



XXVI

Congreso Argentino
de la Ciencia del Suelo

Suelo: Legado social de edición limitada

**ACTA DE CONFERENCIAS, MESAS PANEL, TRABAJOS
COMPLETOS, COMUNICACIONES Y RESÚMENES**

San Miguel de Tucumán
15 al 18 de mayo de 2018

ISBN 978-987-46870-0-5



9 789874 687005



C6P17. DETERMINACIÓN DEL COCIENTE CALORESPIROMÉTRICO ($p / r\text{CO}_2$) DE SUELOS TRATADOS CON SOLVENTES ORGÁNICOS

Dominguez, A. Nicolás^b; Schabes, Fanny I.^b y Sigstad, E. Elizabeth^{a,b*}

^aINQUINOA - CONICET. ^bInstituto de Química Orgánica. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Ayacucho 471. CP T 4000 INI. Tucumán. Argentina. lizzie@fbqf.unt.edu.ar

RESUMEN

La calorespirometría es una técnica, muy empleada en suelos, que permite la medición simultánea de la evolución de calor, p , y de CO_2 producidos por sistemas biológicos. El cociente calorespirométrico, $p / r\text{CO}_2$, permite evaluar aspectos metabólicos importantes de los sistemas biológicos. El CO_2 producido por los microorganismos que viven en el suelo proviene en su mayor parte de la descomposición de la materia orgánica y es un eslabón imprescindible en el ciclo del carbono. Los solventes dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MeOH), cloroformo (CHCl_3) y acetato de etilo (AcOEt) se usaron para evaluar qué efecto tenían sobre el cociente calorespirométrico. Se determinaron valores de pH y el contenido de carbono orgánico tanto en suelos tratados con solventes como en suelo sin tratar. Encontramos que los valores de $p / r\text{CO}_2$ para los suelos tratados exhibieron valores que supondrían que la capacidad mineralizadora de los microorganismos se ve afectada, produciendo menos cantidad de CO_2 a diferencia de los suelos no tratados, original y control, cuyos valores de $p / r\text{CO}_2$ coincidían con los valores normales.

Palabras clave: calorespirometría, biocalorimetría, metabolismo

INTRODUCCIÓN

La calorespirometría es una técnica calorimétrica que se utiliza para medir la evolución de dióxido de carbono (CO_2) del sistema que se estudia en simultáneo con la velocidad de producción de calor o potencia térmica, p . Es una técnica muy empleada en sistemas biológicos, como ser células animales, semillas, insectos y microorganismos (Kemp, 2000; Edelstein *et al.*, 2001; Acar *et al.*, 2004; Wadsö *et al.*, 2004). Como toda técnica calorimétrica, ofrece las ventajas de ser no destructiva y no invasiva. Mide en tiempo real y en condiciones *in situ* la cinética de los procesos que ocurren en el sistema (Sigstad, 2013; Ning, 2013). Por ello, es particularmente usada en suelos (Barros *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2011; Herrmann & Bölscher, 2015). La calorespirometría permite además conocer dos aspectos metabólicos importantes: las rutas metabólicas empleadas y la eficiencia del metabolismo de las células (Hansen *et al.*, 2004). Con esta técnica también se puede determinar la biomasa microbiana del suelo (Sesto Cabral & Sigstad, 2011). Los valores de potencia térmica, p , junto con los valores de velocidad de producción de CO_2 ($r\text{CO}_2$), dan el cociente calorespirométrico, $p / r\text{CO}_2$. La interpretación de dicho cociente, supone tener en cuenta la regla de Thornton, quien estableció que el valor de la entalpía de combustión para cualquier compuesto orgánico es aproximadamente constante en condiciones aerobias (Thornton, 1917) y de -455 kJ mol^{-1} . Otra forma de interpretarlo es establecer modelos bioquímicos, con la aplicación de ecuaciones (Hansen *et al.*, 2004).

El suelo es un sistema bioquímico abierto que posee poblaciones microbianas que son esenciales en el ciclo de los elementos, entre ellos el ciclo del carbono. La transformación de la materia orgánica del suelo en CO_2 (mineralización), supone dos aspectos importantes: el CO_2 producido contribuye a los gases de efecto invernadero (Herrmann *et al.*, 2014), los microorganismos son los que aportan la mayor cantidad a la atmósfera (Madigan *et al.*, 2009a); y por otro lado, la disminución de la materia orgánica del suelo, deteriora la calidad del mismo (Khan, 2013). El CO_2 que proviene del suelo, es en su mayor parte producto de la respiración microbiana, impulsada por la degradación de la materia orgánica (Barros & Feijóo, 2003)

En este trabajo, nos planteamos determinar el efecto que tienen los solventes metanol, dimetilsulfóxido, acetato de etilo y cloroformo (solventes orgánicos de uso frecuente en los laboratorios para vehicular al suelo sustancias hidrofóbicas (Sesto Cabral *et al.*, 2008; Forero *et al.*, 2009)) sobre el cociente calorespirométrico.



