

La materia orgánica estable del suelo y su caracterización

The stable soil organic matter and its characterization

Carmen Rivero

Facultad de Agronomía. Instituto de Edafología. Aragua-Venezuela

Correo-E: criver@cantv.net

Resumen

Este trabajo constituye una revisión acerca del estado del arte en el área de evaluación y caracterización de la materia orgánica estable del suelo. Se revisan las bondades de técnicas tales como el análisis elemental, espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS), espectroscopía infrarrojo (IR), resonancia de spin electrón (RSE), resonancia magnética nuclear (RMN), rayos X, pirolisis-espectrometría de masas (P-EM), microscopía electrónica, termogravimetría-Infrarrojo (TG-IFTR), punto de focalización isoelectrónica (PFI), electroforesis capilar, viscosimetría, cromatografía y Potenciometría diferencial de barrido (DSP).

Palabras clave: materia orgánica, suelo, espectroscopía, resonancia

Abstract

This paper is a revision about the state of the art in the evaluation and characterization of the stable soil organic matter. The kindness of technical such as the elementary analysis, visible ultraviolet spectroscopy (UV-VIS), infrared spectroscopy (IR), resonance of spin electron (RSE), nuclear magnetic resonance (RMN), X rays, pyrolysis-spectrometry of masses (P-EM), electronic microscopy, termogravimetry-infrared (TG-IFTR), isoelectric focusing (PFI), capillary electrophoresis, viscosity, chromatography and differential potentiometry of scanning (DSP) are revised.

Key words: organic matter, soil, spectroscopy, resonance

Para hablar de caracterizar algo es necesario conocer en detalle ese algo. Por ello resulta muy importante contestar la siguiente pregunta: **¿Qué es la materia orgánica del suelo?**. En tal sentido se debe indicar que aun hoy día existe poca especificidad en el uso de los términos y se tiene como aproximación primaria, aquel concepto que incluye en la misma a toda sustancia del suelo que posea carbono orgánico en su constitución. En general se considera que la materia orgánica del suelo (MOS) posee una fracción viva conformada por los macro y microorganismos del suelo así como las raíces de las plantas que en él crecen y una fracción muerta conceptualizada como una mezcla heterogénea de las diferentes fases de transformación de los materiales orgánicos incorporados al suelo, que varía con el tipo de suelo y con la profundidad.

Es evidente que acometer la caracterización de cada una de dichas fracciones implica la puesta en marcha de métodos apropiados. Así para la caracterización de la fracción viva se han generado una serie de técnicas y procedimientos que van desde la identificación y conteo de los organismos hasta la evaluación de variables vinculadas a las funciones que éstos cumplen en el sistema suelo. Una situación bastante similar se ha producido en el caso de la caracterización de la materia orgánica estable y es precisamente este aspecto el que se abordará en la revisión que a continuación se desarrolla.

Un paseo por el estado del arte en esta área del conocimiento debe necesariamente iniciarse por el hecho de comprender que la primera necesidad a ser cubierta es la referente al requerimiento de sistemas de separación de las fracciones inorgánica y orgánica del suelo, esto implica la ruptura de interacciones de orden físico y químico. En tal sentido, se ha planteado que el aislamiento de la MOS debe, según Dubach y Mehta (1963), atenderse a los siguientes principios:

- Analizar el material sin que se alteren sus características físicas y químicas.
- Aislar las sustancias orgánicas libres de contaminantes.

- Tener la máxima eficiencia, es decir lograr extraer el 100 % del material estable.
- Tener carácter universal, es decir que sea capaz de actuar sobre un variado tipo de suelos.

Para intentar cubrir estos cuatro aspectos se han probado muchos compuestos con capacidad para extraer algunas fracciones particulares o el total de la MOS, cada uno de dichos compuestos ha demostrado lograr grados variables de eficiencia en el proceso de extracción. Al respecto, Stevenson (1994) señaló los siguientes:

- Bases Fuertes: el NaOH ha sido el compuesto más usado a través del tiempo y ha resultado muy apropiado para la extracción de sustancias húmicas (SH) con una eficiencia alrededor de un 80%.
- Sales Neutras: dentro de este grupo destaca el uso del $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ que extrae SH, aun cuando su eficiencia es relativamente baja, aproximadamente un 30%.
- Quelantes Orgánicos: son varios los agentes quelantes utilizados, sin embargo la 8-Hidroxiquinolina ha sido de los más usados dado que extrae sustancias húmicas con una eficiencia alrededor de 55%.

