

## INVESTIGACIONES BÁSICAS SOBRE EL ORIGEN Y LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LAS FORMAS ESTABLES DE MATERIA ORGÁNICA RELACIONADAS CON EL PROCESO DE SECUESTRO DE CARBONO EN LOS SUELOS

G. ALMENDROS

Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), Serrano 115 B, 28006-Madrid (España).  
E-mail: humus@ccma.csic.es

**Abstract.** In favourable situations, and by means of the application of appropriate analytical techniques (sequential chemolysis, derivative spectroscopy (visible and infrared) or  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance after selective degradation), it is possible to evaluate to some extent the different, simultaneously occurring, biophysicochemical stabilization mechanisms of C in soils.

While classic concepts postulated a causal connection between the aromatic structures and the stability of soil humus (traditional hypotheses considering lignins and aromatic microbial metabolites as major starting materials to form soil organic matter), recent evidences have been presented about the importance of the humification mechanisms exclusively based on aliphatic precursors, such as carbohydrates (either by fire's effects or by catalytic dehydration reactions in soil reducing microcompartments) and lipids (condensation of unsaturated fatty acids or alteration of aliphatic biomacromolecules that include nonhydrolyzable esters).

Apart from the interest of knowing the potential of C sequestration in different types of soil, the biogeochemical models of the C cycle require the evaluation not only of the total amount, but also of the nature, origin and resilience of the sequestered organic matter, which justify the application of specific techniques that inform on their molecular structure.

**Key words:** Humic acid, fulvic acids, humins, biomacromolecules, biodegradation, humification, selective preservation, diagenesis.

**Resumen.** En situaciones favorables, y mediante la aplicación de técnicas analíticas apropiadas (quimiólisis secuencial, espectroscopía derivatográfica (visible e infrarroja o resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  tras degradaciones selectivas) es posible evaluar, en cierta medida, la contribución diferencial de diferentes mecanismos simultáneos de estabilización biofísicoquímica del C en los suelos.

Mientras los conceptos clásicos postulaban una relación causal entre la presencia de estructuras aromáticas y la estabilidad de la materia orgánica del suelo (hipótesis tradicionales que consideraban las ligninas y los metabolitos aromáticos microbianos como el principal material de partida para la formación de las sustancias húmicas), también se han presentado evidencias recientes sobre la importancia de los mecanismos de humificación, basados exclusivamente en precursores alifáticos, como son los carbohidratos (tanto por efecto del fuego como por reacciones de deshidratación catalítica en microcompartimentos reductores del suelo) y los lípidos (por condensación de ácidos grasos insaturados o alteración de biomacromoléculas alifáticas incluyendo ésteres no hidrolizables).

Aparte del interés de conocer el potencial de secuestro de C en los diferentes tipos de suelo, los modelos biogeoquímicos sobre el ciclo del C requieren de la evaluación, no sólo de la cantidad total, sino también de la naturaleza, origen y resiliencia de la materia orgánica secuestrada, lo que justifica la aplicación de técnicas específicas que informen sobre su estructura molecular.

**Palabras clave:** ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, huminas, biomacromoléculas, biodegradación, humificación, preservación selectiva, diagénesis.

## INTRODUCCIÓN

### Procesos edáficos y secuestro de C

El secuestro de C se define como el proceso por el cual el CO<sub>2</sub> de la atmósfera se convierte en formas de C almacenadas fundamentalmente en el suelo y la biomasa, quedando así inmovilizado respecto a la circulación biogeoquímica durante largos periodos de tiempo. El C del aire es metabolizado por los organismos fotosintéticos, y utilizado en la biosíntesis de macromoléculas complejas. Tras la muerte de las plantas, los residuos orgánicos (hojas, ramas, raíces) junto con la necromasa microbiana se descomponen en el suelo, y una parte de su C es incorporado al mismo (proceso de humificación), en tanto que el restante es devuelto a la atmósfera tras la transformación de la materia orgánica en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (proceso de mineralización). Debido al carácter relativamente recalcitrante de estas formas de materia orgánica en el humus—desde cientos a miles de años—el secuestro de C en el suelo puede desempeñar una función sustancial en el control de la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, contribuyendo a mitigar el calentamiento global asociado al cambio climático (Batjes, 1996).

Ciertas estimaciones sugieren que el conjunto de los suelos del planeta representan el principal reservorio de C, alcanzando probablemente de 1.500 a 2.000 Pg (1 Pg = petagramo = 1 billón de toneladas métricas) de C orgánico. Un reservorio de esta naturaleza representaría más del doble del C de la biomasa vegetal (alrededor de 560 Pg) o de la atmósfera (750 Pg). De aquí, que incluso pequeños cambios en las tasas de secuestro de C en los suelos por unidad de área, puede tener un impacto muy significativo en el balance global de C a nivel terrestre. En este balance debería considerarse también que otros 800 a 1.000 Pg representarían el C en forma de

carbonatos (Schnitzer, 1978; Buringh, 1984; Eswaran *et al.*, 1995; Batjes y Sombroek, 1997).

Asumiendo la posibilidad de controlar el proceso de secuestro edáfico de C por medio de prácticas adecuadas de manejo del suelos, podría considerarse que extensas zonas semiáridas degradadas o desertificadas en todo el planeta, pueden representar un potencial real para secuestrar grandes cantidades de C atmosférico (Batjes y Sombroek, 1997; Glenn *et al.*, 1993). Dicha posibilidad reviste gran interés con respecto a los programas transnacionales de gestión de suelos: en una economía globalizada que plantea un mercado real de *bonos de carbono*, deberían desarrollarse prácticas relativamente sencillas y económicas, asociadas a herramientas analíticas de monitorización, que permitan verificar la eficacia de la estabilización del C en los distintos suelos. En este sentido, los programas de secuestro de C a gran escala adquieren un especial atractivo científico, social y económico, por lo que posiblemente adquirirán mayor desarrollo en el futuro (Hall, 1989; Batjes, 1998).

La evaluación de los mecanismos responsables de la estabilización de CO<sub>2</sub> atmosférico en formas orgánicas de C resistentes a la biodegradación en los suelos, se encuentra grandemente limitada debido a que no solo se desconocen muchos de los aspectos estructurales de la materia orgánica, sino también a que sus mecanismos de formación se han descrito en términos muy generales. Esta situación se hace especialmente patente en el caso de las *sustancias húmicas*, que consisten en macromoléculas complejas, diferentes—o grandemente modificadas—respecto a las constituyentes de la biomasa. Estas sustancias representan la mayor parte de la reserva de C resistente a la biodegradación en suelos y sedimentos.

### La eficacia variable del secuestro de C en el suelo

En general, el secuestro de C en el suelo no tiene lugar con la misma intensidad en los distintos compartimentos del ecosistema. Su eficacia es máxima bajo condiciones (climáticas, geológicas y biológicas) que sólo concurren en determinados escenarios ambientales (Post *et al.*, 1982; Rodríguez-Murillo, 2001).

La condición del suelo como reserva de C a largo plazo es un tema controvertido. Existen resultados discordantes entre diversos estudios realizados en suelos desarrollados bajo distintas condiciones bioclimáticas y sobre diferentes sustratos geológicos (Hontoria *et al.*, 1999; Ganuza y Almendros, 2003). Además del clima, la vegetación y otros factores como la textura del suelo y su composición mineralógica, se encuentran estrechamente relacionados con el potencial del suelo para actuar como una reserva estable de C. En efecto, los suelos agrícolas no están sistemáticamente contemplados como sumideros de C en el protocolo de Kyoto (particularmente en el Artículo 3.4), ya que no se ha alcanzado un acuerdo internacional sobre la eficacia real del secuestro de C por parte de todos los suelos (Duxbury, 1995; Fisher *et al.*, 1995). En consecuencia, la elaboración del Inventario de Sumideros de C ha encontrado numerosos obstáculos en la medida que los suelos agrícolas no fueron considerados en las primeras etapas del Acuerdo de Kyoto.

A pesar de que se ha realizado cierto progreso en los últimos diez años en el establecimiento de los factores biogeoquímicos que controlan el secuestro de C, que es el objetivo principal de este artículo, también debe profundizarse en el análisis de los factores socioeconómicos y culturales que, en último término, son los que determinan la viabilidad del secuestro de C en el suelo (Devevre y Horwath, 2000).

