

ESTANDARIZACION DEL METODO KONONOVA-BELCHIKOVA PARA LA EXTRACCION, FRACCIONAMIENTO, ANALISIS Y PURIFICACION DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS EN SUELOS ANDISOLES

Fernanda Cabrera¹
 Claudia Guevara¹
 Jesús A. Castillo²
 William Chavarriaga³

RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló en los Laboratorios de Química de la Universidad de Nariño, con muestras de suelo tomadas en dos lotes (L1 y L2) de la granja experimental Botana, los cuales se caracterizan por ser suelos Andisoles que presentan una textura franco arcillosos con historiales muy diferentes desde el punto de vista de manejo, L1 es utilizado bajo un arreglo agroforestal con rotación de cultivos y L2 ha permanecido bajo pastura con árboles dispersos.

Este trabajo consistió en estandarizar el método Kononova-Belchikova para la extracción y fraccionamiento de sustancias húmicas (SH) y además adaptar una metodología para la purificación y análisis de dichas sustancias, para lo cual fue necesario realizar modificaciones a los protocolos originales. Para el análisis de las SH se utilizó la relación E_4/E_6 la cual depende de los tamaños, pesos moleculares y grado de condensación de los ácidos húmicos (AH) y de los ácidos fúlvicos (AF) obtenidos de las diferentes muestras. También se utilizó la relación CAH/CAF la cual se obtiene de dividir el % de C orgánico en los AH entre el % de C de los AF, esta relación permite conocer el grado de humificación de un suelo. El Carbono orgánico se determinó por el método Tiuring.

¹ Químicos, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de Nariño. Pasto. Colombia. quimicacsga@latinmail.com

² Profesor Asistente. Ingeniero Agrónomo M.Sc., Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño. Pasto. Colombia. jacastillo@udenar.edu.co

³ Profesor Asistente. Ingeniero Agrónomo M.Sc., Facultad Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. Colombia. wicham57@hotmail.com

Los resultados obtenidos del análisis de las SH extraídas indicaron que el lote (L1) presenta un mejor proceso de humificación. Además, el análisis de varianza realizado a los diferentes parámetros evaluados mostró que existen diferencias significativas entre los lotes y al cambiar la profundidad de muestreo, demostrando que el método modificado es sensible y confiable.

Palabras Claves: Sustancias Húmicas, Ácidos Húmicos, Ácidos Fúlvicos, Relación E_4/E_6 , método Kononova-Belchikova, carbono orgánico, relación CAH/CAF.

SUMMARY

This project was carried in the chemistry laboratories of the University of Nariño, with soil samples, characterised for being volcanic and presenting a clay-like texture with very different records in terms of handling, taken from lots (L1 and L2) on the Botana Research Farm. L1 is used under an agro-forestry arrangement with crop rotation and L2 has remained under pasture with scattered trees. This project consisted of standardising the Kononova-Belchikova method for the extraction and separation of organic substances as well as adapting a methodology for the purifying and analysis of the aforementioned substances, for which it was necessary to carry out modifications to the original protocols.

For the analysis of the organic material the E_4 / E_6 relation was used in which size, molecular weights and the degree of condensation of the organic acids and the acids of the organic components obtained from the different samples depended. Also the CAH/CAF relation was used. This is obtained from dividing the percentage of organic C in the organic acids into the percentage of C in the acids of the organic components, this relation allows one to know the level of organic gas present in the soil. The Organic Carbon was determined through the use of Tiuring Method.

The results obtained from the analysis of the extracted organic substances indicated that the lot (L1) presented a better process of organic conversion. Also the variance analysis which was carried out at different tested parameters showed the existence of significant differences between the two lots and thus changing the depth of the sampling showed that the modified method was sensitive and reliable.