Ahora bien, en la actualidad se ha intentado establecer un método estándar para la extracción, para ello se ha propuesto seguir el método tradicional, basado en la extracción con agentes alcalinos, y posterior fraccionamiento del extracto obtenido de acuerdo a la solubilidad diferencial de cada una de las fracciones estables en ácidos y álcalis. La modificación fundamental consiste en usar como extractante una mezcla 50:50 de una base fuerte, usualmente el NOH 0,1M, con una sal neutra, usualmente $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1M, proceso que logra eficiencias por encima del 70%. Luego se continúa la separación de las fracciones por acidificación y centrifugación, esto puede ser resumido de la siguiente manera:

- Se toma una cantidad definida de suelo y se le agrega la mezcla de extractante en una proporción 1:10, se coloca en atmósfera de nitrógeno y se deja en agitación por 24 horas. La cantidad de suelo a utilizar dependerá del contenido de carbono orgánico del mismo así como del tipo de estudio que se lleva adelante.
- Se separa por centrifugación el extracto alcalino (contiene los ácidos húmicos, los fúlvicos y las sustancias no húmicas) del suelo residual en el cual quedan adheridas las sustancias orgánicas de mayor recalcitrancia química.
- Se acidifica el extracto alcalino (a pH entre 1 y 2) y se deja en reposo por veinticuatro horas.
- Concluido este periodo se separa, por centrifugación, el floculado (ácidos húmicos) del sobrenadante (ácidos fúlvicos más sustancias no húmicas).
- Los ácidos húmicos son entonces purificados por uso de membranas de diálisis con un corte de peso molecular apropiado, usualmente 5.000 unidades Dalton.
- El sobrenadante es luego pasado a través de columnas de resinas para su purificación. El método más reciente establece el uso de la resina polivinilpirrolidona, para separar los ácidos fúlvicos de las sustancias no húmicas (Ciavatta *et al.*, 1990).

Una vez obtenidas estas fracciones estables se procede a su estudio con diferentes técnicas que permitan obtener información acerca de las estructuras tales como: sus pesos moleculares, grado de polimerización, grado de condensación y su comportamiento fisicoquímico en general. Algunas de estas técnicas serán revisadas a continuación:

Análisis elemental: Consiste en determinar el contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre y oxígeno de las moléculas de ácidos húmicos y fúlvicos aislados del suelo, hoy día esto se realiza con el uso de los modernos analizadores elementales, los cuales pueden determinar entre tres y cuatro elementos en una sola corrida. En estos análisis es usual que el oxígeno sea obtenido por diferencia. La información permite obtener las relaciones atómicas de los distintos elementos en la molécula húmica, ello podría constituirse en una herramienta para evaluar las modificaciones, a mediano y largo plazo, de la estructura de las moléculas como consecuencia de la intervención antrópica del suelo. El Cuadro 1 muestra un ejemplo de los resultados de este tipo de análisis, aplicados a suelos venezolanos.

Cuadro 1. Composición elemental y relaciones atómicas de los ácidos húmicos de una toposecuencia de los llanos venezolanos (Rivero *et al.*, 1998b).

Suelo	% C	% H	% N	% S	% O
Banco	50,12	4,86	4,07	0,37	40,58
Bajío	50,37	4,19	4,13	0,28	41,03
Estero	53,43	4,55	4,26	0,35	37,41

Espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS): la producción de bandas de absorción de radiación, en el sector del UV-VIS, cuando se analizan las sustancias húmicas (SH), es originada por la presencia en las moléculas de anillos aromáticos, dobles enlaces u orbitales electrónicos delocalizados, que poseen bajas energías de excitación.

Un registro de estas bandas permite calcular la absorptividad molar de las SH y la magnitud de la absorción para diferentes longitudes de onda en esta región del espectro. La aplicación de estas mediciones ha dado origen a algunos métodos de caracterización de las SH entre los cuales se mencionan:

Relación E_4/E_6 : es definida como la relación entre la absorbancia a 465 y 665 nm, respectivamente de una solución de ácidos húmicos o fúlvicos en NaHCO_3 amortiguado a pH 8,2 (Kononova, 1966), es un parámetro de muy sencilla obtención y bajo costo. La interpretación de esta relación indica que valores bajos de la misma, implican un alto grado de aromaticidad, en tanto que valores altos indican un mayor contenido de cadenas alifáticas. Al respecto, Chen *et al.* (1977), señalaron que esta relación presenta una alta correlación con el contenido de radicales libres, O, C y COOH, la acidez total y el peso molecular del material. El Cuadro 2 ilustra valores obtenidos para distintos órdenes de suelos venezolanos.

