



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



## C6P16. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE SOLVENTES ORGÁNICOS SOBRE LA ACTIVIDAD MICROBIANA DEL SUELO UTILIZANDO CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA

Dominguez, A. Nicolás<sup>b</sup>; Schabes, Fanny I.<sup>b</sup> y Sigstad, E. Elizabeth<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>INQUINOA - CONICET. <sup>b</sup>Instituto 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

El suelo, un sistema bioquímico abierto, intercambia con el medio, materia y energía. Las perturbaciones que en él ocurren están acompañadas por la evolución o absorción de calor. La técnica empleada para medir directamente el flujo de calor se denomina calorimetría. Los microorganismos que viven en el suelo desempeñan diversas actividades que terminan afectando la calidad y productividad del suelo, es por ello que es importante su estudio. Nosotros empleamos calorimetría isotérmica para determinar qué efecto tienen los solventes metanol (MeOH), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), acetato de etilo (AcOEt) y dimetilsulfóxido (DMSO) sobre la actividad microbiana del suelo. Se determinó la biomasa microbiana del suelo, la constante de crecimiento microbiano y el calor producido por la degradación de la fuente de carbono, entre otros parámetros termodinámicos. Los resultados obtenidos nos indican que el metanol y el cloroformo tendrían un marcado efecto negativo sobre la actividad microbiana, mientras que el dimetilsulfóxido sería el solvente menos perjudicial. Con respecto al acetato de etilo no están claros los resultados obtenidos.

**Palabras clave:** calor, calorimetría isotérmica, constante de crecimiento microbiano

### INTRODUCCIÓN

El calor no es otra cosa que energía en tránsito y siempre se generará un flujo desde el cuerpo de mayor energía al cuerpo de menor energía (Levich, 1996). Básicamente la calorimetría es una técnica que mide ese flujo de calor. Todos los procesos físicos, químicos y biológicos están acompañados por el intercambio de calor con el medio que los rodea. Esto hace de la calorimetría una herramienta de uso muy amplio y variado. Los instrumentos utilizados por esta técnica para medir directamente el flujo de calor se llaman calorímetros. El primer calorímetro fue diseñado y construido por Laplace y Lavoisier en el año 1780 en el laboratorio privado de Lavoisier en París (Sella, 2016).

La calorimetría aplicada a los sistemas biológicos, posee la ventaja de ser una técnica general e inespecífica, no invasiva, no destructiva, sensible, que permite monitorear en tiempo real y en condiciones *in situ* lo que ocurre (Sigstad, 2013; Ning *et al.*, 2013). Es por ello que es muy utilizada en suelos (Barros *et al.*, 1995; Prado & Airoidi, 2000; Sigstad *et al.*, 2002). El suelo puede considerarse como un sistema bioquímico abierto donde cada perturbación está acompañada por la producción o absorción de calor.

La porción viviente del suelo constituye menos del 1% del volumen total del suelo, aún así, esta porción es indudablemente esencial para la producción de cultivos y la fertilidad del suelo (Alexander, 1980). De ese poco menos del 1%, la población microbiana sobresale de forma especial. Los microorganismos contribuyen al estado de agregación del suelo (Lynch & Bragg, 1985), intervienen activamente en los ciclos biogeoquímicos de los elementos (Madigan *et al.*, 2009), fijan el nitrógeno atmosférico para luego ser utilizado por las plantas (Pankhurst & Lynch, 1993) y son los principales degradadores de la materia orgánica. Es por ello que es importante su estudio.

Nos planteamos utilizar calorimetría isotérmica para evaluar el efecto de cuatro solventes orgánicos de uso frecuente en el laboratorio (Sesto Cabral *et al.*, 2008; Forero *et al.*, 2009), sobre la actividad microbiana del suelo. Los solventes seleccionados fueron: dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MeOH), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y acetato de etilo (AcOEt).



## 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 cm<sup>3</sup>, 9 cm de profundidad), se colocó una alícuota de 91,2 g de suelo seco (densidad aparente: 0,87 g cm<sup>-3</sup>). 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 cm<sup>3</sup> kg<sup>-1</sup>. Cada tratamiento usó SONm como una réplica y SOM como la otra. Los *plugs* con las muestras de suelo tratadas con solventes 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).

