



## INTERACCIONES ENTRE EL FÓSFORO Y LAS SUSTANCIAS HÚMICAS: INFLUENCIA EN LA BIODISPONIBILIDAD DEL P

Jose M<sup>a</sup> García-Mina

*CIPAV-R&D Department Timac Agro International (Roullier Group), and Department of  
Chemistry and Soil Chemistry, University of Navarra*

### Resumen

*Varios estudios han informado sobre los efectos beneficiosos de la materia orgánica en la biodisponibilidad del P en diferentes tipos de suelo. Estos efectos se han atribuido a bastantes factores, incluyendo la posible formación de complejos fosfo-metal-húmicos, los cuales podrían proteger el P de la retrodegradación en suelos tanto ácidos como alcalinos-calcáreos. Sin embargo, la evidencia experimental apoyando la existencia de estos complejos en suelos es escasa y basada principalmente en argumentos indirectos.*

*El objetivo de este artículo es describir los diferentes estudios que se han llevado a cabo en nuestro laboratorio para caracterizar la formación y estabilidad de estos complejos, así como su efecto protegiendo el P de la retrodegradación del suelo y su disponibilidad potencial para las plantas. Estos resultados son discutidos junto con otros presentes en la literatura.*

### 1. Introducción

Numerosos estudios han informado sobre la relación cercana entre la biodisponibilidad del fósforo (fosfato, P) en suelos y la concentración de materia orgánica del suelo (MOS) [1]. Otros estudios han mostrado el efecto beneficioso de las enmiendas orgánicas (EO) que contienen concentraciones significativas de sustancias húmicas en el P disponible y en el P captado por la planta en diferentes tipos de suelo [2, 3]. Aunque varios estudios han relacionado este efecto beneficioso a la acción de esas fracciones de ácidos orgánicos con bajo peso molecular derivados de la exudación de las raíces de las plantas y la descomposición de la MOS [3], otros estudios mostraron que las sustancias húmicas también podían jugar un importante papel en este proceso [3].

Además de la posible acción de las diferentes fracciones de MOS en las dinámicas del P a través del incremento de la actividad microbiana del suelo y la actividad de las enzimas del suelo [4], también podrían ser importantes otros mecanismos más directos. Estos incluyen: (i) la competición entre fracciones ácidas específicas de MOS, principalmente aquellas de bajo peso molecular, y el fosfato (P), el cual inhibe la absorción de P del suelo [5]; (ii) la modificación del patrón de precipitación de fosfatos cálcicos, la cual produce formas de sales con una mayor solubilidad en agua como el dihidrato de fosfato dicálcico [6]; (iii) la movilización de P libre de fosfatos precipitados (fosfatos Fe-, Al- o Ca-) como resultado de la formación de complejos catión-húmico complejos [7], y (iv) la movilización del P a través de la posible formación de complejos P-metal-húmicos estables [8].

Muchos autores han propuesto la formación de complejos P-metal-húmicos solubles o insolubles como uno de los mecanismos posibles de acción de sustancias húmicas en las dinámicas del P del suelo [8-12]. En muchos casos, las hipótesis han estado basadas en resultados indirectos relacionados principalmente a la correlación entre la distribución del P

en solución, ciertos metales (Fe o Al) y sustancias húmicas después del fraccionamiento de la solución empleando cromatografía de exclusión de tamaño [11, 13], la fijación de P en complejos metal-húmicos [12, 14, 15], o la variación en el espectro  $^{31}\text{P}$  NMR obtenido en la presencia de sustancias húmicas y complejos metal-húmicos [3, 16]. Sin embargo, los estudios específicos dirigidos a investigar la formación y características fisicoquímicas (estequiometría, estabilidad y solubilidad) de estos complejos P-metal-húmicos son muy recientes [17, 18, 19, 20, 21]. El objetivo de esta revisión es presentar las principales características fisicoquímicas y agronómicas (interacción del suelo, absorción de las raíces de la planta) de estos complejos integrando estos trabajos diferentes recientemente publicados con nueva información no publicada.

## 2. Caracterización físico-química de los complejos P-metal-húmicos

Como ha sido señalado anteriormente el principal problema en lo concerniente al estudio de estos tipos de complejos es disponer de una metodología adecuada para separar el P complejo del P no complejo.

Riggle y von Wandruszka [17] informaron del uso de un electrodo de Co especial, no comercializado y selectivo para evaluar la concentración de P libre en una solución conteniendo diferentes complejos metal-húmicos y bastantes concentraciones de P. Sin embargo, aunque este método puede medir la concentración de P libre y complejo (P total – P libre), no separa ambas fracciones.

Guardado *et al* [18] exploraron la conveniencia del uso de resina de intercambio aniónico estabilizada (bicarbonato) con la capacidad de fijar P libre para medir ambos, el P libre y el complejo, en soluciones aisladas conteniendo este tipo de complejos. Compararon la eficiencia del método de la resina de intercambio aniónico con el de un método más largo de ultrafiltración en un sistema incluyendo humatos de hierro (Fe) y P. Un resumen de los resultados obtenidos se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1.- P complejo total (PTC) en reacciones con Fe-HA a diferente pH, medido usando ultrafiltración (UF) o la interacción con una resina de intercambio aniónico (AR)

pH	$C_T^*$ (mg/l)	$Fe_C^\alpha$ (mM)	$P_{TC}$ (AR)		$P_{TC}$ (UF)		$(P_{TC}/Fe_C)$ (AR)	$(P_{TC}/Fe_C)$ (UF)
			$\bar{x}$ (mM)	$CV^\#$ (%)	$\bar{x}$ (mM)	$CV$ (%)		
4	2279	4.036	0.738	5.6	0.818	4.0	0.183	0.203
6	2295	4.065	0.688	8.8	0.693	7.4	0.169	0.171
8	2220	3.932	0.540	0.9	0.459	1.1	0.137	0.117

\* Carbono Total;  $^\alpha$  Fe Complejado en Fe-HA;  $^\#$  Coeficiente de variación (n=4)

La concordancia entre ambos métodos fue buena mostrando así la conveniencia del método de la resina de intercambio aniónico.