Cuadro 2. Relaciones E_4/E_6 obtenidas para ácidos húmicos de suelos venezolanos

Referencia	Tipo de suelo	Uso	E_4/E_6
Paolini, 1980	Oxisol	Bosque amazónico mixto	5,11
Paolini, 1980	Spodosol	Caatinga amazónica	6,06
Rodríguez, 1982	Entisol	Moriche	3,36
Rivero, 1993	Alfisol	Cultivo de maíz	3,86
Rivero, 1993	Alfisol	Sabana	5,53
Rivero, 1993	Inceptisol	Cultivo de maíz	4,82
Ruiz, 1995	Ultisol	Sabana	3,54
Rivero et al., 1998a	Entisol	Sabana	5,0
Rivero et al., 1998a	Inceptisol	Cultivo de banano	4,8

Mediciones de fluorescencia: cuando se produce la absorción de radiación se da luego un fenómeno de pérdida de la misma: esta pérdida puede ser en forma de fluorescencia, cuando se retorna al estado basal. El aprovechamiento de este fenómeno permite obtener tres tipos de espectros de fluorescencia: de emisión, de excitación y sincronizados. En el primer caso, se mantiene constante la energía de excitación; en el segundo la de emisión y para los sincronizados se varían ambas simultáneamente y lo que se mantiene constante es la diferencia entre ambas. La Figura 1 muestra los espectros sincronizados obtenidos en seis órdenes de suelos en Venezuela.

Son muchas las investigaciones que se han adelantado con el uso de la espectroscopia de fluorescencia como técnica de trabajo; se han logrado buenos resultados para cualificar la MOS y diferenciar moléculas húmicas formadas en diferentes ambientes (Schnitzer y Khan, 1978, Paolini, 1980, Senesi, 1992, Rivero *et al.*, 1998 a y b).

Clasificación de ácidos húmicos (Kumada, 1987): es un sistema que ubica estos compuestos en cinco grupos: A, B, R_p, P_o y P, de acuerdo a su posición en un sistema de ejes coordenados (figura 2) mediante el cálculo de los valores $\Delta\log K$ (donde K es la absorbancia medida a 400 y 600 nm, respectivamente) y el RF, obtenido mediante la expresión:

$$\frac{K_{600}}{c} 100$$

Donde c es la concentración de carbono orgánico en la muestra. El autor indica que la complejidad de la molécula aumenta en el orden P_o > P > B > A, y para validar su propuesta obtuvo información a través de una técnica adicional: la espectroscopia infrarrojo.

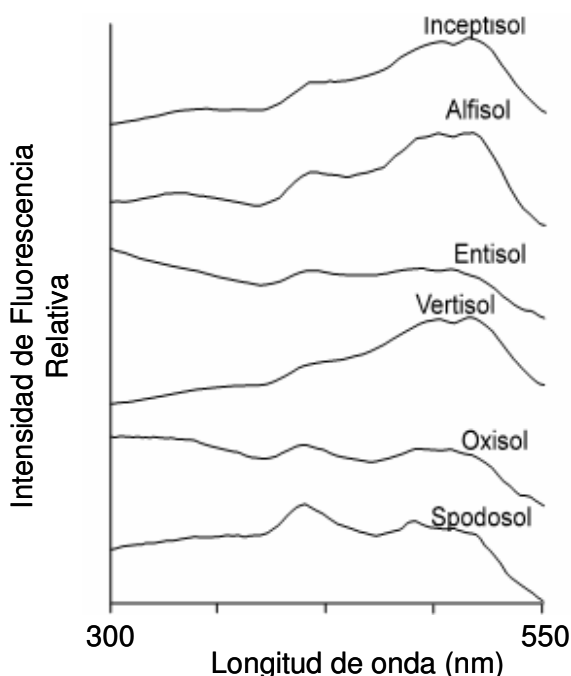


Figura 1. Espectros de fluorescencia de excitación de seis órdenes de suelos (Rivero *et al.*, 1998a)

Espectroscopía infrarrojo (IR): La presencia en las SH de grupos funcionales capaces de absorber radiación en el sector IR, ha convertido esta técnica en una valiosa herramienta para estudiar la naturaleza, reactividad y arreglo estructural de las mismas. Permite además, detectar la presencia o ausencia de proteínas y carbohidratos o de impurezas inorgánicas. El análisis de los espectros IR fue usado por Stevenson y Goh (1971) para clasificar las sustancias húmicas en cinco grupos con base en el tipo de grupos funcionales detectados. Es conveniente destacar que el infrarrojo con transformadas de Fourier es una técnica altamente efectiva desde el punto de vista cualitativo. En todo caso, Senesi (1992) plantea que la información obtenida por IR debe ser complementada por la aplicación de otras técnicas analíticas. En el país, Rivero *et al.* (1998a) aplicaron esta técnica en suelos de Venezuela y encontraron espectros similares a aquellos señalados para suelos de otras regiones climáticas (Figura 3).