Key Words: Organic Substances, Organic Acids, Acids of Organic Components, E_4/E_6 Relation, Kononova-Belchikova Method, Organic Carbon, CAH/CAF Relation

INTRODUCCION

La fertilidad de los suelos, esta determinada, entre otros factores, por la materia orgánica (Gómez, 2000), dentro de la cual, las SH constituyen una parte muy importante ya que mejoran las características físicas, químicas y biológicas de un suelo, a la vez que equilibran la solución nutritiva y también influyen en su estructura, régimen hídrico, propiedades de absorción y adsorción, y es una fuente con capacidad de intercambio de cationes (CIC).

Teniendo en cuenta que el Departamento de Nariño es una región por excelencia agrícola, y que las investigaciones de las ciencias agronómicas tienden al mejoramiento de la fertilidad de los suelos, es necesario que el Laboratorio de Análisis de Suelos de la Universidad de Nariño, cuente con un protocolo estandarizado para el fraccionamiento y análisis de las SH.

En este trabajo se estandarizó y adaptó el método Kononova-Belchikova (Kononova 1982, Schntzer y Schult 1993), el cual a pesar de no ser el más sencillo, es uno de los métodos más utilizados, y consiste en la extracción sucesiva de las fracciones orgánicas del suelo, (Garcés, 1998); además, permite analizar dichas fracciones sin alterar sus características físicas y químicas, lo anterior complementado con un proceso de purificación, permite obtener SH libres de contaminantes, las que después se analizan por diferentes métodos químicos.

METODOLOGIA

Este estudio se realizó con muestras de suelo de dos lotes ubicados en la granja experimental Botana de la Universidad de Nariño que se encuentra a una altitud de 2820 msnm, temperatura promedio de 13 grados centígrados, precipitación pluviométrica anual de 870 mm y una humedad relativa del 85% (IDEAM, 2001). Dichos suelos son clasificados como andisoles con una textura franco arcillosa y con una densidad aparente en la superficie de 0,98 Mg.m⁻³ el lote L1 ha sido utilizado para la producción de cultivos como Papa y forraje por varios años, actualmente está bajo un arreglo de franjas protectoras productivas. El lote L2 ha permanecido bajo pradera nativa muy degradada por muchos años. El muestreo se hizo aleatoriamente a profundidades de 5 a 10 y de 10 a 20 cm en los dos lotes, se descarto la sección de 0 a 5 cm por que la materia orgánica no se ha degradado hasta SH, y con el fin de ajustar la metodología tendiente a lograr el objetivo de este estudio, se realizaron tres replicaciones por muestra.

Proceso de Extracción de sustancias húmicas (Kononova 1982; Schnitzer y Schult 1993). Las muestras se secaron a 50 °C y se tamizaron por malla 30 (2 mm). Se pesaron 5 g de muestra y las SH se extrajeron con 100 ml de solución 0.1 N de pirofosfato de sodio e hidróxido de sodio (solución extractante), las muestras se agitaron durante 12 horas y se dejaron en reposo por 24 horas. A continuación, se adicionaron 20 ml de solución saturada de sulfato de sodio y se dejaron reposar por 25 min. El conjunto de suelo y soluciones extractantes se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 20 min. y el residuo del suelo se lavó con 30 ml de solución extractante y 5 ml de solución de sulfato de sodio y se volvió a centrifugar. Este proceso se repitió hasta que el sobrenadante no presentó color. Los centrifugados de cada muestra se unieron y se aforaron a 250 ml con agua destilada, quedando extraídas las SH.

Se tomaron 5 ml de SH extraída se añadió H₂SO₄ 0,1 N hasta alcanzar pH 7. La solución se evaporó a sequedad a una temperatura de 60 °C. Sobre el residuo seco, se preparó la mezcla sulfocrómica, para lo cual se agregaron 5 ml de K₂Cr₂O₇ 0,4 N y 5 ml de H₂SO₄ [c], simultáneamente se prepararon tres blancos. Las muestras y los blancos se introdujeron en una estufa a 125 °C durante 35 min. Se dejó enfriar y se completó el volumen a 100 ml con agua destilada.