Esta metodología fue usada para obtener las constantes de estabilidad y la capacidad de enlace máxima (MBA) de la interacción del humato P-Fe. Así, se estimó una estabilidad de

complejos P-Fe-HA dependiente del pH usando una constante aparente de estabilidad (K) calculada por el método Scarchard [22] (Figura 1):

$$(PTC/MBA)/ PTF = K - (PTC/MBA) K \text{ or } \theta/ PTF = K - \theta K$$

Siendo PTF el P libre total en equilibrio; PTC el P complejo total; y  $\theta$  los sitios enlazados / Capacidad enlace máxima del metal (MBA) relación (PTC/MBA), donde K se obtuvo de la representación gráfica de  $\theta/ PTF$  frente a  $\theta$ .

MBA se estimó por extrapolación del segmento de la recta correspondiente a enlazar a elevada saturación del ión P en una gráfica de PTC frente a PTC/PTF. En el cálculo de K sólo se consideraron los resultados correspondientes a las tasas de la reacción P: Fe-HA sin la que la precipitación de HA fuera considerada.

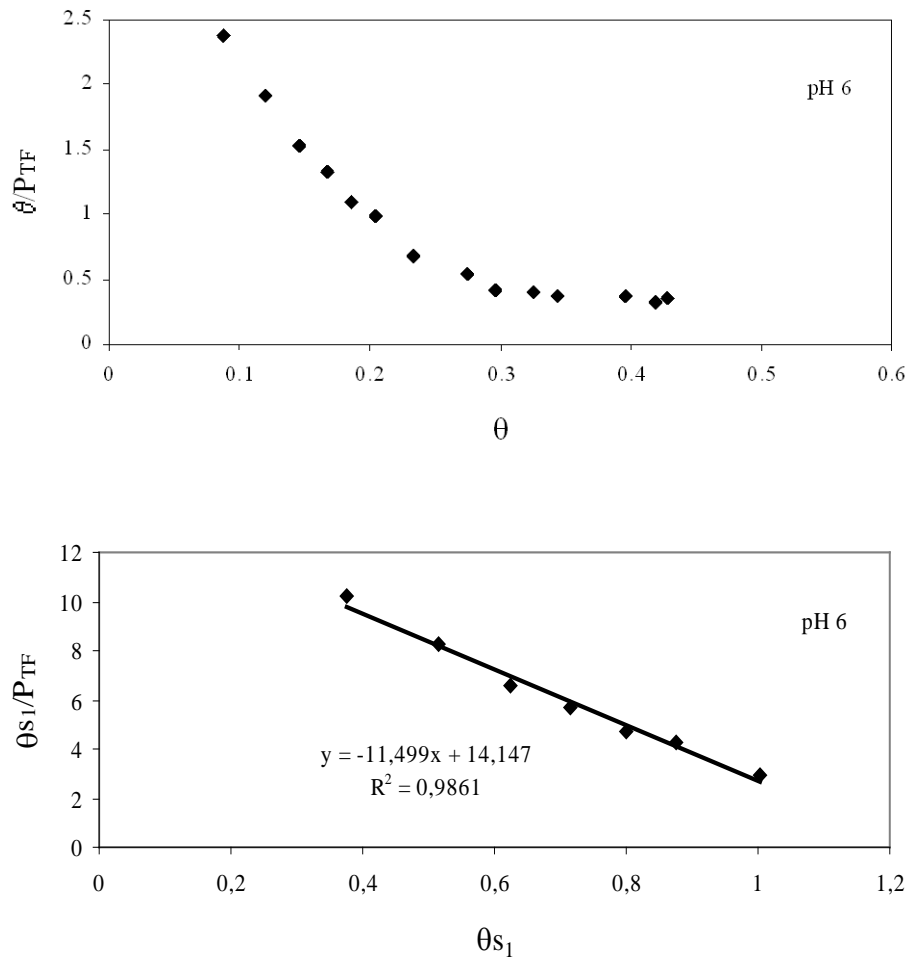


Figura 1.- Aplicación del Scatchard a la interacción de humato-Fe (Fe-HA) y P a pH 6

De este estudio se concluyó que sólo una proporción relativamente pequeña de HA complejando Fe estuvo envuelta en la fijación de P (de un 10% al 20%, asumiendo una estequiometría 1:1 Fe:P). Dos causas principales podrían explicar estos resultados: (a) la formación de agregados estables HA-Fe-HA a través de la formación de puentes de Fe, lo cual reduce la concentración del F3 complejo con los enlaces de coordinación libres para la fijación de P; y (b) la existencia de un grupo restrictivo de zonas de complejación del Fe en HA con la configuración de electrónica necesaria para formar enlaces estables P-Fe-HA.

Con el objetivo de investigar estas dos hipótesis estudiamos los cambios de distribución de tamaños asociados con la complejación del metal HA y la fijación de P en complejos húmico-metálicos [19]. Para este fin, se emplearon dos métodos diferentes, esperando que mostraran diferentes comportamientos de agregación molecular, para obtener complejos P-Metal-HA. La principal diferencia entre estos métodos era el orden de adición de los diferentes compuestos implicados en la reacción.

Asimismo, la relación entre las características fisicoquímicas de los sitios de enlace M-HA y su relación con la fijación de P, fueron investigadas a través de los análisis de la MBA y la estabilidad de los complejos P-M-HA relacionando a dos puentes trivalentes (Fe y Al) y cinco divalentes (Zn, Cu, Mn, Ca y Mg). La selección de metales se basó en dos criterios principales: (a) su habilidad para formar complejos húmicos con diferentes propiedades fisicoquímicas; y (b) su papel potencial en las dinámicas del suelo tanto en suelos ácidos (Fe, Al, Zn, Cu y Mn) como calcáreos (Ca y Mg).

En la Figura 2 presentamos los perfiles de carbono orgánico por ultrafiltración para el sistema húmico (HA), el humato-hierro (Fe-HA) y los complejos P-Fe-HA obtenidos por ambos métodos (M1 y M2), a diferente pH.