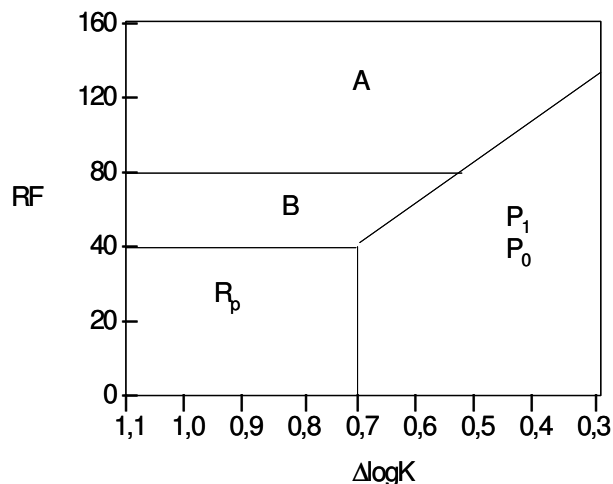


Figura 2. Diagrama de Kumada para la clasificación de ácidos húmicos.

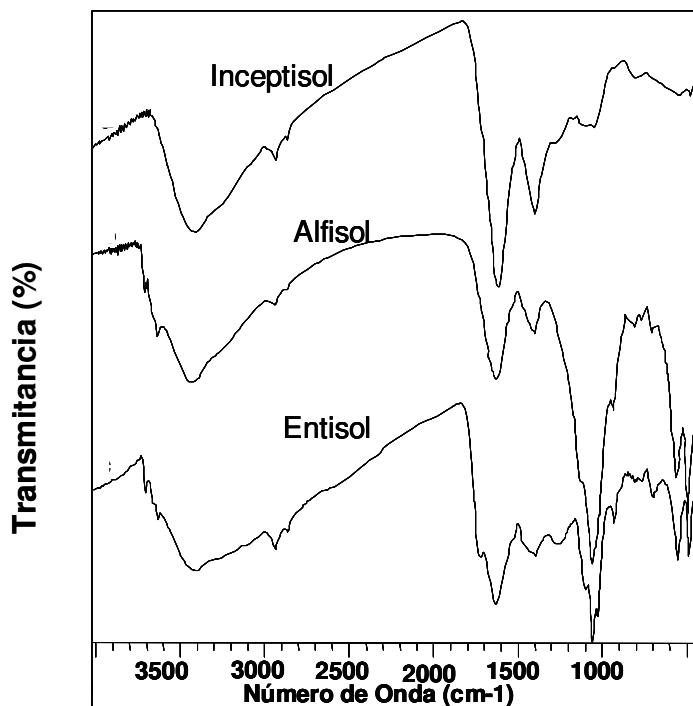


Figura 3. Espectros IR-TF de tres órdenes de suelos venezolanos (Rivero *et al.*, 1998a).

Resonancia de spin electrón (RSE): Se fundamenta en el aprovechamiento del efecto Zeeman y se evalúa el desdoblamiento en el nivel de energía de un electrón desapareado cuando se aplica un campo magnético. Esto provoca una modificación del factor g típico de un electrón libre ($g = 2,00232$). La medición de la magnitud de la radiación absorbida, manteniendo constante la frecuencia de la radiación y variando la magnitud del campo, es lo que permite obtener los espectros de resonancia de spin electrón.

Senesi (1992) indica que mediante el análisis de un espectro RSE de una muestra sólida de SH se conoce la presencia, naturaleza y concentración de los radicales libres presentes en las mismas. Los parámetros obtenidos de dichos espectros son el factor g, la amplitud de la señal y la concentración de electrones no apareados o "spines". Rivero *et al.* (1998b) usan esta técnica para caracterizar los ácidos húmicos de una toposecuencia, banco-bajo-estero, en los llanos venezolanos (Figura 4).

Los parámetros RSE permiten inferencias sobre la reactividad de las SH en lo referente a sus posibilidades de intervenir en reacciones químicas, bioquímicas y fotoquímicas por cuanto ellos indican la presencia de sistemas donadores – aceptores de electrones, La técnica también ha sido señalada como muy útil en el estudio de complejos de la MOS con metales presentes en el mismo tales como vanadio, cobre y hierro.

Resonancia magnética nuclear (RMN): El uso de esta técnica permite analizar la posición de los átomos de hidrógeno (resonancia de protones) y de carbono (resonancia de ^{13}C) de las SH, mediante la obtención de sus espectros. Sciacovelli *et al.* (1980) y Schnitzer (1991), dividen los espectros de ^{13}C en las siguientes regiones:

- 0 - 40 ppm: carbono en cadenas rectas, ramificado, alcanos cíclicos y ácidos alcanóicos.
- 41 - 60 ppm: carbono en ramificaciones alifáticas, aminoácidos y grupos metoxilos
- 61 - 105 ppm: carbono en carbohidratos y en estructuras alifáticas que contienen carbono enlazado a hidroxilos, éteres o presentes en anillos de 5-6 miembros enlazados a oxígeno
- 106 - 150 ppm: carbono aromático.
- 151 - 170 ppm: carbono fenólico.
- 171 - 190 ppm: carbono en grupos carboxílicos, carbonilos y esterés.
- 180 - 220 ppm: carbono en aldehídos y cetonas.