### Consideraciones sobre los efectos colaterales del secuestro de C

El secuestro activo de C, sobre todo en zonas semiáridas y subhúmedas, no sólo permitiría mitigar los efectos de las emisiones de C a la atmósfera, sino que también proporcionaría beneficios adicionales para los suelos empobrecidos. La acumulación de formas estabilizadas de materia orgánica permitiría controlar simultáneamente la erosión y desertificación de ciertas áreas, y constituiría un método ambientalmente respetuoso para mejorar la producción agrícola y la conservación a largo plazo de los suelos. En términos agronómicos, los mecanismos que conducen al secuestro de C en el suelo corresponden a la formación de *sustancias de naturaleza húmica*, con sus efectos derivados de descomposición de residuos de cosechas, agregación estable de los suelos, formación de complejos organominerales, acumulación en profundidad de materia orgánica bajo el horizonte de laboreo, enraizamiento profundo y calcificación.

En resumen, los beneficios indirectos del secuestro de C en el suelo se reflejan en la mejora de la estabilidad estructural, la capacidad de retención de agua, la disponibilidad de nutrientes en formas de liberación retardada, la actividad microbiana, etc. Todas estas características se encuentran asociadas al potencial de la materia orgánica para regular la composición de la solución del suelo, optimizando el consumo de macro- y microelementos. Así, el incremento en la cantidad de C estabilizado junto con la fracción mineral el suelo aumentan la capacidad de éste para actuar como filtro ambiental con respecto a la lixiviación, degradación y biodisponibilidad de contaminantes orgánicos y minerales, fundamentalmente residuos de plaguicidas y metales pesados (Khan y Schnitzer, 1972; Hargitai, 1989; Almendros, 1995).

En este punto, debería tenerse en cuenta que, además del C, también se secuestran

bioelementos como son el N y el P, que quedan estabilizados en las formaciones de humus (Almendros *et al.*, 2000b). De esta forma, y sobre todo en suelos forestales, el secuestro masivo de C podría venir acompañado por la acumulación de espesos horizontes de humus bruto o poco descompuesto (tipos *moder*, *mor*...), un ciclo biogeoquímico de escasa actividad y una producción primaria limitada. En tales formaciones de humus, la materia orgánica y la mineral se encuentran asociadas fundamentalmente mediante mecanismos físicos, en comparación con los tipos de humus más activos (*mull*). La acumulación de materia orgánica poco transformada no favorece la formación de complejos órgano-minerales estables, y se manifiesta en la redistribución vertical de las fracciones orgánicas a lo largo del perfil y en generación de lixiviados que, en algunos casos, pueden tener un efecto desfavorable en la calidad de las aguas al exportarse C y nutrientes del ecosistema.

Es por ello que, en un contexto de política de gestión global de los suelos, parecería adecuado centrar el interés en monitorizar no tanto la *cantidad* total de C secuestrado, sino la *calidad* de la materia orgánica bajo las diferentes formaciones edáficas. Por ejemplo, en muchas regiones semiáridas con muy baja concentración de C por unidad de peso de suelo, la materia orgánica se encuentra altamente transformada y muestra una elevada resiliencia respecto a posibles cambios climáticos. Esta situación contrasta con la de suelos forestales en regiones subhúmedas, donde se acumulan grandes cantidades de materia orgánica en fases iniciales de evolución. Tras un posible cambio climático que supusiera el incremento de la temperatura terrestre en unos pocos grados, estos suelos con formas de C poco evolucionadas, y escasa asociación entre las fracciones orgánica y mineral del suelo, podrían pasar a actuar como ecosistemas emisores con un balance positivo de emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera (Goudriaan, 1995). Por esta razón, el presente artículo se centra en los factores dependientes de la

condición del suelo que se encuentran causalmente relacionados con la eficacia del secuestro de C, con independencia de los condicionamientos climáticos (temperatura y humedad).

### **Investigaciones básicas sobre el secuestro de C en los suelos**

Podría considerarse que, en último término, el secuestro a largo plazo de C en el suelo no es sino la formación de *sustancias de naturaleza húmica*. Estos productos macromoleculares se encuentran ampliamente distribuidos en suelos, aguas y en sedimentos recientes y fósiles; representan la mayor reserva de C en la superficie del planeta (Schnitzer, 1978). Las sustancias húmicas presentan una estructura muy compleja y poco conocida, con constituyentes derivados de la alteración de materiales biosintéticos, pero también con estructuras neoformadas en el propio suelo (tanto de mediante mecanismos abióticos como a partir de macromoléculas de origen microbiano).

En los últimos años, los estudios de las complejas relaciones funcionales que ejercen las sustancias húmicas en relación con los procesos agroecológicos del suelo han adquirido una especial relevancia, haciendo necesaria una reevaluación biogeoquímica de los procesos de humificación en el marco del cambio global y la degradación de los suelos. Esta labor es especialmente compleja, por cuanto las sustancias húmicas no poseen una estructura química definida, y su composición debe establecerse a partir de descriptores analíticos no bien establecidos, tales como la magnitud de diferentes dominios estructurales, la presencia de fracciones constituidas por macromoléculas selectivamente preservadas—que conservan cierta semejanza estructural con biomacromoléculas vegetales o microbianas—o la identificación de compuestos biomarcadores con valor quimiotaixonómico. Los progresos en estas investigaciones a lo largo de los últimos años

han sido posible gracias al desarrollo de nuevas herramientas analíticas e instrumentales (Stevenson, 1982). Sin embargo, todavía es preciso profundizar en muchos aspectos que permitan explicar la función de la materia orgánica del suelo en procesos de cambio global, así como establecer su función directa en la conservación y productividad de los ecosistemas terrestres.

### **Alternativas experimentales para monitorizar los procesos de secuestro de C en el suelo**

Parece claramente establecido que existen diferentes mecanismos simultáneos que pueden ser responsables del secuestro de C en los suelos (Falloon y Smith, 2000). Entre ellos, se cuenta la preservación selectiva de fracciones de biomasa, la diagénesis de biomacromoléculas y la humificación por neoformación *sensu stricto* (microbiana, enzimática o abiótica). En los casos más favorables, es posible establecer de su variable incidencia en los distintos tipos de suelos, por medio de técnicas específicas de caracterización molecular de las sustancias húmicas (aislamiento y análisis de compuestos biomarcadores libres (Almendros et al., 1996b), degradación química selectiva seguida de espectrometría de masas (Schnitzer y Khan, 1972; Almendros *et al.*, 1996a) o técnicas no-destructivas como la espectroscopia visible o infrarroja y la resonancia magnética nuclear (Wilson, 1981; González-Vila *et al.*, 1983; Preston y Ripmeester, 1982).

### **Constituyentes de la materia orgánica del suelo: biomacromoléculas y sustancias húmicas**

Sólo una proporción limitada del total de la materia orgánica del suelo (principalmente la de origen reciente) muestra una estructura química que puede ser asimilada a la de los constituyentes macromoleculares de la

biomasa (sobre todo vegetal y microbiana). Algunas de estas sustancias orgánicas (p. ej., celulosa y hemicelulosas, ligninas, cutinas y suberinas) pueden experimentar alteraciones estructurales en los suelos (diagénesis) tales como cambios en el contenido de grupos funcionales, condensación o despolimerización, o incorporación de productos derivados del metabolismo microbiano (p.ej. lípidos o proteínas). A pesar de que se considera que estos constituyentes de las plantas son rápidamente metabolizados y transformados en su mayor parte en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (proceso de mineralización) también es posible que, sobre todo en determinados tipos de suelos en los que concurren factores ambientales o geológicos específicos, una proporción significativa de estas sustancias permanezcan estable durante un considerable periodo de tiempo como resultado de sus interacciones con otros componentes del suelo.

Además de los anteriores constituyentes, que presentan estructura química más o menos definida, gran parte de la materia orgánica estabilizada en el suelo (fracciones particuladas o coloidales), consisten en una mezcla de sustancias macromoleculares con estructura tridimensional y caótica, diferente a la de las macromoléculas constituyentes de la biomasa. Dichas *macromoléculas húmicas* incluyen dominios aromáticos y alifáticos (*O*-alquílicos y alquílicos) así como grupos funcionales oxigenados dispuestos sobre superficies de diferente reactividad (Wershaw *et al.*, 1977). Para este tipo de sustancias no es posible actualmente establecer modelos estructurales estequiométricos.