MATERIALES Y METODOS

Suelo

El suelo fue recolectado en Parque Norte, San Miguel de Tucumán, Provincia de Tucumán, Argentina (26°48'17.7"S 65°13'55.1"W). El suelo fue tamizado (2 x 2 mm) para eliminar restos de raíces y material grueso. Se tomó una alícuota para determinar humedad, y se dejó secar el suelo durante 7 días en el laboratorio; luego se lo guardó en bolsas de polietileno a 4 °C en la heladera hasta su utilización. Este suelo se identificó como suelo original no molido (SONm). Se tomó otra porción del suelo original y luego de pasarla por el tamiz se la molió en un mortero y almacenó como se indicó previamente. Este suelo se identificó como suelo original molido (SOM).

Para la inoculación del suelo con los solventes se usaron *plugs* de 25 macetas. En cada maceta (105 cm³, 9 cm de profundidad), se colocó una alícuota de 91,2 g de suelo seco (densidad aparente: 0,87 g cm⁻³). Los suelos fueron llevados al 60% de su capacidad de retención de agua (CRA: 33%) mediante el añadido de la cantidad necesaria de agua. Luego se agregaron los solventes hasta obtener las concentraciones 1,0; 3,0 y 5,0 cm³ kg⁻¹. Los *plugs* con las muestras de suelo tratadas con solventes (cada tratamiento usó SONm como una réplica y SOM como la otra) y dos réplicas de suelo al 60% de su CRA sin solventes (suelo control, no molido y molido) fueron cubiertas con polietileno para conservar la humedad y dejadas a temperatura ambiente por el término de tres meses. Luego de este tiempo, las muestras se guardaron individualmente en bolsas de polietileno a 4 °C hasta su estudio. El suelo original nombrado en este trabajo es el suelo virgen, es decir que no fue inoculado con solventes ni incubado en *plugs* durante tres meses.

El contenido de humedad (CH) fue determinado por secado de una alícuota (x2) hasta peso constante a 105°C (Jackson, 1970). La densidad aparente y la capacidad de retención de agua (CRA) fueron determinadas por el método de la probeta (Tan, 2005). El pH fue medido con un electrodo de vidrio en una suspensión de suelo en agua desionizada (1:1) (Tan, 2005). El carbono orgánico (CO) fue determinado por el método de oxidación húmeda con K₂Cr₂O₇/H₂SO₄ (Mingorance *et al.*, 2007).

Calorespirometría

Se utilizó un calorímetro isotérmico del tipo conducción de calor por termopilas con arreglo mellizo diseñado y construido en la Universidad de Lund, Suecia (Sigstad *et al.*, 2002; Sesto Cabral *et al.*, 2008; Sesto Cabral & Sigstad, 2011). El calorímetro se calibra eléctricamente.

Las muestras de suelo (5,0 - 6,0 g) fueron estabilizadas en bolsas de polietileno al 60% de su CRA durante 24 h a 25°C. Luego, la muestra fue llevada a su CRA, se homogeneizó bien con las manos y se pesó una alícuota de suelo de entre 1,0 - 1,5 g en la ampolla del calorímetro (8,0 cm³) para realizar la medición. La ampolla se cierra herméticamente y se introduce en el calorímetro. Después de 30 min (tiempo necesario para la estabilización del sistema) se adquieren los valores de potencia térmica (*P*) - tiempo (*t*) a 25°C. En la ampolla de referencia se colocó una cantidad de agar seco equivalente en peso.