Como puede ser observado, en todos los casos la formación del complejo P-Fe-HA implica una reducción significativa de la agregación asociada a la complejación Fe-HA, lo que indica que la complejación de P implica la rotura de enlaces poli-dentados Fe-HA. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre métodos de síntesis, lo que sugiere que la causa de la baja concentración del Fe complejado de HA envuelto en la fijación de P podría estar ligada a los requerimientos electrónicos asociados al punto de enlace del P.

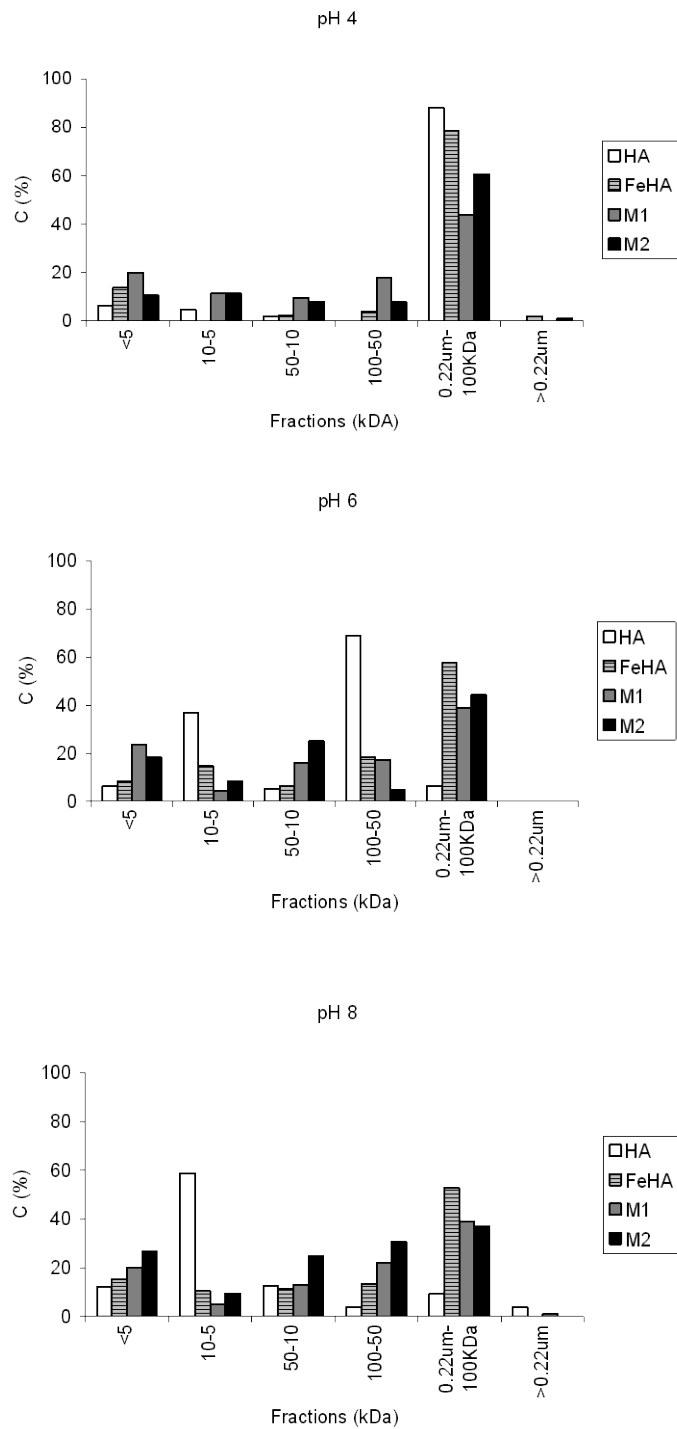


Figura 2.- Perfiles de carbono orgánico como una función de los tamaños para HA, Fe-HA y P-Fe-HA para el método 1 (M1) y 2 (M2), a diferente pH

En lo relacionado con la habilidad de la complejación de P (MBA) de los diferentes complejos metal-HA, se presenta en las Tablas 2 y 3 un resumen de los resultados obtenidos.

Tabla 2.- Máxima habilidad de enlace para fosfato correspondiente a los puntos de enlace de mayor estabilidad (MBAH) en complejos P-M-HA obtenidos usando el método 1 (M1) y el método 2 (M2)

pH	M1 *MBA <sub>H</sub> /[HA]			pH	M2 *MBA <sub>H</sub> /[HA]		
	4	6	8		4	6	8
<b>Fe</b>	0,052	0,046	0,028	<b>Fe</b>	0,060	0,078	0,083
<b>Al</b>	0,044	0,059	0,031	<b>Al</b>	0,053	0,091	0,124
<b>Ca</b>	0,014	0,018	0,023	<b>Ca</b>	0,024	0,021	0,040
<b>Mg</b>	0,016	0,025	0,015	<b>Mg</b>	0,017	0,027	0,034
<b>Cu</b>	0,025	0,033	0,020	<b>Cu</b>	0,031	0,050	0,063
<b>Mn</b>	0,023	0,012	0,033	<b>Mn</b>	0,022	0,042	0,088
<b>Zn</b>	0,026	0,040	0,028	<b>Zn</b>	0,039	0,050	0,043

\* Los valores de MBA están referidos a la cantidad de HA y están expresados como mmol PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> g<sup>-1</sup> de HA.

Tabla 3.- Valores de constante de estabilidad aparente para los puntos de enlace de mayor estabilidad (logKH) para complejos P-M-HA obtenidos usando el método 1 (M1) y el método 2 (M2)

pH	M1 LogK <sub>H</sub>			pH	M2 LogK <sub>H</sub>		
	4	6	8		4	6	8
<b>Fe</b>	3.27	3.98	4.09	<b>Fe</b>	4.13	3.55	4.07
<b>Al</b>	4.03	4.06	3.92	<b>Al</b>	3.33	4.05	4.10
<b>Ca</b>	3.66	3.66	3.48	<b>Ca</b>	3.47	3.65	3.07
<b>Mg</b>	3.51	3.61	3.56	<b>Mg</b>	3.17	3.46	3.43
<b>Cu</b>	3.79	3.65	3.55	<b>Cu</b>	3.63	3.54	3.36
<b>Mn</b>	3.02	4.05	3.94	<b>Mn</b>	3.05	3.05	3.11
<b>Zn</b>	3.78	3.36	3.57	<b>Zn</b>	3.53	3.69	3.69

Los resultados concernientes a los resultados previos confirmados de MBA indican la implicación de una pequeña fracción de metal complejado HA en la fijación de P.