La técnica RMN ha cobrado mucha importancia en los estudios de MOS y se ha planteado como una de las herramientas ideales en los mismos. La Figura 5 ilustra el tipo de espectro obtenido para ácidos húmicos de leonardita (LHA), ácidos húmicos de suelos (SHA) y ácidos húmicos comerciales. En estos espectros es posible identificar, con base en los criterios antes señalados, el tipo de estructura presente.

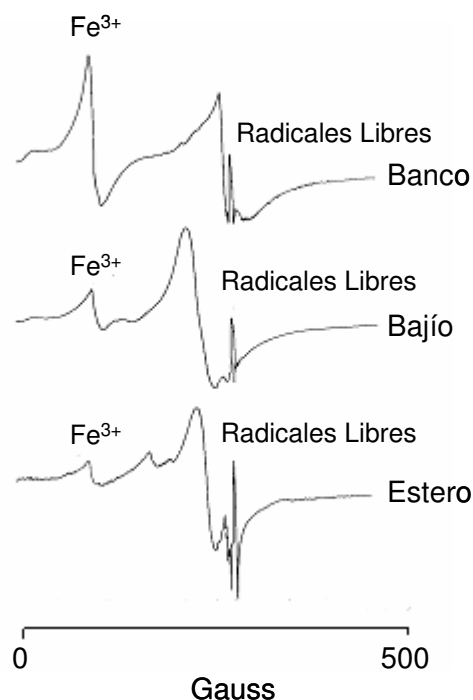


Figura 4. Espectros de RSE de diferentes suelos venezolanos (Rivero *et al.*, 1998b)

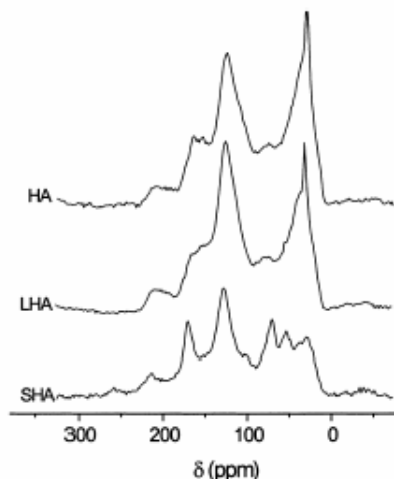


Figura 5. Espectros de RMN de diferentes ácidos húmicos (Monteil-Rivera *et al.*, 2000)

Rayos X: La aplicación de rayos X a muestras de ácidos húmicos permite obtener difractogramas que facilitan la determinación de las dimensiones de la moléculas húmicas; en tal sentido Wershaw *et al.* (1967), usaron esta técnica para medir el tamaño de las partículas de humato de sodio, ellos concluyeron que, en solución, es posible detectar dos o más tamaños para un material extraído del mismo suelo y al mismo tiempo. Más recientemente, Monteil-Rivera *et al.* (2000) aplicaron la técnica para identificar el tipo de grupos presentes en la molécula y la energía de los enlaces (Figura 6).

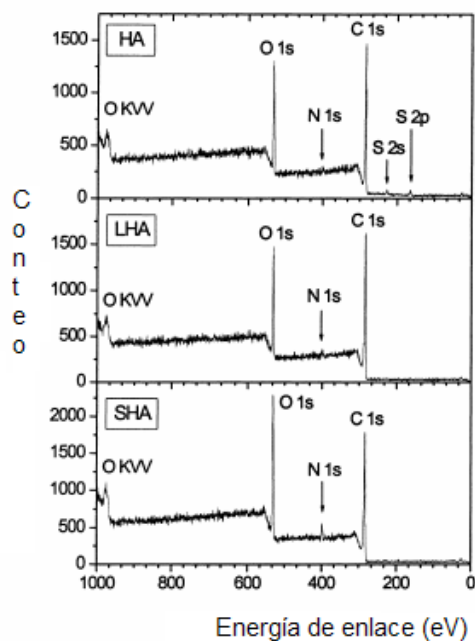


Figura 6. Espectros de Rayos X de diferentes ácidos húmicos (Monteil-Rivera *et al.*, 2000)

Pirólisis-espectrometría de masas (P-EM): La técnica consiste en efectuar la pirólisis directa de la muestra de SH al vacío en un espectrómetro de masas, el cual permite identificar moléculas cargadas o fragmentos iónicos productos de la pirólisis. Estas unidades generan un espectro cuyas líneas dependen de la relación masa/carga de la entidad química, parámetro que es característico y conocido como número de masa. La interpretación de los datos obtenidos de la pirólisis implica un conocimiento detallado del comportamiento pirolítico de los compuestos estudiados. La Figura 7 muestra el tipo de espectros obtenidos.