### Calorimetría

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) se estabilizaron en bolsas de polietileno al 60% de su CRA durante 24 h a 25°C. Luego, una cantidad adecuada de agua conteniendo glucosa fue añadida para que la muestra adquiriera por un lado su CRA, y por el otro 3,0 mg de glucosa por gramo de suelo seco. Luego se homogeneizaron bien con las manos y se pesaron 1,0 - 1,5 g en la ampolla del calorímetro (8,0 cm<sup>3</sup>) para realizar las mediciones. La ampolla se cerró herméticamente y se introdujo en el calorímetro. Después de 30 min (tiempo necesario para la estabilización del sistema) se adquirieron los valores de potencia térmica ( $P = dQ / dt$ ) - tiempo ( $t$ ) a 25°C. En la ampolla de referencia se colocó una cantidad de agar seco equivalente en peso. Paralelamente, se llevaron a cabo controles con suelo a su CRA sin el agregado de glucosa para corregir las curvas  $P - t$  de crecimiento microbiano de otros efectos térmicos que no sean los de la degradación de la glucosa.

Usando Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) y el programa Origin 6.0 (Microcal, Inc.), las curvas obtenidas se convirtieron en curvas potencia térmica específica ( $p$ ) - tiempo ( $t$ ). Integrando dicha curva y multiplicando el valor del área por 3600 h<sup>-1</sup>, obtuvimos el calor específico (-  $q$ ) asociado con la degradación de glucosa. De la conversión semilogarítmica de la porción de la curva que indica el crecimiento exponencial microbiano y por análisis de regresión lineal ( $\log p = \log p_0 + \mu t$ ) obtuvimos la constante de crecimiento de los microorganismos del suelo,  $\mu$ , y el valor de  $p$  al tiempo cero ( $t = 0$ ),  $p_0$ . También, la potencia térmica específica del pico que se produce,  $p_i$ , y el tiempo cuando se produce,  $t_p$ , fueron obtenidos de estas curvas.

Para determinar la biomasa microbiana del suelo, BMS, un vial conteniendo una solución de NaOH 1 M fue introducido durante la fase *lag* de las curvas de crecimiento microbiano para determinar la producción de CO<sub>2</sub> (Sesto Cabral & Sigstad, 2011). Las curvas duplicados fueron promediadas y se les restó la curva promedio de los controles para obtener curvas promedios  $p - t$  del crecimiento microbiano debido a la degradación de glucosa. Los resultados son reportados como el promedio de por lo menos tres replicas  $\pm$  SD (desviación estándar).

El test estadístico ANOVA de un factor se usó 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  $32,9 \pm 0,1$  %. Los microorganismos tienen su mayor actividad a esta humedad del suelo. La Tabla 1 muestra los valores de la biomasa microbiana del suelo original, el suelo control y los suelos tratados con solventes determinados calorimétricamente.

**Tabla 1.** Valores de biomasa microbiana (BMS) del suelo original (SO), el suelo control (SC) y los suelos tratados.

Solvente / $\text{cm}^3 \text{kg}^{-1}$	BMS / $\mu\text{g g}^{-1}$
0 SO	$362,9 \pm 21,8$
0 SC	$370,1 \pm 18,8$
1 DMSO	$249,9 \pm 9,1^*$
3 DMSO	$302,2 \pm 20,3^*$
5 DMSO	$335,1 \pm 7,8$
1 $\text{CHCl}_3$	$93,77 \pm 7,3^*$
3 $\text{CHCl}_3$	$232,0 \pm 27,7^*$
5 $\text{CHCl}_3$	$244,8 \pm 52,9^*$
1 AcOEt	$232,4 \pm 56,8^*$
3 AcOEt	$213,4 \pm 23,9^*$
5 AcOEt	$230,8 \pm 8,8^*$
1 MeOH	$258,7 \pm 47,6^*$
3 MeOH	$226,5 \pm 13,6^*$
5 MeOH	$174,3 \pm 6,9^*$