A pesar de su estructura química extremadamente compleja, las sustancias húmicas son ampliamente estudiadas debido a que no sólo representan una *fuentes de información* sobre las características y función de los ecosistemas, sino también a que ejercen una gran influencia sobre la estructura del suelo y sobre la movilidad (y biodisponibilidad) de la práctica totalidad de los componentes (orgánicos e inorgánicos) de

la solución del mismo. Debido al largo tiempo de residencia media de las sustancias húmicas, y a la presencia simultánea de diferentes componentes estructurales provenientes de gran variedad de precursores y mecanismos de formación, las macromoléculas húmicas podrían considerarse, en cierta medida, como un registro biogeoquímico de procesos ambientales actuales y pretéritos, correspondientes a las diferentes etapas en las que ha tenido lugar la formación de la materia orgánica.

En el presente capítulo se revisan varios procesos, tradicionalmente considerados en relación con la formación del humus, así como algunos conceptos más recientes sobre el posible origen de las formas estables de carbono en los suelos.

### **FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ESTABILIZACIÓN DEL CARBONO EN EL SUELO**

La acumulación de formas estables de C en el suelo depende de varios factores o procesos donde la *composición* química y las *interacciones de la materia orgánica con otros constituyentes edáficos* se encuentran implicados con importancia comparable. Entre los factores más relevantes con respecto a la retención de formas estables de C podrían señalarse:

#### **Factores intrínsecos**

Este grupo incluiría aquellos factores relacionados con la naturaleza química de los constituyentes orgánicos del suelo y los diferentes niveles de organización de su estructura macromolecular.

#### *La estabilidad de las unidades estructurales*

La resistencia de los componentes químicos de la materia orgánica frente a la degradación (biológica, química, térmica) se encuentra relacionada en cierta medida con las

proporciones relativas de las distintas unidades estructurales (aromáticas, alquílicas, oxigenadas o nitrogenadas). En particular, las unidades aromáticas han sido tradicionalmente consideradas más recalcitrantes frente a la degradación que las estructuras alifáticas (*O*-alquílicas, alquílicas). Entre estas últimas, las estructuras *O*-alquílicas (sobre todo los carbohidratos) son frecuentemente consideradas como las que son utilizadas preferentemente por los microorganismos. En los últimos años se ha realizado un progreso considerable en el conocimiento de la estructura de las macromoléculas húmicas, describiéndose la variabilidad en las proporciones de sus distintos constituyentes, que puede ponerse de manifiesto por medio de métodos de degradación suave (producen rendimientos variables de residuos resistentes a la degradación) o utilizando una secuencia de degradaciones (liberación progresiva de constituyentes de diferentes dominios macromoleculares) (Haworth, 1971; Martín *et al.*, 1981; Almendros y Sanz, 1989, 1992).

#### *Factores relacionados con los enlaces intramacromoleculares*

Ha sido indicado que la estabilidad de la materia orgánica respecto a distintos tipos de degradaciones se encuentra estrechamente relacionada con el *grado de condensación estructural* que, a su vez, se relaciona con el número de enlaces intramacromoleculares, o con las proporciones de “unidades estructurales” polifuncionales. Ello podría ilustrarse por la diferente susceptibilidad frente al ataque enzimático de las ligninas tipo siringilo y tipo guayacilo. Las primeras presentan mayor número de unidades fenólicas con dos grupos de metoxilo, lo que determina menores posibilidades de conectividad entre las unidades estructurales (Martínez *et al.*, 1990). La “resistencia potencial” puede ser evaluada en el laboratorio por medio de técnicas apropiadas como son los métodos selectivos de

degradación secuencial, o métodos para la ruptura controlada de tipos de enlace específicos (Almendros y González-Vila, 1987; Almendros y Sanz, 1991; Almendros *et al.*, 1998).

#### *Estabilidad inducida por la estructura caótica*

Se han presentado ciertas evidencias experimentales que relacionan el grado de desorganización estructural de la materia orgánica con su resistencia a la biodegradación (Almendros y Dorado, 1999). En efecto, desde el punto de vista de la evolución biológica, la humificación es un proceso que dificulta a los microorganismos obtener beneficio inmediato de la materia orgánica en forma de recursos para su metabolismo. A lo largo de los procesos de humificación se produce un incremento progresivo en la complejidad estructural de las macromoléculas húmicas (estructura caótica y morfología fractal) lo que las hace progresivamente menos reconocibles por las enzimas microbianas. Las posteriores perturbaciones de los ecosistemas a lo largo del tiempo, junto con la "memoria a largo plazo" en la estructura de las sustancias húmicas (González-Vila *et al.*, 1987; Tinoco *et al.*, 2002) han sido relacionadas recientemente con la estabilización del C.

#### Factores extrínsecos

Además de los factores climáticos generales y los factores locales o "estacionales" (hidromorfía, temperatura, topografía, etc.) que no conciernen directamente al objetivo de este artículo—que se centra en los factores dependientes del propio suelo—hay una serie de factores que no dependen de la composición química de la materia orgánica secuestrada. Entre estos factores podrían señalarse:

#### *Protección física*

Fundamentalmente en el caso de la materia orgánica incorporada recientemente al

suelo, hay un gran número de procesos que dependen de los patrones de microcompartimentación de las fracciones particuladas (Oades, 1988; Skjemstadt *et al.*, 1996). Los horizontes edáficos están constituidos por agregados de diferentes tamaños, que proporcionan una gran diversidad de microambientes donde las reacciones químicas y biológicas tienen lugar a diferentes velocidades (Ladd *et al.*, 1993; Golchin *et al.*, 1994). En general, la protección física de sustancias, que de otra forma serían fácilmente biodegradables, suele encontrarse asociada a procesos conocidos como de *preservación selectiva* (Eglinton y Logan, 1991) que pueden tener lugar por encapsulación de partículas orgánicas incorporadas en microagregados, donde se encontraría impedida la difusión de las enzimas. La *especiación física* de las huminas (fracciones húmicas insolubles en extractantes alcalinos) se encuentra asociada frecuentemente a los patrones de acumulación de compuestos alquílicos recalcitrantes (Almendros *et al.*, 1991; Oades *et al.*, 1987; Schulten y Schnitzer, 1990).

La *influencia de los carbonatos* en la estabilización tanto de la materia orgánica en formas solubles o particuladas es también importante en los suelos calcimorfos (Duchaufour y Jacquín 1975; Oyonarte *et al.*, 1994). Por otra parte, no debería ser descartada la influencia adicional de los *lípidos del suelo* en la impermeabilización de las superficies de los agregados, ya que incrementan su estabilidad y la eficiencia de la encapsulación de la materia orgánica (Spaccini *et al.*, 2000).

#### *Interacciones entre las superficies orgánicas y minerales de la matriz del suelo*

Las interacciones entre los coloides orgánicos y minerales (Greenland, 1971) contribuyen al incremento en la resistencia de la materia orgánica frente a la degradación química y biológica (Calvo de Anta y Díaz

Fierros, 1982; Deuel, 1960). Con relación a estos procesos, se han descrito tradicionalmente una serie de minerales especialmente activos. La función estabilizadora de la componente alofánica en la acumulación de formas estables de materia orgánica en suelos desarrollados a partir de cenizas volcánicas ha sido descrita en numerosas ocasiones. Puede obtenerse una estimación del grado de asociación de los coloides húmicos con los coloides minerales del suelo (arcillas y óxidos de Fe y Al) mediante el empleo de métodos drásticos de desmineralización en el laboratorio, seguidos por la extracción de las fracciones orgánicas liberadas tras dichos pretratamientos. Estas metodologías permiten reconocer la cantidad de C en forma de complejos estables con arcillas y sesquióxidos, a los que suele hacerse referencia con el término de *huminas de insolubilización extraíbles* (Merlet, 1971).

#### *Inhibidores del crecimiento microbiano*

Los compuestos antimicrobianos (terpenos, antibióticos fúngicos...) o inhibidores de enzimas (p.ej. algunos fenoles) producidos por muchas plantas y microorganismos pueden desempeñar una función muy eficaz en el control de las tasas de reciclado de C en el suelo (Davies, 1971; Basaraba y Starkey, 1966; Lynch, 1976). De esta forma, la acumulación de horizontes humíferos en muchos suelos forestales bajo vegetación de pinos o ericáceas incluso en climas templados es frecuentemente atribuida a compuestos fenólicos específicos (Wang *et al.*, 1967) y diterpenos producidos por la vegetación (Almendros *et al.*, 1996b). Es también frecuente que la biomasa (maderas, hojas) de varias especies mediterráneas contengan aceites esenciales específicos con una función originalmente alelopática o protectora frente a la desecación de la planta, que continúan ejerciendo su efecto en el suelo, induciendo así una preservación no selectiva de muchos constituyentes macromoleculares de la materia orgánica.