La valoración del exceso de K₂Cr₂O₇ se realizó con una solución de sulfato ferroso 1 N en presencia de difenilamina. El cambio del indicador de pardo a verde a brillante, indica el punto final de la titulación.

Para los cálculos se utiliza la siguiente ecuación:

$$\frac{(A - B) \times 0.003 \times F \times 100}{N} = \%C$$

Donde:	A	=	ml de sulfato ferroso gastados en el blanco
	B	=	ml de sulfato ferroso gastados en la muestra
	F	=	Normalidad del titulante
	N	=	Cantidad de suelo en gramos
	%C	=	Carbono orgánico

Separación y purificación de los ácidos Húmicos y Fúlvicos. Los AH se precipitaron acidificando los extractos de las SH con H₂SO₄ [c] hasta un pH de 1,5. Se calentó el conjunto para que los AH se precipiten en forma de grumos, luego se separaron por filtración. En el filtrado quedaron los AF y otras sustancias inespecíficas; los AH se recuperan lavando el filtro con una solución caliente de NaOH 0,05 N.

Los extractos obtenidos se aforan a 100 ml con agua destilada. En estos extractos se analiza el contenido de C orgánico mediante el método Tiuring para lo cual se procede igual que con las SH, tomando 5 ml de cada uno de los extractos obtenidos. Los AH se redisolviéron con NaOH y se reprecipitaron con ácido sulfúrico [c] tres veces para ir liberándolos de metales, cada vez se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 20 min. Después de estar separados, se lavaron con agua destilada y se volvió a centrifugar.

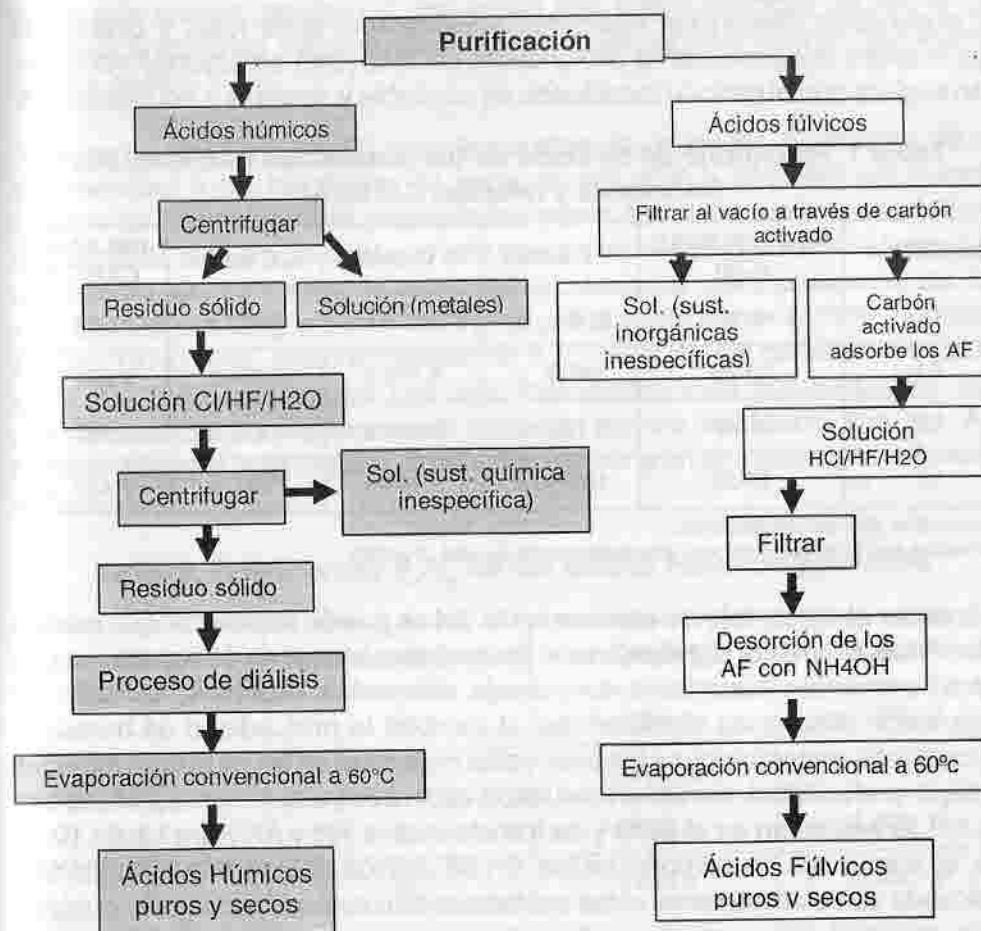
Se preparó una solución de HF-HCl-Agua (1 ml de HCl [c], 1 ml HF [c] y se aforó a 100 ml con agua destilada), se agregaron 30 ml de esta solución sobre los AH. Se dejó interactuar 24 horas y se centrifugó nuevamente. El sólido se lavó con agua dos veces y se centrifugó cada vez para separar los sólidos de la solución. Para retirar los cloruros y fluoruros que no se eliminaron con los procesos de lavado, se realizó una diálisis, utilizando celofán, que es un polímero altamente hidrofílico, por lo que es usado como membrana para diálisis, pues permite la difusión de los iones y solutos de bajo peso molecular pero es impermeable a los solutos de alto peso molecular como los AH (Mulder, 1992) La diálisis terminó cuando no se detectaron cloruros en el solvente.