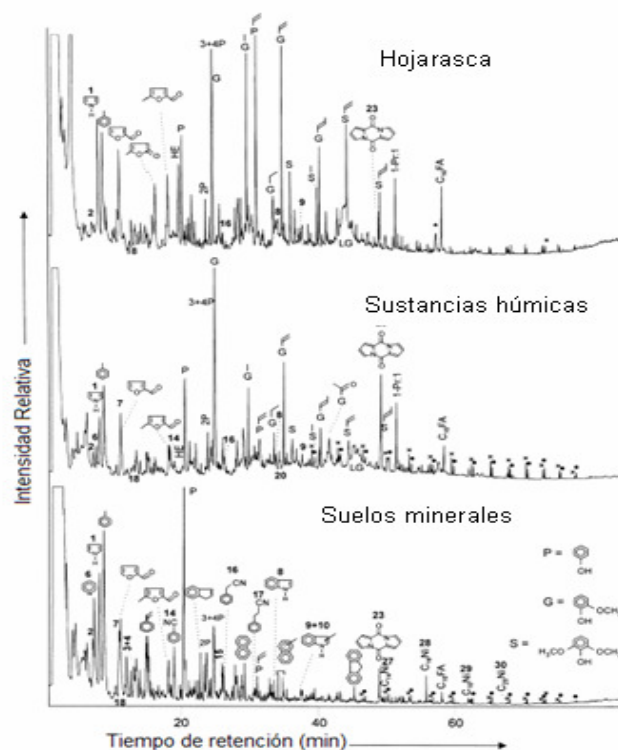


Figura 7. Espectros de pirólisis espectrometría de masas de compuestos orgánicos (Kögel-Knabner, 2000)

Microscopía electrónica: Se ha usado para estudiar la estructura macromolecular de los ácidos húmicos y fúlvicos, así como la formación de complejos con arcillas. No obstante se le atribuyen muchas dificultades derivadas de la susceptibilidad de la molécula de SH al bombardeo electrónico y de la formación de "compuestos artificiales" como consecuencia de la interacción de dichas moléculas con las membranas de parlodion-carbono usadas en el microscopio. Se ha usado tanto la microscopía electrónica de transmisión como la de barrido (Lobartini y Tan, 1988; Chen, 1994). La Figura 8 muestra las imágenes obtenidas en este tipo de evaluación

Termogravimetría-Infrarrojo (TG-IFTR): consiste en someter una pequeña cantidad de muestra a calentamiento, inicialmente a unos 100°C y luego se lleva a unos 900°C. Los gases que evolucionan son simultáneamente transferidos a un espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier, esto permite obtener una serie de espectros de IFTR en secuencia temporal (Geyer *et al.*, 2000). La figura 9 muestra los espectros obtenidos por estos autores para los ácidos húmicos de un suelo.

Además de las técnicas descritas, cuyo uso se ha extendido notablemente en los últimos tiempos dada la alta calidad de la información que generan, los estudiosos han ensayado un número bastante considerable de otras técnicas; muchas de las cuales han resultado de utilidad limitada. Sin embargo, existe un pequeño grupo que a pesar de no gozar de amplia difusión han resultado de bastante utilidad en algunos casos particulares y entre las cuales es posible citar:

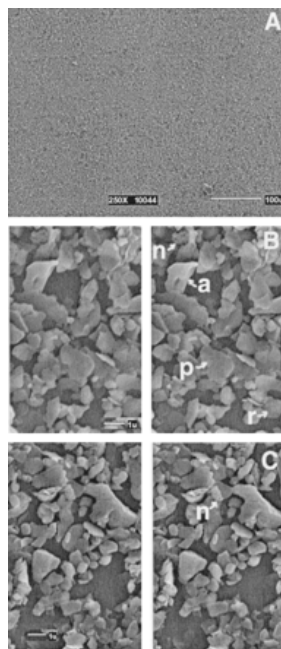


Figura 8. Imágenes de microscopio electrónico de complejos arcillas sustancias húmicas (Laird, 2001)

Punto de focalización isoelectrónica (PFI): la técnica consiste en separar las SH en un gel del tipo sephadex o poliacrilamida al cual se le añade un anfolito para crear un gradiente de pH, la separación de los distintos analitos se verifica con base a su respectivo punto isoelectrónico (Schmitt *et al.*, 1997; De Nobili *et al.*, 1988).