## LOS PROCESOS DE FORMACIÓN DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS

Asumiendo que las sustancias húmicas (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas) constituyen las fracciones orgánicas del suelo más resistentes a la degradación, el estudio de los procesos de humificación debería ser considerado de especial interés, tanto con respecto a la calidad de los suelos, como en relación con los mecanismos de secuestro de C. Entre los procesos que contribuyen a la retención de la materia orgánica en el suelo, se ha atribuido una especial relevancia a diversos mecanismos de humificación en sentido estricto, indicados en la sección siguiente:

### **Mecanismos de estabilización mediante alteraciones de material macromolecular persistente (*fracciones orgánicas heredadas*) que no requieren degradación previa del material de partida**

#### *Alteración estructural de biomacromoléculas*

La acumulación de fracciones alteradas particuladas (p.ej., transformaciones diagenéticas de macromoléculas), conduce a la formación en el suelo de fracciones como las *huminas heredadas* (Duchaufour *et al.*, 1995). Estas alteraciones son características en tipos de humus de actividad biológica baja y media, y tienen lugar sobre todo a partir de biomacromoléculas vegetales (p.ej., ligninas), que son modificadas mediante desnaturalizaciones progresivas a través de una serie de reacciones relativamente simples (demetoxilación, descarboxilación, fijación de lípidos y de compuestos nitrogenados de probable origen microbiano, etc.) (Goulden y Jenkinson, 1959; Almendros *et al.*, 1996). Dichos procesos tienen lugar a partir de biomacromoléculas resistentes producidas por plantas vasculares y microorganismos (tales como las ligninas) y producen un incremento en la resistencia a la degradación microbiana.



La reorganización estructural inducida por microorganismos (*microbial reworking*) es también una fuente importante de formas de materia orgánica mucho más estable que el correspondiente material de partida. El incremento en la complejidad molecular de las ligninas, anteriormente indicado, suele venir acompañado por la incorporación de compuestos nitrogenados y de estructuras alquílicas en gran parte derivadas de biomasa microbiana. En este punto también se pueden mencionar los procesos de modificación microbiana de varias biomacromoléculas alifáticas imperfectamente conocidas, a las que se suele denominar polímeros lipídicos (p.ej., biopolíesteres, cutanos, suberanos botriococanos, poliditerpenos) y biomacromoléculas recalcitrantes de plantas vasculares recientemente descritas, que pueden ser sustancias “híbridas” con dominios de lípidos y carbohidratos (Nip *et al.*, 1986; van Aarsen *et al.*, 1990). A pesar de que algunas de estas sustancias están constituidas por redes tridimensionales de polihidroxiácidos grasos unidos por enlaces éster (Holloway, 1972; Kolattukudy, 1977), su resistencia frente a la biodegradación es, en general, mucho más elevada de lo que cabría esperar de la naturaleza lábil de los enlaces éster, o de estructuras alifáticas. Un aspecto característico frecuentemente indicado en estos tipos de estructuras alifáticas complejas, condensadas, tridimensionales, tanto biogénicas como transformadas en el suelo, y con gran variabilidad de unidades estructurales, es la presencia de *amidas* y *ésteres no-hidrolizables*. En efecto, las técnicas no destructivas (espectroscopías IR y NMR) indican la existencia de estructuras (p.ej., azúcares, ácidos grasos) que, *a priori*, podrían ser consideradas fáciles de liberar mediante métodos químicos tradicionales por vía húmeda; sin embargo, en el residuo de hidrólisis se siguen observando estructuras y tipos de enlace semejantes. Se ha postulado que esta estabilidad podría reflejar la concurrencia de impedimentos estéricos en

matrices orgánicas, encapsulación molecular, procesos de solución sólida, etc. (Almendros *et al.*, 1991c).

La importancia de los precursores alifáticos de los procesos de formación de las sustancias húmicas (Hatcher *et al.*, 1981) tiende a considerarse de gran trascendencia actualmente, incluso en suelos terrestres, mientras los estudios clásicos señalaban su importancia sólo en el caso de los suelos hidromórficos, donde, concurren condiciones especialmente favorables para la preservación selectiva de estructuras alifáticas (fundamentalmente proteínas y carbohidratos). De acuerdo con esto, el texto de Stevenson (1982) hace frecuentes alusiones al hecho de que la resistencia de la lignina al ataque microbiano ha sido excesivamente valorado en la literatura clásica (fundamentalmente influida por los estudios pioneros de Waksman, 1936, basados en gran parte en suelos turbosos) en tanto que estudios posteriores han demostrado que la degradación enzimática de la lignina puede tener lugar con una eficiencia similar a la de los otros constituyentes de las hojas (Almendros *et al.*, 2000a). En consecuencia, la humificación no debería ser considerada exclusivamente como una concentración selectiva de ninguna fracción específica de la biomasa vegetal.

**Procesos de neoformación basados en la condensación de precursores de bajo peso molecular, o de estructuras no existentes en el material de partida, o derivados de la degradación de biomacromoléculas.**

#### *Biosíntesis de sustancias de tipo húmico*

Es sabido que la *síntesis microbiana* desempeña una función primordial en la acumulación en el suelo de sustancias de color muy oscuro, resistentes a la biodegradación. La importancia de las denominadas melaninas fúngicas se puso en evidencia en los primeros estudios de Martin y Haider (1971), y ha sido

objeto de numerosas revisiones (p.ej. Bell y Wheeler, 1996). En general, las melaninas fúngicas confieren a los hongos una serie de ventajas adaptativas tales como resistencia frente a la desecación, irradiación solar, ataque enzimático, etc. (Haider y Martin, 1967). Las melaninas fúngicas tienden a concentrarse en el suelo mientras otros constituyentes del hongo (quitina, proteína...) son biodegradados más rápidamente. En algunos hongos se forman melaninas por medio de rutas metabólicas muy características, a partir de derivados del binaftilo. En el caso de estos hongos (p. ej., algunas especies de *Cenococcum*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Ulocladium*...) (Kumada y Hurst, 1967; Almendros *et al.*, 1985; Valmaseda *et al.*, 1989) se puede identificar un cromóforo típico (de coloración verde en solución alcalina) que es sintetizado durante el metabolismo secundario. Por esta razón, estas melaninas específicas, que son relativamente frecuente en distintos tipos de suelos, pueden ser reconocidas fácilmente por espectroscopía en el rango visible, debido a la presencia de unidades repetitivas de 4,9-dihidroxiperilen-3,10-quinona (Kumada y Sato, 1967). Este pigmento se manifiesta en forma de picos espectroscópicos bien definidos (455, 530, 570, 620 nm) en las derivadas de los correspondientes espectros. Además del interés de estas melaninas fúngicas, que constituyen descriptores subrogados de la diferente intensidad con la que algunas especies fúngicas han contribuido a la acumulación de formas estables de materia orgánica en el suelo, también se ha presentado evidencia de su función activa sobre las propiedades del suelo. Estas sustancias tienden a formar complejos organominerales más estables, y presentan mayor resistencia frente a la biodegradación que otras sustancias de tipo húmico formadas por procedimientos alternativos (Almendros y Dorado, 1985).

#### *Procesos bioquímicos extracelulares*

Gran variedad de compuestos orgánicos reactivos producidos por las plantas o los

microorganismos permanece en la solución del suelo durante un corto tiempo, hasta que son objeto de biodegradación o experimentan condensaciones en estructuras macromoleculares. Estos últimos procesos pueden tener lugar, por ejemplo, mediante condensaciones enzimáticas de productos provenientes de la degradación de la lignina u otras biomacromoléculas. Los *procesos de empardecimiento enzimático* han sido estudiados principalmente en el campo de las tecnologías de alimentos, y probablemente son reacciones similares a las que tienen lugar en el suelo, donde las arcillas y los óxidos coloidales pueden catalizar la condensación de estos productos. Por otra parte, la *autólisis celular* (que implica la combinación del contenido de los lisosomas con el de las vacuolas durante el metabolismo secundario, previo a la muerte celular) viene acompañada por una serie de reacciones incontroladas que conducen a la formación de material macromolecular con alto contenido en radicales libres (Andreux, 1969; Schnitzer y Khan, 1972). En otros casos, la liberación continua de *lixiviados foliares* (alta producción en algunos bosques tropicales), o *exudados radiculares*, puede representar una fuente importante de compuestos reactivos cuya condensación se favorece por las enzimas del suelo (Suflita y Bollag, 1981).