Como para las constantes de estabilidad, en general los cationes trivalentes (Fe y Al) presentaron la estabilidad mayor.

Es también significativo que el orden de magnitud de las constantes de estabilidad aparente para los complejos P-M-HA era muy cercana a la correspondiente a los complejos M-HA obtenidos por espectroscopia fluorescente siguiendo el método Ryan y Weber (datos no mostrados). Este resultado era consistente con los resultados obtenidos por Riggle y von Wandruszka [17], aunque ellos encontraron mayores valores de estabilidad, probablemente debido a unos rangos de concentración de P diferentes usados en los experimentos.

Dado que los complejos M-HA juegan un papel importante en las dinámicas de metal complejado [9, 14-16], este trabajo sugiere que los complejos P-M-HA también podrían afectar las dinámicas del P del suelo.

Para estudiar esas condiciones estructurales y/o electrónicas que podrían gobernar la interacción húmica P:metal, investigamos el enlace de P en complejos húmicos metal específicos usando dos técnicas experimentales complementarias: Espectroscopia infrarroja (FTIR), y Fluorescencia [20]. También completamos el estudio que llevaba a cabo un estudio teórico usando métodos de modelización molecular (principalmente mecánicas

moleculares y métodos químicos cuánticos semi-empíricos). Para comparar la influencia de metales divalentes y trivalentes hemos considerado los complejos húmico-metal-fosfato implicando Al(III), Fe(III) y Zn (II) [20].

Los análisis de la reacción de P metal-HA usando fluorescencia y FTIR confirmaron la interacción de P con sitios enlaces metal-HA. Como ejemplo, el patrón de fluorescencia de la interacción P-Fe-HA a pH 6 se presenta en la Figura 3.

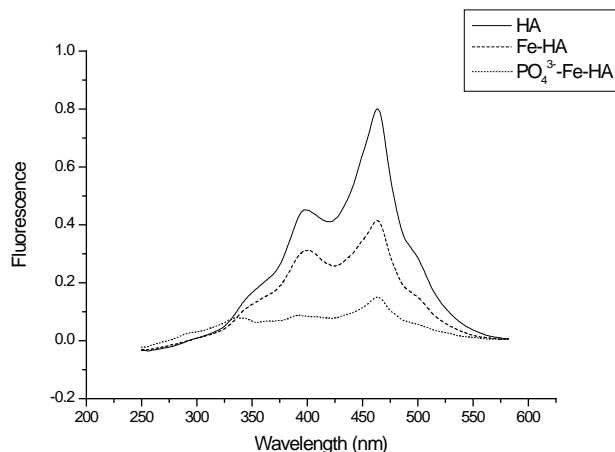


Figura 3.- Espectro de Fluorescencia Sincrónica ( $\Delta\lambda = 18$  nm) para HA, complejos Fe-HA y complejos P—Fe-HA a pH 6

Como se puede observar, la complejación de P está asociada con un efecto de amortiguamiento muy importante de la fluorescencia con respecto a HA y Fe-HA, lo que confirma la interacción de P con HA a través Fe complejo por HA.

Esta interacción también fue confirmada por <sup>31</sup>P NMR en estado líquido para complejos P-Ca-HA (Figura 4).

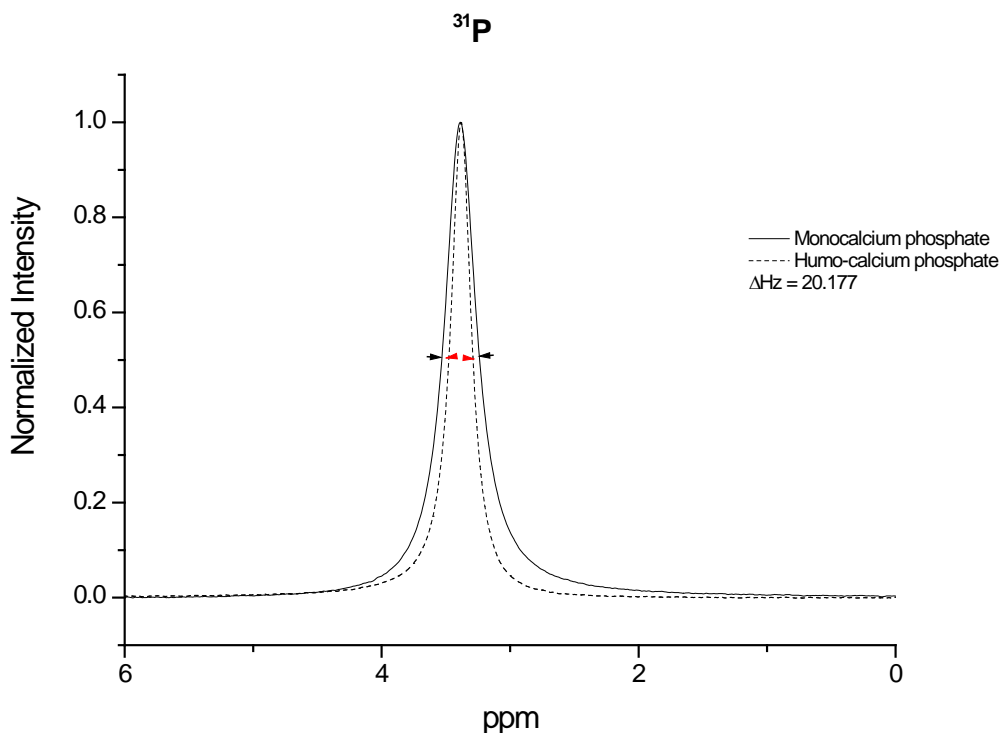


Figura 4.- <sup>31</sup>P NMR para fosfato monocálcico y complejo P-Ca-HA

Como se esperaba la incorporación de Ca a la esfera de coordinación de P y la influencia de HA en los puntos de coordinación ocupados por Ca implicó una reducción del ancho de banda.