Electroforesis capilar. El uso de esta técnica está basado en la separación por electroforesis capilar de las SH, en un sistema con pH buferado a 3,5; esto es posible debido a que el pK_a de los grupos funcionales de las SH se encuentra en el rango comprendido entre 3,5 y 5,0 (Schmitt-Kopplin *et al.*, 1998)

Viscosimetría y Cromatografía: ambas se han utilizado para determinar propiedades de las SH tales como su peso molecular (Visser, 1985; Gonet y Wagner, 1996, Lombardini y Jardin. 1999). En el caso del uso de cromatografía ha recibido especial atención la cromatografía de exclusión por cuanto permite una buena separación de las moléculas en función de su peso molecular (Pelekani *et al.*, 1999)

Potenciometría diferencial de barrido (DSP): su aplicación permite titular pequeñas cantidades de muestras de SH, ligeramente solubles en medio acuoso, con el establecimiento de las zonas de cargas positivas y negativas. Esto permite obtener información acerca de las características ácido-base de las SH, las constantes de disociación aparente y el desarrollo de cargas. La Figura 10 muestra el tipo de grafico que se construye en este caso (Ceppi *et al.*, 1999).

Ahora bien, la aplicación de algunos de estos métodos no resulta, en muchos casos fácil dada la instrumentación que requieren. Sin embargo, pareciera que el conocimiento acerca de la composición y características de la materia orgánica estable permitiría inferir acerca de su efecto real sobre propiedades de suelo, de relevante importancia, como la estructura o la capacidad de intercambio catiónico, por lo que al menos una serie de determinaciones mínimas deberían realizarse. En tal sentido se recomienda que la ejecución de manera conjunta de al menos dos de las técnicas basadas en la espectroscopia visible la cual está ampliamente difundida, y en general es de bajo costo, podría ayudar a disponer de una información que al menos permita una garantía mínima en la toma de decisiones del manejo de un determinado suelo, con ello se espera ir siempre en la dirección de lograr la sostenibilidad de los agrosistemas.

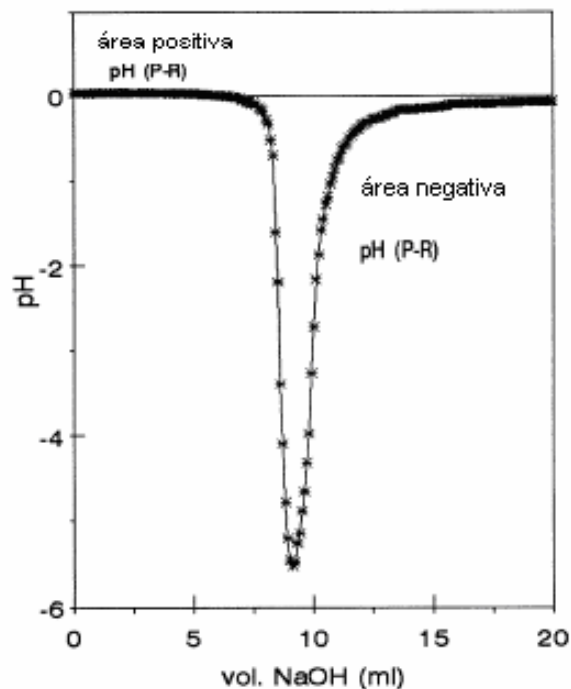


Figura 10. Curvas de titulación por potenciometría diferencial (Ceppi *et al.*, 1999)

LITERATURA CITADA

- Ceppi, S.B., M.I. Velasco, C.P. De Pauli. 1999.** Differential scanning potentiometry: surface charge development and apparent dissociation constants of natural humic acids. *Talanta* 50 (1999) 1057–1063.
- Chen, M., M. Senesi y M. Schnitzer. 1977.** Information provided on humic substances by $E_4:E_6$ ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41:3-53-357.
- Chen, Y. 1994.** Electron microscopy techniques applied to soil organic matter and soil structure studies. 15th World Congress of Soil Sci. Transactions. 3a:85-99
- Ciavatta, C., Govi, L. Vittori Antisari y Sequi, P. 1990** Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone. *Journal of chromatography*, 509: 141–146.
- De Nobili, M. 1988.** Electrophoretic evidence of the integrity of humic substances separated by means of electrofocusing. *J. Soil Sci.* 39:437-446.
- Dubach P. y N. C. Metha. 1963.** The chemistry of soil humic substances. *Soil and Fertilizer* 24:293-300.
- Geyer, W., F.A.-H. Hemidia, L. Brüggemann, G. Hanschmann. 2000.** Investigation of soil humic substances from different environments using TG-FTIR and multivariate data analysis *Thermochemica Acta* 361: 139-146
- Gonet, S.S., K. Wagner. 1996.** Viscosimetry and chromatographic studies of soil humic acid. *Environment International*. 22:485-488.
- Kögel-Knabner, I. 2000.** Analytical approaches for characterizing soil organic matter. *Organic Geochemistry* 31:609±625.
- Kononova, M. 1966.** Soil organic matter. 2^a Ed. Pergamon Press, Oxford. 404 p.