#### *Síntesis abiótica de sustancias de tipo húmico a partir de precursores aromáticos o alifáticos*

Los procesos de humificación en medios axénicos han sido estudiados fundamentalmente mediante la formación de sustancias modelo. Se han realizado una serie de sencillos experimentos de laboratorio, que indican la posibilidad de que el envejecimiento espontáneo de mezclas concentradas de compuestos reactivos tales

como fenoles o aminoácidos, conduce a la formación de productos de condensación de color marrón muy oscuro, cuyos tamaños moleculares se incrementan espontáneamente por incorporación continua de nuevas unidades solubles; la formación de sustancias de tipo *catecol-glicina* ocurre espontáneamente en pocos días en la oscuridad, y a temperatura ambiente (Andreux *et al.*, 1977). Por otra parte, una serie de compuestos *alifáticos hidrosolubles de cadena corta* (fundamentalmente de tipo insaturado) también puede condensarse en resinas, o en sustancias con considerable semejanza estructural con los ácidos fúlvicos. Ello ha sido descrito en sustancias modelo del tipo del ácido polimaleico (Spiteller y Schnitzer, 1983; Martin *et al.*, 1984). A medida que se incrementa la complejidad molecular de estos productos de condensación, aumenta también su hidrofobicidad y, consecuentemente, una serie de compuestos de cadena larga, tales como ácidos grasos, pueden ser efectivamente retenidos en redes macromoleculares microporosas, o quedar asociados a las superficies por medio de interacciones hidrofóbicas. Estos mecanismos podrían representar una vía alternativa de formación del dominio alquílico de las sustancias húmicas (Wershaw *et al.*, 1977).

#### *Síntesis de productos de Maillard*

La condensación de aminoácidos y carbohidratos ha sido tradicionalmente estudiada en relación con las transformaciones que tienen lugar durante el cocinado de alimentos (Ellis, 1959; Rubinzstain *et al.*, 1984). Estos productos (Maillard, 1916) se originan a partir de una serie de reacciones sucesivas que tienen lugar a temperaturas relativamente elevadas (p.ej. >100 °C). Sin embargo, se ha reseñado que pueden darse procesos similares, a lo largo de los años, en suelos donde la materia orgánica se encuentra preservada de la biodegradación rápida, debido a las bajas temperaturas, el

encharcamiento, la oligotrofia o la presencia de productos antisépticos. En general, se suele hacer referencia a las reacciones de Maillard para justificar la formación de sustancias húmicas acuáticas en suelos hidromórficos o en distintas formas de materia orgánica disuelta (Benzing-Purdie y Rimpmeester, 1983).

Existen varios factores comunes entre los productos de Maillard y los formados abióticamente a partir de la deshidratación de carbohidratos en medios carentes de nitrógeno (pseudomelanoidinas). Aunque la incorporación de compuestos nitrogenados en el medio acelera la velocidad de reacción y disminuye la temperatura requerida para la condensación, también es posible que los azúcares sencillos se transformen en gran variedad de compuestos reactivos de tipo anhidrozúcar, que incluyen desde las levoglucosenononas a los furanos e incluso a compuestos bencénicos (Popoff y Theander, 1976). Estos procesos son similares a las reacciones de caramelización o torrefacción de materiales que contienen carbohidratos (Ikan *et al.*, 1986; Almendros *et al.*, 1989b) u otras moléculas con alto contenido en oxígeno (Hodge, 1953) y pueden tener lugar tanto en solución como en estado sólido (Feather y Harris, 1973; Almendros *et al.*, 1997). Se ha señalado que los escenarios ambientales donde estos mecanismos de humificación (exclusivamente basados en carbohidratos, pero favorecidos por catalizadores minerales y por otros compuestos reactivos presentes en el suelo) podrían llevarse a cabo con mayor intensidad serían las turberas (donde predominarían las reacciones de deshidratación de carbohidratos catalizadas en medio ácido), o bien en suelos afectados por altas temperaturas generadas durante incendios forestales o quemas controladas (Kumada, 1983; Shindo *et al.*, 1986). En situaciones extremas, como es el caso de los suelos afectados por el fuego, estos procesos desembocan en la formación de una serie de partículas orgánicas en sucesivas fases de

carbonización y finalmente en el denominado "black carbon" (Haumaier y Zech, 1995).

Existe actualmente cierta controversia sobre la trascendencia de estas formas particuladas de C en las propiedades de los suelos y en el secuestro de C. Por ejemplo, se ha postulado que el *black carbon* es un material recalcitrante, que produciría efectos acumulativos en el suelo, como consecuencia de fuegos en el pasado (p.ej., en suelos afectados por quemas periódicas de rastrojera, o fuegos controlados en ecosistemas forestales). Estos suelos podrían contener considerables cantidades de C secuestrado con mucho mayor tiempo de residencia media que las sustancias húmicas formadas por procesos que no impliquen el impacto del fuego. Sin embargo, también se han presentado evidencias sobre la una eficiente biodegradación de estas formas de C en el caso de suelos tropicales (Poirier *et al.*, 2002). En general, muchos de los problemas que plantea la evaluación realista de la tasa de acumulación de *black carbon* en el suelo, deriva del hecho de que la concentración de estas formas de C es muy difícil de determinar (p.ej., no son muy fiables las determinaciones por medio de oxidación química por vía húmeda (Skjemsadt *et al.*, 1999). Otra dificultad es la carencia de indicadores fiables de la presencia de estos materiales en el suelo. Por ejemplo, la formación de ácidos bencenocarboxílicos tras degradación oxidativa en el laboratorio de la materia orgánica, se ha sugerido como un descriptor válido del impacto del fuego sobre ésta (Glaser *et al.*, 1998). En efecto, la intensidad del calentamiento está relacionada con los rendimientos de estos ácidos, si bien también pueden formarse por degradación oxidativa de ligninas vegetales no calentadas, y sus rendimientos dependen de la temperatura de la degradación oxidativa en el laboratorio (Almendros *et al.*, 1989a). En cualquier caso, parece bien establecido que el fuego incrementa la estabilidad del C orgánico del suelo respecto a posteriores degradaciones

térmicas, químicas y biológicas (Almendros *et al.*, 1990). Experimentos de incubación en condiciones de laboratorio muestran tasas reducidas de mineralización (CO<sub>2</sub> desprendido por unidad de C en el suelo) tras calentamiento en condiciones controladas. Sin embargo, no ha podido describirse un descriptor único característico para reconocer el impacto del fuego en la composición de la materia orgánica.

La estabilización de la materia orgánica inducida por efecto del fuego viene acompañada por decarboxilación, demetoxilación, disminución de las propiedades coloidales del suelo e incremento en la aromaticidad (no sólo debido a la degradación selectiva de los constituyentes alifáticos de las sustancias húmicas, sino también a la condensación térmica de estructuras neoformadas cíclicas y policíclicas (Almendros *et al.*, 2003). Un aspecto notable de los suelos afectados por el fuego es la acumulación de formas heterocíclicas de N, que se encontraban en escasas proporciones en los suelos no afectados por incendios (Almendros *et al.*, 1991a). Dichas transformaciones térmicas son simultáneas a variaciones cuantitativas en el contenido de diferentes formas de C húmico en el suelo (transformación de fracciones solubles y ácidos fúlvicos en sustancias del tipo de los ácidos húmicos, posterior transformación de éstos en huminas, y evolución de estas últimas hacia *black carbon* (Almendros *et al.*, 1990). Por último, también se ha indicado que el fuego puede producir repelencia al agua en suelos forestales lo que, a su vez, puede ejercer una importante función indirecta en la eficiencia de procesos físicos y microbiológicos en el sistema suelo (DeBano *et al.*, 1970; Giovannini *et al.*, 1983; Savage *et al.*, 1972).