Los resultados obtenidos del estudio de modelización de la interacción P-metal-HA fueron muy interesantes. Así, un estudio teórico de la interacción química entre los diferentes elementos del sistema molecular (HA, metales, y fosfato) se llevó a cabo usando tanto métodos de Mecanismos Moleculares como de Mecanismos Cuánticos Semi-empíricos. Las aproximaciones operativas y teóricas se hicieron asumiendo que las interacciones químicas generalmente tienen dos pasos principales sucesivos:

- (i) Paso 1. Primero, se asume que hay una convergencia espacial de las moléculas que interactúan, que es controlada por fuerzas electrostáticas relacionadas con la distribución de la carga eléctrica (la interacción de la convergencia inter-molecular es de naturaleza electrostática). Este primer paso, denominado interacción electrostática, fue estudiado a través de la minimización de energía del sistema molecular usando mecanismos moleculares. Se usaron tanto campos de fuerza MM+ como Ámbar, y la geometría y las cargas atómicas de las moléculas individuales se obtuvieron previamente usando el método de mecanismos cuánticos semi-empírico PM3 [20].
- (ii) Paso 2. Segundo, se asume una interacción química entre regiones específicas de las moléculas que han alcanzado la distancia de enlace como consecuencia de la interacción electrostática (Paso 1). Este paso, que implica la creación de nuevos enlaces químicos, se denomina interacción enlazante. Para estudiar esta interacción enlazante, llevamos a cabo la minimización de energía del sistema químico obtenida de la interacción electrostática, usando el método químico cuántico semi-empírico PM3 [20].

El modelo seleccionado para representar estos puntos de enlace en HA era una mitad de ácido salicílico. Esta selección estaba basada en las siguientes razones principales:

El estudio se realizó en los sistemas implicando Al(III) y Zn(II) ya que estos dos cationes están bien parametrizados en el método semi-empírico PM3. Los metales fueron modelizados como  $Zn^{2+}$  y  $Al^{3+}$  en sus formas pentahidratadas y hexahidratadas respectivamente, ya que son las formas moleculares principales en el intervalo de pH considerado en este estudio.

En el rango de pH del estudio están presentes dos formas ionizadas principales para el fosfato:  $H_2PO_4^-$  y  $HPO_4^{2-}$ . Aquí presentamos los resultados obtenidos usando  $HPO_4^{2-}$  para modelizar el anión fosfato. Los resultados usando  $H_2PO_4^-$  fueron similares cualitativamente a los correspondientes a  $HPO_4^{2-}$ .

El estudio se desarrolló siguiendo dos etapas: primeramente, consideramos la formación del complejo metal-HA; en segundo lugar, consideramos la interacción del fosfato con el complejo metal-HA.

Se asumió que la estabilidad relativa de las interacciones estaba directamente relacionada al valor de la energía de enlace (E) calculada para la interacción molecular. La energía de enlace correspondiente a la interacción molecular ( $\Delta E_r$ ) es calculada por la sustracción de la suma de la energía de enlace de las moléculas individuales implicadas en la interacción de la energía de enlace correspondiente a la nueva molécula formada como resultado de la interacción [20].

Las interacciones calculadas para el Al-SA(-1) (A) y Al-SA(-1)-P están presentadas en la Figura 5.



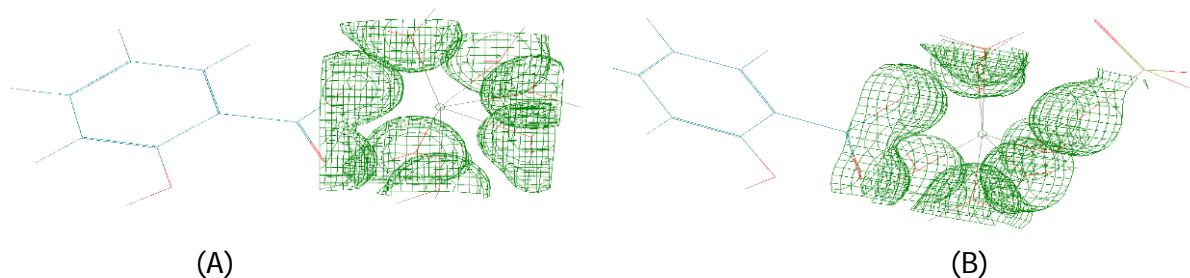


Figura 5.- Interacción de enlaces entre el modelo de enlace salicílico (carga -1) y Al. (Los globos con forma de rejilla representan la distribución de la densidad electrónica para un valor de contorno de  $0.05 \text{ ea}0\text{-}3$ ) (A); y interacción de enlaces entre el complejo Al-SA(-1) y el fosfato. (Los globos con forma de rejilla representan la distribución de la densidad electrónica para un valor de contorno de  $0.05 \text{ ea}0\text{-}3$ ) (B)

Los resultados obtenidos para ambas interacciones Al-SA- P y Zn-SA- P indican que la estabilidad, e incluso la formación, de los complejos fosfato-metal-SA (y posiblemente fosfato-metal-HA) está condicionada por la estabilidad del complejo metal-SA(HA): cuanto mayor sea la estabilidad de los complejos de metal menor será la estabilidad (y la posible formación) de los complejos de fosfato. Este resultado aporta una posible explicación para el hecho de que sólo una fracción relativamente baja del metal complejado interviene en la fijación del fosfato en metal-HA. Sólo la fracción implicada en los complejos HA con baja estabilidad será capaz de formar complejos de fosfato estables. El estudio teórico indica que esta situación podría estar relacionada con la fracción metal complejada con sólo un carboxilato. Así, los resultados obtenidos sugieren que en el caso de los complejos Zn-HA-P, sólo la fracción de Zn complejado por un grupo carboxílico participa en el enlazamiento de fosfato. Este podría ser también el caso para la fracción más estable de Al-HA- P. Este carboxilato podría estar integrado en un punto de enlace más complejo (como la estructura salicílica) o, más probablemente, pudiera corresponder a grupos aislados. Este resultado también proporciona una explicación complementaria para la fracción relativamente baja de metal complejado que está implicada en la formación de complejos estables P-metal-HA, ya que varios estudios indican que la mayoría de los grupos carboxílicos están agrupados probablemente con otros carboxilatos (estructura tipo ftalato) o con fenoles (estructura tipo salicilato). Así la concentración relativa de grupos carboxílicos aislados en HA se espera que sea bastante baja.