Una vez que el sistema se equilibró y los valores de potencia térmica son constantes (*P*₁), un vial conteniendo una solución de NaOH 1 M, que actúa como trampa de CO₂, es introducido y se adquieren los valores de *P* correspondientes (*P*₂). Luego de adquirir valores por 1 - 2 h, el vial es removido y se mide el metabolismo microbiano nuevamente (*P*₃) (Criddle *et al.*, 1990). La velocidad de producción de CO₂ específica, *r*CO₂, es calculada usando la expresión:

$$rCO_2 = \{P_2 - [(P_1 + P_3) / 2]\} / 109,4 m \quad (1)$$

El valor 109,4 kJ mol⁻¹ es el calor de reacción del CO₂ con el NaOH 1 M para producir CO₃⁼ (Mahmoudkhani & Keith, 2009), y *m* es el peso seco de la muestra de suelo. El cociente calorespirométrico, *p* / *r*CO₂ (kJ mol⁻¹), está asociado con la capacidad mineralizadora de los microorganismos. Para determinar el cociente calorespirométrico *p* / *r*CO₂, se utiliza también el calor producido cuando no está el vial o respiración basal, *p*, que viene dada por la expresión:

$$p = (P_1 + P_3) / 2 m \quad (2)$$



Los resultados fueron reportados como el promedio de por lo menos 3 mediciones (\pm SD) y se usó el test estadístico ANOVA de un factor para determinar diferencias entre los promedios de los tratamientos, con el programa Origin 6.0 (Microcal Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La CRA (capacidad de retención de agua) del suelo estudiado dio un valor de $32,9 \pm 0,1$ %; se trabajó con 33% de CRA. Esto es porque los microorganismos tienen su mayor actividad a esta humedad del suelo. La Tabla 1 muestra las propiedades químicas determinadas del suelo original, el suelo control y los suelos tratados con solventes.

Tabla 1. Valores de pH y carbono orgánico (CO) del suelo original (SO), el suelo control (SC) y los suelos tratados.

Solvente / $\text{cm}^3 \text{kg}^{-1}$	pH	CO / g kg^{-1}
0 SO	$6,2 \pm 0,1$	$33,3 \pm 4,6$
0 SC	$6,5 \pm 0,1$	$32,8 \pm 2,2$
1 DMSO	$5,9 \pm 0,1^*$	$36,3 \pm 5,1$
3 DMSO	$6,2 \pm 0,1$	$31,9 \pm 1,5$
5 DMSO	$6,1 \pm 0,6$	$35,5 \pm 0$
1 CHCl_3	$6,3 \pm 0,2$	$32,2 \pm 3,4$
3 CHCl_3	$6,6 \pm 0,3$	$29,5 \pm 0,2$
5 CHCl_3	$6,6 \pm 0,1$	$29,7 \pm 3,5$
1 AcOEt	$6,7 \pm 0,4$	$29,8 \pm 2,0$
3 AcOEt	$6,7 \pm 0,3$	$33,7 \pm 2,3$
5 AcOEt	$6,7 \pm 0,4$	$31,8 \pm 1,0$
1 MeOH	$6,7 \pm 0,3$	$31,0 \pm 0,7$
3 MeOH	$6,9 \pm 0,1^*$	$31,8 \pm 2,2$
5 MeOH	$6,7 \pm 0,5$	$31,2 \pm 1,8$

* significativamente diferente con respecto al SC, $p < 0.05$

Los valores de pH de los suelos tratados no mostraron una diferencia significativa con respecto al suelo control, con excepción de los suelos con $1,0 \text{ cm}^3 \text{kg}^{-1}$ de DMSO y $3,0 \text{ cm}^3 \text{kg}^{-1}$ de MeOH, que mostraron un valor por debajo y por encima del control, respectivamente. El carbono orgánico de los suelos tratados no se vio afectado por los solventes, no se obtuvieron valores significativamente diferentes con respecto al control.

La Tabla 2 muestra los valores del cociente calorespirométrico. El suelo control y los suelos originales molidos y no molidos, exhiben valores típicos de degradación de carbohidratos en condiciones aerobias (-260 a -460 kJ mol^{-1}) (Barros, 2011). Los valores típicos que puede tomar el cociente calorespirométrico van desde cero hasta -600 kJ mol^{-1} (Hansen *et al.*, 2004). El valor de la constante de Thornton es $-455 \pm 15 \text{ kJ mol}^{-1} \text{O}_2$. Cabe destacar que también es llamado equivalente oxalórico. El cociente calorespirométrico puede ser más exotérmico que dicho valor cuando las condiciones están por fuera del rango normal de las condiciones de crecimiento (Hansen *et al.*, 2004). Valores medidos más altos que la constante de Thornton indican además que el proceso que se está dando en el sistema es en parte anaeróbico (Wadsö *et al.*, 2014). Los valores de todos los suelos tratados dieron por encima de esta constante, con excepción del suelo tratado con $3 \text{ cm}^3 \text{kg}^{-1}$ de CHCl_3 , que da un valor incluso más bajo que el de los suelos original y control. El suelo tratado con $5 \text{ cm}^3 \text{kg}^{-1}$ de DMSO, exhibe el valor más exotérmico de todos, $-1425 \pm 8 \text{ kJ mol}^{-1}$. Valores tan exotérmicos fueron reportados para células animales que emplean rutas anaeróbicas (Kemp, 2000). Una de las características que podrían haber influido en la obtención de dicho cociente es la utilización de un aceptor/donador de electrones distinto del oxígeno en la respiración (Barros *et al.*, 2010). Creemos que a esta concentración, los microorganismos que están en condiciones aeróbicas, recurren a la anaerobiosis (Wadsö *et al.*, 2004), empleando el DMSO como aceptor de electrones, reduciéndolo a dimetilsulfuro ($\text{CH}_3\text{-S-CH}_3$), un compuesto volátil (Madigan *et al.*, 2009b); esta idea se ve reforzada con la presencia de aromas aliáceos en las muestras luego de las 24 h de haber iniciado el experimento.