#### *Condensaciones abióticas de compuestos alquílicos de cadena larga*

En los últimos años, se ha sugerido la posibilidad de condensaciones abióticas de

lípidos insaturados en materiales macromoleculares (no solo en materia orgánica disuelta, como es el caso de los ácidos húmicos marinos (Harvey *et al.*, 1983), sino también en suelos terrestres. El concepto de que las moléculas alquílicas serían “constituyentes periféricos” de las macromoléculas húmicas, y que éstas poseerían, en consecuencia un “núcleo aromático” ha estado tradicionalmente fundamentado por evidencias indirectas, tales como la liberación preferente de compuestos alifáticos tras métodos de degradación suave en el laboratorio (Haworth, 1971). Además de ello, se indica frecuentemente que el hecho de que los ácidos grasos libres y los triglicéridos en formas extraíbles por solventes orgánicos desaparezcan rápidamente del suelo tras experimentos de incubación, sugiere, a primera vista, que dichos compuestos son degradados por acción de los microorganismos. Efectivamente, gran parte del material alquílico es consumido por la microflora del suelo, si bien—sobre todo los lípidos insaturados—puede experimentar rápidas reacciones de condensación, para dar lugar a redes polialquílicas a través de puentes intramoleculares en posiciones intermedias de la cadena, con posterior formación de

estructuras de tipo ciclohexano e incluso anillos aromáticos (Harvey y Boran, 1985). Se ha considerado que tales reacciones de foto-oxidación son los mecanismos más probables de humificación de la materia orgánica en el mar abierto, teniendo en cuenta que la vegetación planctónica carece prácticamente de lignina (Huc *et al.*, 1974). Sin embargo, el efecto de los óxidos, arcillas y otros catalizadores minerales favorece en gran medida la condensación de los ácidos grasos de cadena insaturada (sobre todo cuando todavía se encuentran formando triglicéridos), de tal forma que la disminución en el rendimiento de ácidos grasos libres de los suelos incubados corresponde también a su rápida fijación o condensación en formas más estables de C, que ya no serían extraíbles por los solventes orgánicos (Almendros *et al.*, 1996). Considerando que estos ácidos alifáticos podrían condensarse también junto con sustancias húmicas preexistentes, tras una previa asociación superficial mediante interacciones hidrófobas, la contribución de precursores no aromáticos en la formación de sustancias húmicas debería tenerse en cuenta en varios tipos de suelos terrestres desarrollados bajo distintas condiciones bioclimáticas.

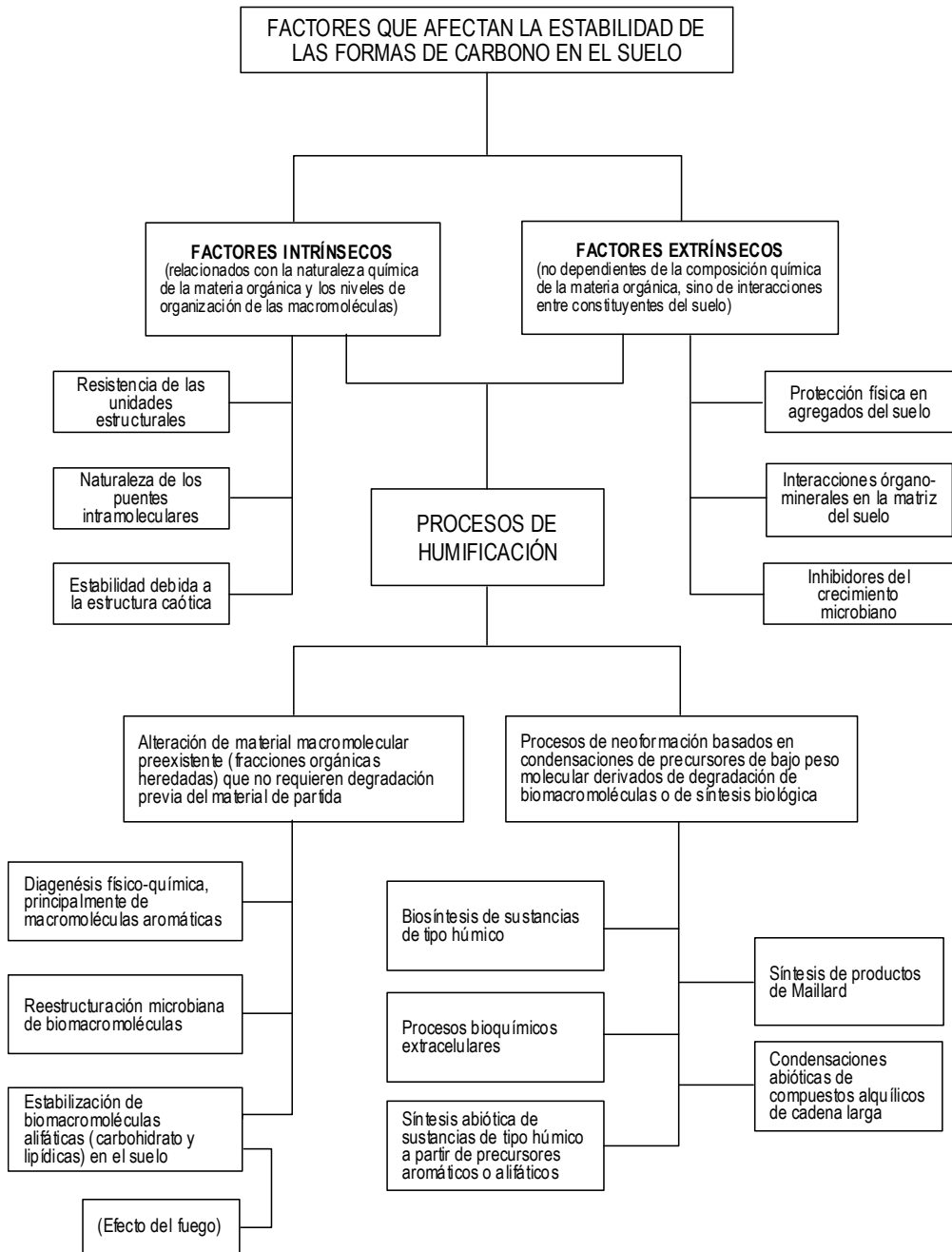


FIGURA 1: Posibles procesos edáficos que intervienen en el secuestro de C

## REFERENCIAS

- Almendros G. (1995). Sorptive interactions of pesticides in soils treated with modified humic acids. *Eur. J. Soil Sci.* 46, 287–301.
- Almendros G., Dorado E. (1985). Estudio de ácidos húmicos de tipo P. Distribución de los pigmentos verdes en las diferentes fracciones húmicas del suelo. *An. Edafol. Agrobiol.* XLIII (3–4), 547–559.
- Almendros G., Martínez A.T., Dorado E. (1985). Production of brown, green humic-like substances by *Ulocladium atrum*. *Soil Biol. Biochem.* 17, 257–259.
- Almendros G., González-Vila F.J. (1987). Degradative studies on a soil humin fraction. Sequential degradation of inherited humin. *Soil Biol. Biochem.* 19, 513–520.
- Almendros G., Martín F.J., González-Vila F.J. (1988). Effects of fire on humic and lipid fractions in a Dystric Xerochrept in Spain. *Geoderma* 42, 115–127.
- Almendros G., González-Vila F.J., Martín F. (1989a). Room temperature alkaline permanganate oxidation of representative humic acids. *Soil Biol. Biochem.* 21, 481–486.
- Almendros G., Sanz J. (1989b). Compounds released from humic acids upon  $\text{BF}_3\text{-MeOH}$  transesterification. *Sci. Total Environ.* 81/82, 51–60.
- Almendros G., Sanz J., Sobrados I. (1989c). Characterization of synthetic carbohydrate-derived humic-like polymers. *Sci. Total Environ.* 81/82, 91–98.
- Almendros G., González-Vila F.J., Martín F. (1990). Fire-induced transformation of soil organic matter from an oak forest. An experimental approach to the effects of fire on humic substances. *Soil Sci.* 149, 158–168.
- Almendros G., Fründ R., González-Vila F.J., Haider K.M., Knicker H, Lüdemann H.-D. (1991a). Analysis of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  CPMAS NMR-spectra of soil organic matter and composts. *FEBS Lett.* 282, 119–121.
- Almendros G., Sanz J. (1991b). A structural study on the soil humin fraction.- Boron trifluoride-methanol transesterification of soil humin preparations. *Soil Biol. Biochem.* 23, 1147–1154.
- Almendros G., Sanz J., González-Vila F.J., Martín F. (1991c). Evidence for a polyalkyl nature of soil humin. *Naturwissenschaften* 78, 359–362.
- Almendros G., Sanz J. (1992). A structural study of alkyl polymers in soil after perborate degradation of humin. *Geoderma* 53, 79–95.
- Almendros G., Guadalix M.E., González-Vila F.J., Martín F. (1996a). Preservation of aliphatic macromolecules in soil humins. *Org. Geochem.* 24 (6/7), 651–659.
- Almendros G., Sanz J., Velasco F. (1996b). Signature of lipid assemblages in soils under continental Mediterranean forests. *Eur. J. Soil Sci.* 47, 183–196.
- Almendros G., Dorado J., González-Vila F.J., Martín F. (1997). Pyrolysis of carbohydrate-derived macromolecules: its potential in monitoring the carbohydrate signature of geopolymers. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 40–41, 599–610.
- Almendros G., Guadalix M.E., González-Vila F.J., Martín F. (1998). Distribution of structural units in humic substances as revealed by multi-step selective degradations and  $^{13}\text{C}$ -NMR of successive residues. *Soil Biol. Biochem.* 30, 755–765.
- Almendros G., Dorado J. (1999). Molecular characteristics related to the biodegradability of humic acid preparations. *Eur. J. Soil Sci.* 50, 227–236.
- Almendros G., Dorado J., González-Vila F.J., Blanco M.J., Lankes U. (2000a).  $^{13}\text{C}$  NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest and shrub biomass. *Soil Biol. Biochem.* 32, 793–804.