Resumiendo, los resultados obtenidos indican que la complejación de P en complejos metal-HA ocurre y que está mediatizada principalmente por la interacción de P con grupos ácidos de HA a través de los puentes de metal. Asimismo, este estudio también indica que sólo una pequeña fracción de sitios de enlace metal-HA están implicados en la fijación de P. Este hecho parece estar relacionado con las características electrónicas de los puntos de enlace. Debido a que la estabilidad y capacidad de fijación de P en los puntos de enlace metal-HA es inversamente proporcional a la estabilidad de los complejos metal-HA: cuando mayor sea la estabilidad de los complejos de metal menor será la estabilidad (y posiblemente la formación) de los complejos de fosfato.

### 3. Consecuencias agronómicas de la formación del complejo P-metal-húmico

#### 3.1. Influencia de la complejación de P en los complejos metal-húmicos en la retrodegradación del P del suelo

Para estudiar la influencia de la complejación metal-HA P en la absorción en suelo y precipitación, investigamos la concentración de P remanente en la solución de suelo

cuando el P añadido al suelo está complejado por diferentes complejos metal-HA. Usamos varios suelos. Los resultados obtenidos para un suelo con alta capacidad fijadora de P están presentados en la Figura 6.

Como se puede notar, los tres complejos P-metal (Fe, Al y Ca)-húmicos disminuyen significativamente la concentración de P fijado al suelo. La eficiencia fue muy alta para P-Fe-HA seguido de P-Al-HA y P-Ca-HA. Este resultado estaba cualitativamente en línea con la estabilidad que estos complejos presentaron en la Tabla 3. Los resultados también mostraron la baja capacidad de HA libre para proteger el P; y probablemente esta capacidad está mediada por la complejación de Fe o Al en el suelo ya que este suelo tenía altas concentraciones de Fe y Al intercambiables. De hecho, en otros suelos con mayor pH y menor concentraciones de Fe y Al, el efecto de HA libre en la fijación de P al suelo no fue significativa (datos no mostrados).

Así, estos resultados confirman que la formación de este tipo de complejo en suelo está posiblemente relacionado en el efecto de protección del P de la materia orgánica soluble.

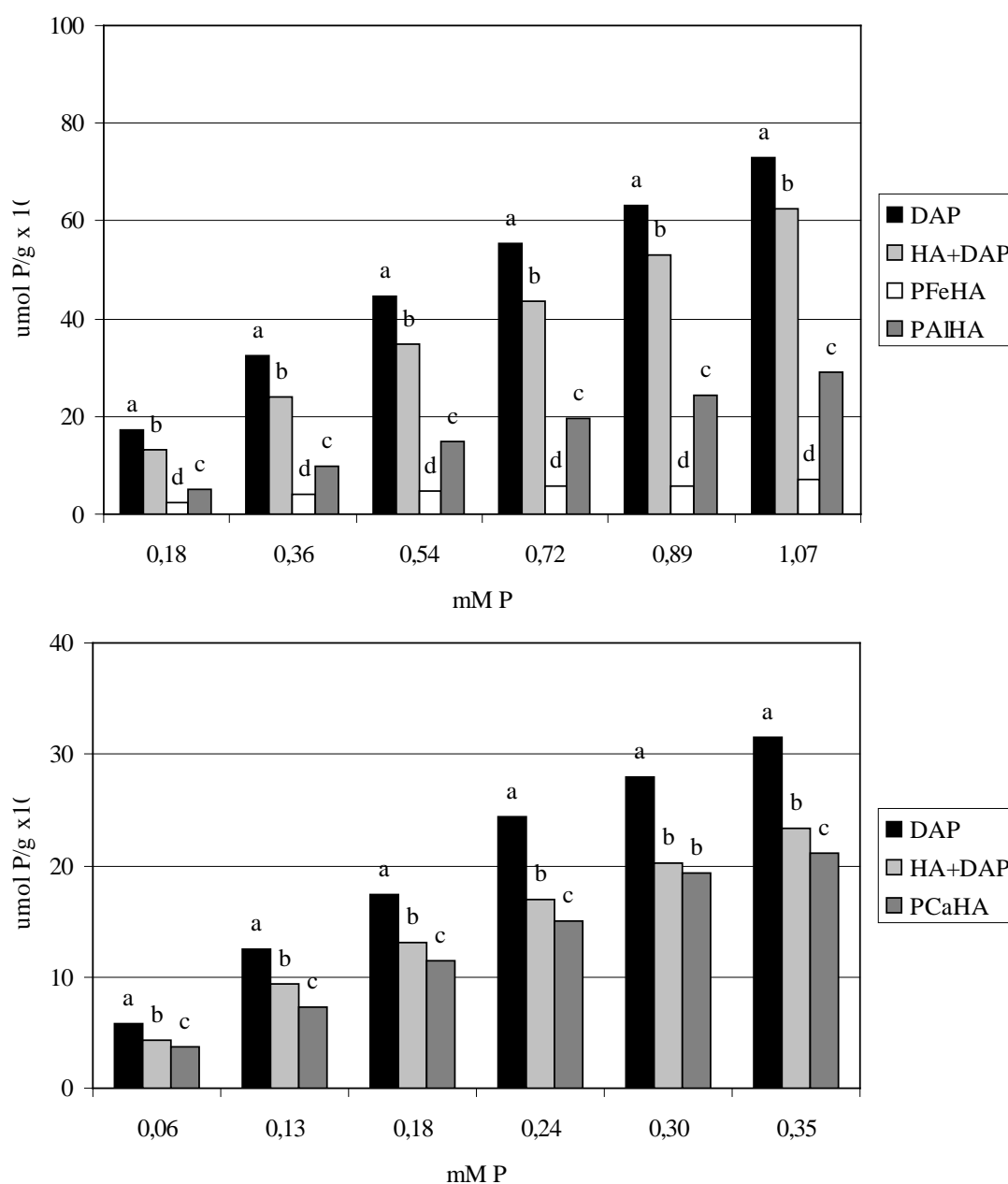


Figura 6.- Estudio de protección para suelo Guardo (pH 4.5)