Después de la diálisis los AH quedaron puros y listos para secarse por liofilización o evaporación convencional. Para efectos de adaptar el método a las condiciones de los laboratorios de la Universidad de Nariño y de la región, se utilizó la evaporación convencional, la cual se efectuó en cápsulas de porcelana previamente secas y taradas, se evaporó la solución de AH a sequedad a una temperatura que no superó los 60 °C, evitando así la formación de lactonas, anhídridos y desprendimiento de CO₂ sustancias orgánicas que pueden afectar las posteriores pruebas de análisis químico (MacCarthy, 2001).

Con los AF que quedaron en solución se realizó una filtración al vacío, para la cual, sobre el papel filtro se agregó una mezcla de carbón activado y agua de tal manera que se formara una capa uniforme sin poros. El carbón activado absorbió los AF y en el filtrado se eliminaron algunos contaminantes. Después, se lavó tres veces con agua destilada para arrastrar otras impurezas y con solución 1:1 de acetona-agua y el papel filtro del embudo se colocó en un recipiente plástico con 100 ml de solución de HF-HCl-Agua y se dejó interactuar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se filtró para eliminar esta solución y se lavó varias veces con agua destilada. Al final se desorbieron los AF del carbón activado, con 150 ml de hidróxido de amonio al 7%. Esta solución se secó por evaporación convencional igual que los AH, quedando los AF puros y secos.

Con los AH puros y secos se prepararon soluciones de 500 ppm en NaOH 0,1 N y con los AF soluciones de 2000 ppm usando el mismo solvente, con las cuales se realizaron lecturas en un Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11, el cual se calibró utilizando como blanco NaOH 0,1 N puro y se leyó a una longitud de onda de 465 nm y 665 nm para cada SH. El coeficiente E_4/E_6 se encontró dividiendo la absorbancia de cada SH a 465 sobre la absorbancia a 665 m. (Figura 1).

Figura 1. Proceso de extracción de sustancias húmicas



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El suelo donde se realizó el estudio es Andisol con textura Franco Arcillosa con historias muy diferentes desde el punto de vista de manejo, L1 es utilizado actualmente bajo un arreglo de franjas protectoras productivas (FPP) con franjas para rotación de cultivos y L2 ha permanecido bajo pastura nativa degradada con árboles dispersos durante muchos años. En la tabla 1 se presentan los resultados del análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan, donde se analiza el efecto combinado por lote y profundidad para cada variable estudiada.