- Almendros G., Giampaolo S., Pardo M.T. (2000b). Laboratory appraisal of carbon sequestration and nutrient availability after different organic matter inputs in virgin and cultivated Zimbabwean soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 32, 877–894.
- Almendros G., Knicker H., González-Vila F.J. (2003). Rearrangement of carbon and nitrogen forms in peat after progressive thermal heating as determined by solid-state  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$  spectroscopies. *Org. Geochem.* (en prensa).
- Andreux F. (1969). Contribution à l'étude des processus de melanification des autolysats végétaux (*Juglans regia*). Thèse spécial, Nancy.
- Andreux F., Golebiowska D., Chone T., Jacquin F., Metche M. (1977). Caractérisation et transformation en milieu mull d'un modèle humique issu de l'autoxydation du système catechol-glycine et marqué sélectivement au carbone-14. 5<sup>th</sup> Symposium IAEA "Soil Organic Matter Studies", II, 43. Vienna.
- Basaraba J., Starkey R.L. (1966). Effect of plant tannins on decomposition of organic substances. *Soil Sci.* 101, 17–23.
- Batjes N.H. (1996). Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *European J. Soil Sci.* 47, 151–163.
- Batjes N.H., Sombroek W.G. (1997). Possibilities for carbon sequestration in tropical and subtropical soils. *Global Change Biol.* 3, 161–173.
- Batjes N.H. (1998). Mitigation of atmospheric  $\text{CO}_2$  concentrations by increased carbon sequestration in the soil. *Biol. Fertil. Soils.* 27, 230–235.
- Bell A.A., Wheeler M.H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24, 411–451.
- Benzing-Purdie L., Ripmeester J.A. (1983). Melanoidins and soil organic matter: Evidence of strong similarities revealed by  $^{13}\text{C}$ CP-MAS NMR. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 56–61.
- Buringh P. (1984). Organic carbon in soils of the world. En: *The Role of Terrestrial Vegetation in the Global Carbon Cycle. Measurement by Remote Sensing.* Woodwell G.M. Ed., SCOPE 23, 91–109, Wiley, Nueva York.
- Calvo de Anta R.M., Díaz-Fierros F. (1982). Mineralización del carbono y del nitrógeno en suelos forestales de Galicia. *An. Edafol. Agrobiol.* 41, 1–10.
- Davies R.I. (1971). Relation of polyphenols to decomposition of organic matter and to pedogenetic processes. *Soil Sci.* 111, 80–85.
- DeBano L.F., Mann L.D., Hamilton D.A. (1970). Translocation of hydrophobic substances by burning organic litter. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 34, 130–133.
- Deuel H. (1960). Interactions between inorganic and organic soil constituents. *7th Int. Cong. Soil Sci.* 38–53.
- Devevre O.C., Horwath W.R. (2000). Carbon sequestration into soil organic matter under organic-based management. *Proc. 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (IHSS10)* 24–28 July 2000. Toulouse (Francia), 707–711.
- Duchaufour Ph., Jacquin F. (1975): Comparaison des procesus d'humification dans les principaux types d'humus forestiers. *Bull. A.F.E.S.* 1, 29–36.
- Duxbury J.M. (1995). The significance of greenhouse emissions from soils of tropical agroecosystems. En: Lal R., Kimble J., Levine E., Stewart B.A. (Eds.) *Soil Management and Greenhouse Effect*, Lewis Publishers. Boca Ratón FL., 279–292.
- Eglinton G., Logan G.A. (1991). Molecular preservation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 333, 315–328.
- Ellis G.P. (1959). The Maillard reaction. *Adv. Carbohydr. Chem.* 14, 63–134.
- Eswaran H., Van den Berg P., Reich P., Kimble J. (1995). Global soil carbon



- resources. En: Lal R., Kimble J.M., Levine E., Stewart B.A. (Eds), *Soils and Global Change*, CRC/Lewis Publishers, Boca Ratón, Fl., 25–43.
- Falloon P.D., Smith P. (2000). Modelling refractory soil organic matter. *Biol. Fertil. Soils* 30, 388–398.
- Feather M.S., Harris J.F. (1973). Dehydration reactions of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 28, 161–224.
- Fisher M.J., Rao I.M., Lascano C.E., Sanz J.I., Thomas R.J., Vera R.R., Ayarza M.A. (1995). Pasture soils as carbon sink. *Nature* 376, 472–473.
- Ganuja A., Almendros G. (2003). Organic carbon storage in soils of representative ecosystems in the Basque Country (Northern Spain) as related to climate, vegetation type and edaphic variables. *Biol. Fertil. Soils*, 37, 154–162.
- Giovannini G., Luchessi S., Cerevelli S. (1983). Water-repellent substances and aggregate stability in hydrophobic soil. *Soil Sci.* 135, 110–113.
- Glaser B., Haumaier L., Guggenberger G., Zech W. (1998). Black carbon in soils: the use of benzenecarboxylic acids as specific markers. *Org. Geochem.* 29, 811–819.
- Glenn E., Squires V., Olsen M., Frye R. (1993). Potential for carbon sequestration in the drylands. *Water, Air Soil Pollut.* 70, 341–355.
- Golchin A., Oades J.M., Skjemstad J.O., Clarke P. (1994). Soil structure and carbon cycling. *Aust. J. Soil. Res.* 32, 1043–1068.
- González-Vila F.J., Lüdemann H.-D., Martín F. (1983). <sup>13</sup>C-NMR structural features of soil humic acids and their methylated, hydrolyzed and extracted derivatives. *Geoderma* 31, 3–15.
- González-Vila F.J., Almendros G., Martín F. (1987). An evaluation of the differences in the composition of humic acids in soils under oak and pine forests by GC-MS after mild degradation. *Plant Soil*, 103, 83–88.
- Goudriaan J. (1995). Global carbon cycle and carbon sequestration. *NATO ASI, Ser. I*, 33, 3–18.
- Goulden J.D.S., Jenkinson D.S. (1959). Studies on the organic material extracted from soil and compost. II. The infra-red spectra of ligno-proteins isolated from compost. *J. Soil Sci.* 10, 264–270.
- Greenland D.J. (1971). Interactions between humic and fulvic acids and clays. *Soil Sci.* 111, 34–41.
- Haider K., Martin J.P. (1967). Synthesis and transformation of phenolic compounds by *Epicoccum nigrum* in relation to humic acid formation. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 31, 766–772.
- Hall D.O. (1989). Carbon flows in the biosphere: Present and future. *J. Geogr. Soc.* 146, 175–181.
- Hargitai L. (1989). The role of humus status of soils in binding toxic elements and compounds. *Sci. Total Environ.* 81/82, 643–651.
- Harvey G.R., Boran D.A., Chesal L.A., Tokar J.M. (1983). The structure of marine fulvic and humic acids. *Marine Chemistry* 12, 119–132.
- Harvey G.R., Boran D.A. (1985). Geochemistry of humic substances in seawater. En: Aiken R.G., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*, Capítulo 9, 233–247.
- Hatcher P.G., Maciel G.E., Dennis L.W. (1981). Aliphatic structures of humic acids, a clue to their origin. *Org. Geochem.* 3, 43–48.
- Haumaier L., Zech W. (1995). Black carbon—possible source of highly aromatic components of soil humic acids. *Org. Geochem.* 23, 191–196.
- Haworth R.D. (1971). The chemical nature of humic acid. *Soil Sci.* 111, 71–79.