Estos resultados también se reflejan en la fracción de P potencialmente disponible para la planta recuperado tras la interacción entre un suelo con una elevada capacidad de fijación de P y este tipo de complejo (complejo P-Ca-HA).

En la Figura 7 representamos las fracciones de P extraído con bicarbonato- y HCl- para un fosfato monocalcico y un complejo P-Ca-húmico en un suelo ácido con elevada capacidad de fijación de P.

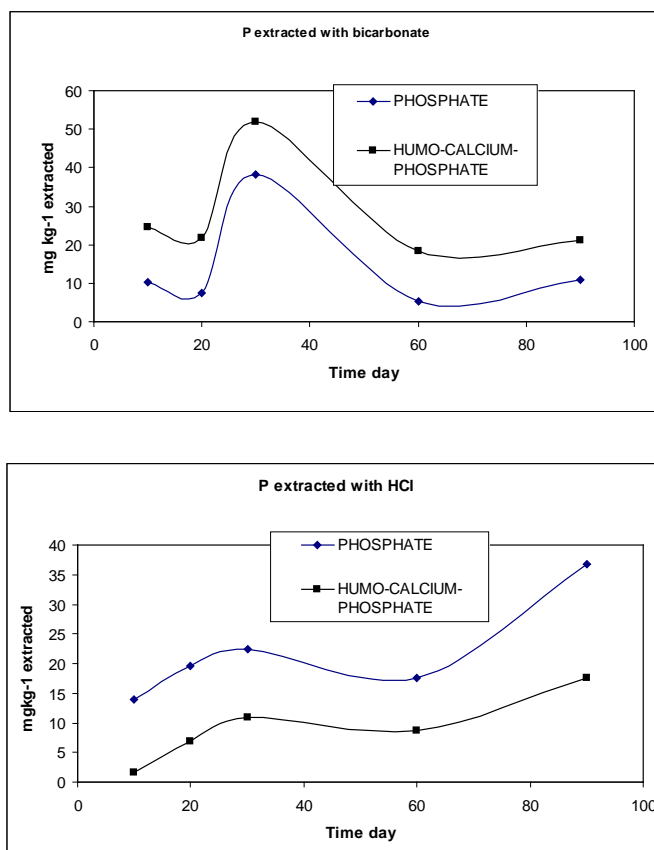


Figura 7.- Fracciones de P extractado con Bicarbonato-y HCl- para un fosfato monocalcico y un complejo P-Ca-húmico en un suelo ácido con alta capacidad de fijación de P

Los resultados muestran que la aplicación de complejos P-Ca-Húmicos estaba asociada con las mayores concentraciones de P potencialmente disponible (fracción extractada con bicarbonato), y menores concentraciones de P retrógrado (fracción extraída con HCl), mostrando así el efecto sugerido por los resultados mencionados anteriormente de las isotermas de absorción de P del suelo.

La cuestión que surge ahora es si las plantas son capaces de asimilar el P fijado en complejos metal-húmicos.

### 3.2. Capacidad de las plantas para captar el P complejo en complejos metal-húmicos.

Para estudiar la capacidad de la planta para asimilar la fracción de P complejo por complejos metal-húmicos, hemos comparado el crecimiento de plantas de trigo que reciben fosfato soluble y P complejo por complejos Fe-húmicos.

Como se puede ver en la Figura 8, no hay diferencias significativas entre los desarrollos del crecimiento de las plantas con estas formas diferentes de P, aunque los diferentes mecanismos de captación podrían estar implicados.