Se observaron diferencias altamente significativas entre lotes y diferencias significativas al considerar la profundidad de muestreo en algunas variables, esto sugiere que el método modificado es confiable y sensible a las diferencias.

Tabla 1. Porcentaje de carbono en las sustancias húmicas, sus fracciones y relación CAH/CAF

MUESTRA	PROFUNDIDAD (CM)	% C en SH	% C en AH	% C en AF	RELACION CAH/CAF
L1	5-10	2.450 d	2.226 b	0.223 c	11.047 a
L1	10-20	3.450 c	3.100 a	0.350 c	9.377 a
L2	5-10	9.150 b	3.340 a	5.810 b	0.577 b
L2	10-20	10.750 a	3.380 a	7.370 a	0.457 b

¹ Promedios de tres replicaciones.

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales (P=0.05)

Al analizar el porcentaje de carbono en la SH se puede establecer que existen diferencias altamente significativas entre los lotes, lo cual es de esperar ya que estos, presentan historiales de manejo diferentes. Además, también se observaron diferencias significativas, al cambiar la profundidad de muestreo en cada lote, encontrándose los promedios más altos en las muestras tomadas a mayor profundidad, siendo un resultado esperado ya que a esta profundidad las SH se acumulan en el perfil y se transforman a AH y AF. Para L1 de 10-20 cm, el porcentaje de carbono en los AH se acerca al obtenido para las SH, indicando que efectivamente estas sustancias han evolucionado tanto, que casi en su totalidad se han transformado en AH, que es lo deseable para un proceso de humificación adecuado.

Por el contrario para L2, este proceso está avanzando de manera muy lenta como se observa en la tabla 1. el porcentaje de carbono obtenido para los AF son cercanos a los obtenidos para las SH. Analizando la calidad de humus a partir de la relación %CAH / %CAF, se observa que para L2 esta relación es inferior a la unidad, lo que sugiere un dominio de los AF, lo cual no es conveniente para la fertilidad del suelo, debido a que estos tienen un bajo peso molecular y pueden desplazar a los iones de las arcillas y hacer que estos se pierdan por lixiviación. El proceso de acumulación de estos ácidos en L2 se debe posiblemente a que el suelo presenta unas condiciones físicas precarias.

Caso contrario sucede con las muestras de L1 las cuales presentan una relación mayor a la unidad, mostrando que existe una mayor cantidad de AH lo que está indicando unas mejores características físicas, químicas y microbianas de este suelo.

De acuerdo con Ruiz (1997), para las sustancias húmicas, la relación de las absorbencias a las longitudes de onda de 465 (E4) y 665 (E6) nm permite conocer de forma indirecta propiedades como: La masa molar de las SH, el contenido de oxígeno, el contenido de grupos funcionales ácidos, el tiempo de residencia en el suelo, la polimerización y la condensación de las macromoléculas. Según diferentes investigaciones (Kononova, 1966; Schnitzer y Khan, 1978; Ruiz, 1997) el coeficiente E_4/E_6 para los AH generalmente varía entre 2 y 6, cuanto menor sea este coeficiente más condensados, más polimerizados, de menor masa molar y menos oxidados son los AH, características que se logran cuando el suelo tiene un proceso de humificación avanzado.

Tabla 2. Coeficientes E_4/E_6 de los ácidos húmicos y fúlvicos

MUESTRA	PROFUNDIDAD (cm)	E_4/E_6 AH	E_4/E_6 AF
L1	5	3.166 c	9.973 a
L1	10	3.583 bc	11.333 a
L2	5	4.820 a	5.500 b
L2	10	4.086 b	5.000 b

¹ Promedios de tres replicaciones.

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales (P=0.05)

Al analizar los datos de la Tabla 2, para E_4/E_6 AH, se observan diferencias significativas en los valores promedios para los dos lotes, L2 presenta diferencias al cambiar la profundidad, esto es lo esperado puesto que en este lote las SH se encuentran aún en proceso de formación y acumulación, encontrándose el promedio más bajo en la muestra de 10 a 20 cm.