Los valores medidos de los suelos tratados con todos los solventes estarían indicando que los solventes usados disminuyen la capacidad de los microorganismos para producir CO_2 , o sea disminuirían su capacidad mineralizadora.



Tabla 2. Valores de velocidad de producción de CO₂ específica ($r\text{CO}_2$), respiración basal (p) y cociente calorespirométrico ($p / r\text{CO}_2$).

Suelo	$r\text{CO}_2 / \text{pmol s}^{-1} \text{g}^{-1}$	$p / \mu\text{W g}^{-1}$	$p/r\text{CO}_2 / \text{kJ mol}^{-1}$
SC	130,6 ± 12,2	50,2 ± 4,5	385 ± 1
SOM	103,6 ± 15,7	71,0 ± 5,2	373 ± 21
SOnm	103,6 ± 15,7	58,8 ± 1,0	373 ± 21
DMSO / cm³ kg⁻¹			
1	67,0 ± 5,6	50,0 ± 1,8	823 ± 32
3	95,8 ± 8,9	54,8 ± 3,4	572 ± 49
5	43,0 ± 2,1	61,2 ± 3,4	1425 ± 8
MeOH / cm³ kg⁻¹			
1	96,3 ± 9,4	74,9 ± 6,1	778 ± 15
3	60,2 ± 3,2	49,0 ± 3,9	728 ± 53
5	58,5 ± 0,6	46,1 ± 0,2	789 ± 5
CHCl₃ / cm³ kg⁻¹			
1	101,4 ± 1,4	62,2 ± 5,2	584 ± 59
3	171,6 ± 5,7	45,6 ± 1,2	261 ± 8
5	72,7 ± 3,9	44,7 ± 5,5	619 ± 105
AcOEt / cm³ kg⁻¹			
1	56,9 ± 2,4	36,8 ± 2,2	640 ± 4
3	62,3 ± 6,4	40,0 ± 2,8	546 ± 2
5	65,5 ± 4,9	31,9 ± 1,4	469 ± 16

CONCLUSIONES

Esta técnica demostró ser una técnica precisa, sensible y no destructiva. Es rápida ya que no insume mucho tiempo de preparación de la muestra, y permite el monitoreo constante y de fácil interpretación de lo que ocurre en el sistema que se estudia.

Los solventes, dimetilsulfóxido, metanol, cloroformo y acetato de etilo disminuirían la capacidad de los microorganismos para producir dióxido de carbono. Esto se evidencia al observar los valores medidos de $p / r\text{CO}_2$, mayores a la constante de Thornton. Se comprobó que moler el suelo no modificaría dicho cociente.