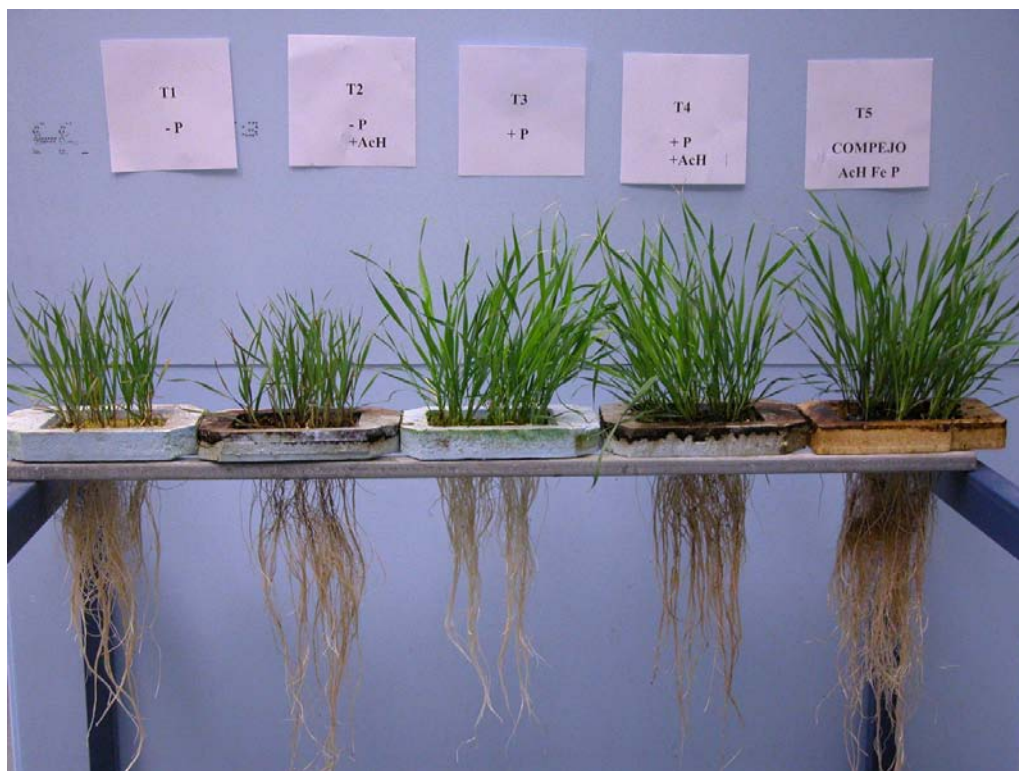


Figura 8.- Crecimiento de plantas de trigo cultivadas con fosfato y fosfato complejo con Fe-humatos

En conclusión, estos estudios muestran que la complejación de P por metal-humatos está asociada con una significativa protección de P de la retrodegradación del suelo que se refleja tanto en las isotermas de absorción de P del suelo como a la fracción del P potencialmente disponible para la planta. Asimismo, estos resultados también muestran que un modelo de planta (trigo) está capacitada para asimilar el P complejo en el complejo Fe-húmico, que fue el complejo con mayor estabilidad.

Todos estos resultados subrayan el papel importante que estos tipos de complejos podrían jugar tanto en la protección del P de la retrodegradación del suelo y el P –biodisponible potencial en suelos.

## Referencias

- [1] Broadbent, F.E. Effects of organic matter on nitrogen and phosphorus supply to plants. In *The role of organic matter in modern agriculture*; Chen, Y., Avnimelech, Y., Eds.; Martinus Nijhoff Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1986; pp 13-27.
- [2] Chen, Y.; De Nobili, M.; Aviad, T. Stimulatory effects of humic substances on plant growth. In *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*; Magdoff, F., Weil, RR., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 2004; pp 103-129.
- [3] Delgado, A.; Madrid, A.; Kassem, S.; Andreu, L.; Del Campillo, MC. (2002) Phosphorus fertilizer recovery from calcareous soils amended with humic and fulvic acids. *Plant Soil* 245, pp 277-286.

- [4] Nanniperi, P.; Sequi, P.; Fusi, P. Humus and enzyme activity. In *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*; Piccolo, A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1996; pp 293-328.
- [5] Stauton, S.; Leprince, F. (1996) Effect of pH and some organic anions on the solubility of soil phosphate: implications for P bioavailability. *Eur. J. Soil Sci.* 47, pp 231-239.
- [6] Grossl, P.R. ; Inskeep, W.P. (1991). Precipitation of dicalcium phosphate dihydrate in the presence of organic acids. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 55, pp 670-675.
- [7] Lobartini, J.C.; Tan, K.H.; Pape, C. (1998). Dissolution of aluminum and iron phosphate by humic acids. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 29, pp 535-544.
- [8] Gerke, J.; Meyer, U.; Römer, W. (1995). Phosphate, Fe and Mn uptake of N<sub>2</sub> fixing red clover and ryegrass from oxisol as affected by P and model humic substances applicatio. 1. Plant parameters and soil solution composition. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 158, pp 261-268.
- [9] Weir, C.C.; Soper, R.J. (1963). Interaction of phosphates with ferric organic complexes. *Can. J. Soil Sci.*, 43, pp 393-399.
- [10] Bedrock, C.N.; Cheshire, M.V.; Shand, C.A. (1997). The involvement of iron and aluminium in the bonding of phosphorus to soil humic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 28, pp 961-971.
- [11] Sinha, M. K. (1971). Organo-metallic phosphates. I. Interaction of phosphorus compounds with humic substances. *Plant Soil*, 35, pp 471-484.
- [12] Levesque, M.; Schnitzer, M. (1967). Organo-metallic interactions in soils: 6. Preparation and properties of fulvic acid-metal phosphates. *Soil Sci.* 103, pp 183-190.
- [13] Jones, R.I.; Shaw, P.J.; De Haan, H. (1993). Effects of dissolved humic substances on the speciation of iron and phosphate at different pH and ionic strength. *Environ. Sci. Technol.*, 27, pp 1052-1059.
- [14] Petrovic, M.; Kastelan-Macan, M. (1996). The uptake of inorganic phosphorus by insoluble metal-humic complexes. *Wat. Sci. Tech.*, 34, pp 253-258.
- [15] Leytem, A.B.; Westermann, D.T. (2003) Phosphate sorption by pacific northwest calcareous soils. *Soil Sci.*, 168, pp 368-375.
- [16] Lobartini, J.C.; Tan, K.H.; Pape, C. (1994). The nature of humic acid-apatite interaction products and their availability to plant growth. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 25, pp 2355-2369.
- [17] Riggle, J.; von Wandruszka, R. (2005). Binding of inorganic phosphate to dissolved metal humates. *Talanta* 66, pp 372-375.
- [18] Guardado, I.; Urrutia, O.; Garcia-Mina, JM (2005). A methodological approach to the study of the formation and physico-chemical properties of phosphate-metal-humic complexes in solution. *J Agric. Food Chem.*, 53, pp 8673-8678.
- [19] Guardado, I.; Urrutia, O.; Garcia-Mina, JM (2007) Size distribution, complexing capacity and stability of phosphate-metal-humic complexes. *J. Agric. Food Chem.*, 55, pp 408-413.
- [20] Guardado, I.; Urrutia, O.; Garcia-Mina, JM (2008). Some structural and electronic features of the interaction of phosphate with metal-humic complexes. *J. Agric. Food Chem.*, 56, pp 1035-1042.
- [21] Riggle, J.; von Wandruszka, R. (2007) <sup>31</sup>P NMR peak width in humate-phosphate complexes *Talanta*, 73 pp.953-958.
- [22] Stevenson, F.J. *Humus Chemistry*. Wiley & Sons, NY, 1994.