Para L1 el valor del coeficiente E_4/E_6 de los AH no presenta diferencias significativas al cambiar la profundidad de muestreo, lo que indica que el proceso de humogénesis en este lote, a una profundidad de 5 a 20 cm es homogéneo.

Con respecto a los resultados obtenidos en el coeficiente E_4/E_6 de los AF, los valores para L1 se encuentran en un rango de 9 a 12, no existiendo diferencias estadísticamente significativas al cambiar la profundidad de muestreo, estos valores al presentar promedios altos indican que los AF, estructuralmente son menos polimerizados, menos condensados, de menor masa molar, más oxidados y con más grupos funcionales ácidos, mostrando que se encuentran en un proceso de evolución más avanzado que los de L2, coincidiendo con los resultados obtenidos para la relación %CAH/%CAF en la que se muestra un proceso de humogénesis bastante avanzado para L1. Estos resultados también corroboran que el proceso de humificación en L2 está aún en proceso evolutivo, ya que el coeficiente E_4/E_6 no alcanza el promedio mínimo establecido para una estructura de AF evolucionada (Kononova, 1982; Schnitzer, 1993).

CONCLUSIONES

El método Kononova-Belchikova que se estandarizó y modificó para la extracción, fraccionamiento, purificación y análisis de las sustancias húmicas, es adecuado para suelos andisoles dentro de los cuales, se clasifican la mayor parte de los suelos del departamento de Nariño, y además, al encontrarse diferencias altamente significativas entre los tratamientos, hace de este, un método confiable y sensible.

El coeficiente E_4/E_6 y la relación %CAH/%CAF son dos parámetros muy útiles y fáciles de calcular, ya que permiten conocer el grado de humificación de un suelo y se calcula a partir de información encontrada durante el fraccionamiento y análisis de las sustancias húmicas.

El laboratorio L1, presenta un proceso de humificación avanzado, lo cual resulta favorable para cualquier cultivo que se establezca, una vez que se corrijan otros

factores que afectan la fertilidad de este suelo. Por el contrario en el laboratorio L2, este proceso está avanzando manera muy lenta, debido probablemente, a que este suelo al estar anegado, crea un ambiente anaerobio para los microorganismos, quienes necesitan del oxígeno, para degradar la materia orgánica y así, liberar los materiales primarios del proceso de humificación.

Por lo tanto, mientras no se corrijan los problemas físicos y químicos de este lote, el proceso de humificación no evolucionara adecuadamente.

BIBLIOGRAFIA

- GARCÉS N. Caracterización de los ácidos húmicos del suelo ferralítico rojo de San Antonio de los Baños. *Cultivos Tropicales* 19(1):9-18. Cuba. 1998.
- GÓMEZ J. La materia orgánica en los agroecosistemas. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 2000.
- INSTITUTO DE HIDROLOGIA, METEOROLOGIA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). Datos meteorológicos. Pasto. 2001.
- KONONOVA M. Soil organic matter. Pergamon press. Oxford. 1996. 200 p.
- KONONOVA M. Materia orgánica del suelo, su naturaleza, propiedades y métodos de investigación. Barcelona. 1982. 220 p.
- MACCARTHY P. The principles of humic substances. *Soil Science*. Vol. 166. No. 11. USA. 2001.
- MULDER M. Basic principles of membrane Technology. Klumer Academic Publishers Dordrecht. 1992. 80 p.
- RUIZ M. Caracterización de las sustancias húmicas presentes en microagregados de suelos de dos toposecuencias. *Revista de Agronomía tropical*. Vol. 47 (4). Pag.381-395. 1997.
- SCHNITZER M., KHAN S. Soil organic matter Elsevier Scientific publishing Co. New York. 1978. 205 p.
- SCHNITZER M. SCHULT H. Organic matter extraction from soil with water a high pressure and temperatures. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55: 102-108. 1993.