BIBLIOGRAFÍA

- Acar, EB; DD Mill; BN Smith; LD Hansen & GM Booth. 2004. Calorespirometric determination of the effects of temperature on metabolism of *Harmonia axyridis* (Col: Coccinellidae) from second instars to adults. Environ. Entomol. 33: 832-838.
- Barros, N & S Feijóo. 2003. A combined mass and energy balance to provide bioindicators of soil microbiological quality. Biophys. Chem. 104: 561-572.
- Barros, N; J Salgado; JA Rodríguez-Añón; J Proupín; M Villanueva & LD Hansen. 2010. Calorimetric approach to metabolic carbon conversion efficiency in soils. J. Therm. Anal. Calorim. 99: 771-777.
- Barros, N; S Feijóo & LD Hansen. 2011. Calorimetric determination of metabolic heat, CO₂ rates and the calorespirometric ratio of soil basal metabolism. Geoderma 160: 542-547.
- Criddle, RS; RW Breidenbach; DR Rank; MS Hopkin & LD Hansen. 1990. Simultaneous measurement of metabolic heat rate, CO₂ production, and O₂ consumption by microcalorimetry. Thermochim. Acta 172: 213-221.
- Edelstein, M; KJ Bradford & DW Burger. 2001. Metabolic heat and CO₂ production rates during germination of melon (*Cucumis melo* L.) seeds measured by microcalorimetry. Seed Sci. Res. 11: 265-272.
- Forero, JR; HI Castro & JA Guerrero. 2009. Extracción de plaguicidas en suelo empleando dióxido de carbono supercrítico-cosolventes. Rev. Colomb. Quim. 38: 425-434.
- Hansen, LD; C Macfarlane; N McKinnon; BN Smith & RS Criddle. 2004. Use of calorespirometric ratios, heat per CO₂ and heat per O₂, to quantify metabolic paths and energetics of growing cells. Thermochim. Acta 422: 55-61.
- Herrmann, AM & T Bölscher. 2015. Simultaneous screening of microbial energetics and CO₂ respiration in soil samples from different ecosystems. Soil Biol. Biochem. 83: 88-92.



- Herrmann, AM; E Coucheney & N Nunan. 2014. Isothermal Microcalorimetry Provides New Insight into Terrestrial Carbon Cycling. *Environ. Sci. Technol.* 48: 4344-4352.
- Jackson, ML. 1970. *Análisis Químicos de Suelos*, 2da ed. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. 662 pp.
- Kemp, RB. 2000. "Fire burn and cauldron bubble" (W. Shakespeare): what the calorimetric \pm respirometric (CR) ratio does for our understanding of cells?. *Thermochim. Acta* 355: 115-124.
- Khan, TO. 2013. *Soils: Principles, Properties and Management*. Springer. Bangladesh. 274 pp.
- Madigan, MT; JM Martinko; PV Dunlap & DP Clark. 2009a. Ciclo de los nutrientes, biorremediación y simbiosis. Brock. *Biología de los microorganismos*. 12° edición. 769. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 1296 pp.
- Madigan, MT; JM Martinko; PV Dunlap & DP Clark. 2009b. Diversidad metabólica: catabolismo de los compuestos orgánicos. Brock. *Biología de los microorganismos*. 12° edición. 704-705. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 1296 pp.
- Mahmoudkhani, M & DW Keith. 2009. Low-energy sodium hydroxide recovery for CO₂ capture from atmospheric air-Thermodynamic analysis. *Int. J. Greenh. Gas Con.* 3: 376-384.
- Mingorance, MD; E Barahona & J Fernández Gálvez. 2007. Guidelines for improving organic carbon recovery by the wet oxidation method. *Chemosphere*. 68: 409-413.
- Ning, XQ; WW Qiao; L Zhang & X Gao. 2013. Applications of Microcalorimetry in Environmental Sciences. *Asian J. Chem.*: 25, 8838-8842.
- Sesto Cabral, ME & EE Sigstad. 2011. A new approach to determine soil microbial biomass by calorimetry. *J. Therm. Anal. Calorim.* 104: 23-29.
- Sesto Cabral, ME; AM Fortuna; EC de Riscalá; CAN Catalán & EE Sigstad. 2008. Allelopathic activity of *Centaurea diffusa* and *Centaurea tweediei*: Effects of cnicin and onopordopicrin on seed germination, phytopathogenic bacteria and soil. *Allelopathy J.* 21: 183-190.
- Sigstad, EE. 2013. *Microcalorimetría. Fundamentos y aplicaciones en sistemas biológicos*. Curso de posgrado. Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán.
- Sigstad, EE; MA Bejas; MJ Amoroso & CI García. 2002. Effect of deforestation on soil microbial activity. A worm-composite can improve quality? A microcalorimetric analysis at 25 °C. *Thermochim. Acta* 394: 171-178.
- Tan, KH. 2005. *Soil Sampling, Preparation, and Analysis*. 2nd Ed. CRC Press, Taylor & Francis. Boca Raton, Florida, USA. 680 pp.
- Thornton, WM. 1917. The relation of oxygen to the heat combustion of organic compounds. *Philos. Mag.* 33: 196-203.
- Wadsö, L; Y Li & J Bjurman. 2004. Measurements on two mould fungi with a calorespirometric method. *Thermochim. Acta* 422: 63-68.