- Hodge J.E. (1953). Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 1, 928–943.
- Holloway P.J. (1972). The composition of suberin from the corks of *Quercus suber* L. and *Betula pendula* Roth. *Chem. Phys. Lipids* 9, 158–170.
- Hontoria C., Rodríguez-Murillo J.C., Saa A., (1999). Relationships between soil organic carbon and site characteristics in Peninsular Spain. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 614–621.
- Huc C., Durand B., Jacquin F. (1974). Caractérisation des acides humiques de sédiments marins récents et comparaison avec leurs homologues terrestres. *Bull. ENSAIA* 16, 1/2 59–75.
- Ikan R., Ioselis P., Rubinsztain Y., Aizenshtat Z., Pugmire R., Anderson L.L., Ishiwatari R. (1986). Carbohydrate origin of humic substances. *Naturwissenschaften* 73, 150–151.
- Khan S.U., Schnitzer M. (1972). The retention of hydrophobic organic compounds by humic acid. *Geochim. Cosmochim. Acta* 36, 745–754.
- Kolattukudy P.E. (1977). Biosynthesis and degradation of lipid polymers. In *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*. Capítulo 15. (Tevini M., Lichtenthaler H.K., Eds.). Springer. Berlin, Heidelberg, Nueva York, 271–292.
- Kumada K. (1983). Carbonaceous materials as a possible source of soil humus. *Soil Sci. Plant Nutr.* 29, 383–386.
- Kumada K., Hurst H.M. (1967). Green humic acid and its possible origin as a fungal metabolite. *Nature* 214, 631–633.
- Kumada K., Sato O. (1967). Studies on the chemical properties of P type humic acid. *Trans. Int. Symp. Humus et Planta* 4, 131–133.
- Ladd J.N., Foster R.C., Skjemstad J.O. (1993). Soil structure: carbon and nitrogen metabolism. *Geoderma* 56, 401–434
- Lynch J.M. (1976). Products of soil microorganisms in relation to plant growth. *Crit. Rev. Microbiol.* Nov., 67–107.
- Maillard M.L.-C. (1916). Synthèse des matières humiques par action des acides aminés sur les sucres réducteurs. *Ann. Chim.* 5, 258–317.
- Martin F., González-Vila F.J., Lüdemann H.-D. (1984). About the similarity between polymaleic acid and water soluble humic fractions. *Z. Naturforschung*, 369, 244–248.
- Martin J.P., Haider K. (1971). Microbial activity in relation to soil humus formation. *Soil Sci.*, 111, 54–63.
- Martín F., Saíz-Jiménez C., González-Vila F.J. (1981). The persulfate oxidation of a soil humic acid. *Soil Sci.* 132, 200–203.
- Martínez A.T., Barrasa J.M., Almendros G., González A.E. (1990). Fungal transformation of lignocellulosics as revealed by chemical and ultrastructural analyses. En: *Advances on Biological Treatments of Ligno-cellulosic Materials* (Coughlan M.P. y Amaral Collaço M.T.) 129–147. Elsevier. Londres.
- Merlet D. (1971). *Mise au Point Technique Concernant l'Extraction et la Caractérisation des Composés Organiques dans les Sols*. Centre de Pédologie Biologique. Doc. No. 15. Nancy, Francia.
- Nip M., Tegelaar E.W., de Leeuw J.W., Schenck P.A. (1986). A new non-saponifiable highly aliphatic and resistant biopolymer in plant cuticles. *Naturwissenschaften* 73, 579–585.
- Oades J.M. (1988). The retention of organic matter in soils. *Biogeochemistry.* 5, 35–70.
- Oades J.M., Vassallo A.M., Waters A.G., Wilson A. (1987). Characterization of organic matter in particle size and density fractions from a Red-brown Earth by solid-state <sup>13</sup>C N.M.R. *Aust. J. Soil Res.* 25, 71–82.
- Oyonarte C., Pérez-Pujalte A., Delgado G., Delgado R., Almendros G. (1994). Factors

- affecting soil organic matter turnover in Mediterranean ecosystems from Sierra de Gador (Spain): an analytical approach. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 25, 1929–1945.
- Poirier N., Derenne S., Balesdent J., Rouzaud J.-N., Mariotti A., Largeau C. (2002). Abundance and composition of the refractory organic fraction of an ancient, tropical soil (Pointe Noire, Congo). *Org. Geochem.*, 38, 383–391.
- Popoff T., Theander O. (1976). Formation of aromatic compounds from carbohydrates. Part III. Reaction of D-glucose and D-fructose in slightly acidic, aqueous solution. *Acta Chem. Scand.* 30, 397–402.
- Post W.M., Enmanuel W.R., Zinke P.J., Stangenberger A.G. (1982). Soil carbon pools and world life zones. *Nature* 289, 156–159.
- Preston C.M., Ripmeester J.A. (1982). Application of solution and solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR to four organic soils, their humic acids, fulvic acids, humins and hydrolysis residues. *Can. J. Spectrosc.* 27, 99–105.
- Rodríguez Murillo, J.C. (2001). Organic carbon content under different types of land use and soil in Peninsular Spain. *Biol. Fertil. Soils* 33, 53–61.
- Rubinsztain Y., Ioselis P., Ikan R., Aizenshtat Z. (1984). Investigations on the structural units of melanoidins. *Org. Geochem.* 6, 791–804.
- Schnitzer M. (1978). Some observations on the chemistry of humic substances. *Agrochimica* 3/4, 216–225.
- Schnitzer M., Khan S.U. (1972). *Humic Substances in the Environment*. Marcel Dekker Inc. Nueva York.
- Savage S.M., Osborn J., Letey J., Heaton C. (1972). Substances contributing to fire-induced water repellency in soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 36, 674–678.
- Schulten H.-R., Schnitzer M. (1990). Aliphatics in soil organic matter in fine-clay fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54, 98–105.
- Shindo H., Matsui Y., Higashi T. (1986). Humus composition of charred plant residues. *Soil Sci. Plant Nutr.* 32, 475–478.
- Skjemstad J.O., Clarke P., Taylor J.A., Oades J.M., McClure S.G. (1996). The chemistry and nature of protected carbon in soil. *Aust. J. Soil Res.* 34, 251–271.
- Skjemstad J.O., Taylor J.A. (1999). Does the Walkley–Black method determine soil charcoal?. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30, 2299–2310.
- Spaccini R., Conte P., Piccolo A., Haberhauer G., Gerzabek M. H. (2000). Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Proc. 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (IHSS10)* 24–28 Julio. Tolouse (Francia) 419–419.
- Spiteller M., Schnitzer M. (1983). A comparison of the structural characteristics of polymaleic acid and a soil fulvic acid. *J. Soil Sci.* 34, 525–537.
- Stevenson F.J. (1982). Biochemistry of the formation of humic substances. En: F.J. Stevenson (Ed.) *Humus Chemistry*. 195–220.
- Suflita J.M., Bollag J.M. (1981). Polymerization of phenolic compounds by a soil-enzyme complex. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 45, 297–302.
- Tinoco P., Almendros G., González-Vila F.J. (2002). Impact of the vegetation on the lignin pyrolytic signature of soil humic acids from Mediterranean soils. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 64, 407–420.
- Valmaseda M., Martínez A.T., Almendros G. (1989). Contribution by pigmented fungi to P-type humic acid formation in two forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 21, 23–28.
- van Aarssen B.G.K., Leeuw J.W., Tegelaar E.W. (1990). Recently discovered aliphatic biopolymers of vascular plants

- and algae and their impact on the environment. *Proc. IV Workshop Chem. Anal. Environ. Hydrocarbons*. Estrasburgo. 21.
- Wang T.S.C., Yang T.-K., Chuang T.-T. (1967). Soil phenolic acids as plant growth inhibitors. *Soil Sci.* 103, 239–246.
- Waksman S.A. (1936). *Humus, Origin, Chemical Composition and Importance in Nature* (Williams and Wilkins, Eds.) Baltimore, USA.
- Wershaw R.L., Pinckney D.J., Booker S.E. (1977). Chemical structure of humic acids– Part 1. A generalized structural model. *J. Research U.S. Geol. Survey* 5, 565–569.
- Wilson M.A. (1981). Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to the study of the structure of soil organic matter. *J. Soil Sci.* 32, 167–186.