. (1969). Etude par Spectrographie infra-rouge des produits de l'humification en milieu hydromorphe calcique.
Science du sol n° 1, 23.
- 35) Schnitzer. M. (1965). The application of infrared spectroscopy to investigations on soil humic compounds.
Canad Spectroscopy 10, 5, 12.
- 36) Swift R.S. and Posner A.M. (1971). Gel-chromatography of humic acid.
Journal of Soil Science, Vol II, N° 2.
- 37) Flaig W. (1970). Contribution a la connaissance de la constitution et de la syntèse des acides humiques.
Sciences de Sol, 2, 39-72.
- 38) Lindquist I. (1967). Adsorption effects in gel-filtration of humic acid.
Acta chem. Scand., 21, 2564-2566.
- 39) Brook A. J. W., And Housley. S. (1969). The interaction of phenols with Sephadex gels.
J. Chromatog. 41, 200-4.

- 40) Posner, A. M. (1963). "Importance of electrolyte in the determination of molecular weights by "Sephadex" gel filtration, with especial reference to humic acid".
Nature 198, 1161.
- 41) Orlov, D. S. (1962). "Infrared absorption spectre of humic acids."
Soviet Soil Sci. (1962), 1, 15-21.
- 42) Schnitzer M. and Desjardius J. G. (1965). Carboxye and -- phenolic hidroxxy groups in some organic soils and their relación to the degree of humificación.
Can. J. Soil Sc. 45, 257-264.
- 43) Schoichi Tokudome and Ichiro Kauno (1965). Nature of the - humus of humic allophane soils in Japan.
Soil Science and Plant Nutrition, Vol. II, 5.
- 44) Cjessing, E. T. (1965). Use of Sephadex gel for the estimation of molecular weight of humic sustancias in natural water.
Nature, 208, 109.
- 45) Andrews P. (1964). Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel filtration.
Biochem J. 91, 222.
- 46) Velasco. F. (1966). Caracterización de la naturaleza de los ácidos húmicos de diversos suelos forestales pirenaicos.
Anal. Edaf. y Agrobiol. XXV, 9-10, 521.