- Kumada, K. 1987.** Chemistry of Soil Organic Matter. Japan Scientific Societies Press. Elsevier. Tokyo. 241 p.
- Laird D. 2001.** Nature of Clay-Humic Complexes in an Agricultural Soil II. Scanning Electron Microscopy Analysis. Soil Sci. Soc. of Am. J. 65:1419-1425
- Lobartini, J. C. y K. H. Tan.1988.** Differences in humic acid characteristic as determined by carbon-13 nuclear magnetic resonance, scanning electron microscopy and infrared analysis. Soil Sci. Soc. Am. J. 52:125-130.
- Lombardini, A.T., W.F. Jardin. 1999.** Fluorescence spectroscopy of high performance liquid chromatography fractionated marine and terrestrial organic material. Wat. Res. 33:512-520.
- Monteil-Rivera, F., E. B. Brouwer, S. Masset, Y. Deslandes, J. Dumonceau. 2000.** Combination of X-ray photoelectron and solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy in the structural characterisation of humic acids. Analytica Chimica Acta 424:243-255
- Paolini J. 1980.** Caracterización de las sustancias húmicas extraídas de suelos típicos del bosque húmedo tropical del San Carlos de Río Negro, T. F. Amazonas. Acta Cient. Venezolana.31:415-420.
- Pelekani, C., G. Newcombe, V. L. Snoyink, C. Hepplewhite, S. Assemi, R. Beckett. 1999.** Characterization of natural organic matter using high performance size exclusion chromatography. Environ. Sci. Technol. 33:2807-2813
- Rivero, C. 1993.** Evaluación de la materia orgánica nativa e incorporada en suelos de importancia agrícola en Venezuela. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía. UCV. 200 p.
- Rivero, C., N. Senesi, J. Paolini, V. D'Orazio. 1998a.** Characteristic of soil humic acid of some venezuelan soils. Geoderma 81:227-239.
- Rivero, C., J. Paolini, N. Senesi, V. D'Orazio. 1998b.** Spectroscopic characterization of humic acids of a soil toposequence in venezuelan plains (llanos). Comn. Soil Sci. Plant Anal. 29(19/20):2893-2904
- Rodríguez de L., S. 1982.** Caracterización de la materia orgánica de suelos del alto y bajo llano. Tesis de Magister. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. 141 p.
- Ruiz, M. 1995.** Caracterización de la materia orgánica asociada a microagregados de suelos de dos toposecuencias ubicadas en el estado Guárico. Tesis de Magister. Facultad de Agronomía. UCV. 207 p.
- Schmitt, Ph., A.W. Garrison, D. Freitag, A. Kethrup.1997.** Capillary isoelectric focusing (CIEF) for the characterization of humic substances. Wat. Res. 31:2037-2049.
- Schmitt-Kopplin, Ph., A.W. Garrison, E.M. Perdue, D. Freitag, A. Kethrup. 1998.** Capillary electrophoresis in the analysis of humic substances facts and artifacts. J. Chrom. A. 807: 101-109
- Schnitzer, M. y S. U. Khan. 1978.** Soil organic matter. Elsevier Scientific Publishing Co. New York. 319 p.
- Schnitzer, M. 1991.** Soil organic matter - the next 75 years. Soil Sci. 151:41-58.
- Sciakovelli, O., C. Gess, P. Ruggiero y C. Testini. 1980.** ^{13}C NMR spectra of soil organic fractions extracted with organic solvents. Soil Biol. Bio-chem. 12:389-395.
- Senesi, N, 1992.** Metal-humic substance complexes in the environment. Molecular and mechanistic aspect by multiple spectroscopic approach. In Biogeochemistry of trace metals. D. C. Adriano (ed.) Lewis Publishers. London. pp. 429-496.
- Stevenson, F. J. 1994.** Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions. John Wiley and Sons. New York. 496 p.
- Stevenson F. J. y K. M. Goh. 1971.** Infrared spectra of humic acid and related substances. Geochim. et Cosmochim. Acta. 35:471-483.
- Visser, S.A. 1985.** Viscosimetric studies on molecular weight fractions of fulvic and humic acid of aquatic, terrestrial and microbial origin. Plant Soil. 87:209-221.
- Wershaw, R., P. Burcar, C. Sotula y B. Wiginton. 1967.** Sodium humate solution studied with small-angle X-Ray Scattering. Science. 157:1429-1431.