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

Podemos ver en la Tabla 1 que la biomasa microbiana para el suelo original no muestra diferencia significativa con el valor obtenido para el suelo control. Esto nos indicaría, que las diferencias observadas después de la incubación de los suelos inoculados son provocadas únicamente por el efecto de los solventes. La biomasa microbiana de los suelos tratados disminuyó con respecto al suelo control. El único suelo que no mostró diferencia significativa con el control, fue el suelo con  $5,0 \text{ cm}^3 \text{kg}^{-1}$  de DMSO. A pesar de mostrar una diferencia significativa, el suelo con  $3,0 \text{ cm}^3 \text{kg}^{-1}$  de DMSO, no se alejó mucho del valor del suelo control. Si bien no hay diferencias significativas entre los valores de BMS con la concentración de MeOH y DMSO, se encontró una relación lineal entre la BMS y la concentración del solvente. Al incrementar la concentración de MeOH, decrece la biomasa; ocurre lo contrario con DMSO, la biomasa aumenta cuando se incrementa la concentración de este solvente. Las relaciones que explican este comportamiento son: MeOH:  $BMS = 298,3 - 24,7 c$ ,  $R^2 = 0,99$ ; DMSO:  $BMS = 229,6 + 21,2 c$ ,  $R^2 = 0,99$ . Esto nos sugiere que hay microorganismos que utilizan al DMSO como fuente de carbono empleando la ruta propuesta por De Bont *et. al.* (1981) que propone la formación de intermediarios azufrados volátiles con olor y el consumo de  $\text{CO}_2$  en la ruta de la serina empleada por los metilótrofos. Los resultados de este trabajo respaldarían los datos obtenidos por calorimetría presentados en otro trabajo.

En la Tabla 2 se muestran los parámetros termodinámicos calculados a partir de las curvas  $p - t$  de todos los suelos. Los SCm y SOM, difieren en la potencia térmica específica del pico ( $p_t$ ), como así también, en el tiempo del mismo ( $t_p$ ). El valor de  $p_t$  del SCm y el SONm, son los mismos. Lo mismo ocurre con el SCnm y el SOM, siendo el valor de estos más bajo que el de los primeros. Los mismos valores del  $t_p$  del SCnm y el SONm, indicaría poblaciones microbianas similares; es por ello, que el suelo no molido sería el que sufrió menos modificaciones después de la incubación.

Los suelos tratados con las tres concentraciones de DMSO, exhiben valores termodinámicos similares. Los valores de  $p_t$  son más altos que del SCnm; son similares, junto con los valores de  $t_p$ , al SCm. Los suelos molidos tratados con AcOEt muestran valores de  $t_p$  iguales al del SCm, los suelos no molidos tratados con el mismo solvente muestran valores de  $t_p$  iguales al del SCnm.

Los microorganismos de los suelos tratados con  $1 \text{ cm}^3 \text{kg}^{-1}$  de DMSO, MeOH,  $\text{CHCl}_3$  y AcOEt exhiben una constante de crecimiento microbiana,  $\mu$ , más alta que la del suelo control. Fue reportado que cuando más alta es  $\mu$  mayor es la afinidad de los microorganismos por el solvente (Chen *et al.*, 2009). Observando los valores del calor producido,  $-q$ , junto con los de la constante de crecimiento,  $\mu$ , para los suelos tratados con  $1 \text{ cm}^3 \text{kg}^{-1}$  independientemente del solvente que se use, podríamos decir que utilizan a los mismos como nutrientes (Prado & Arioldi, 2000). Para las concentraciones



3 y 5 cm<sup>3</sup> kg<sup>-1</sup>, los valores de  $\mu$  no son significativamente diferentes del suelo control o son valores bajos, salvo dos excepciones (AcOEt 3 y 5 cm<sup>3</sup> kg<sup>-1</sup>). El valor que toma  $\mu$  con el suelo tratado con 5 cm<sup>3</sup> kg<sup>-1</sup> de CHCl<sub>3</sub>, es el más bajo de todos los valores. Esto era de esperarse, considerando que el CHCl<sub>3</sub> es usado en la fumigación de los suelos para esterilizarlos. Analizando los valores de  $\mu$  de los suelos molidos y no molidos tratados con AcOEt; los suelos molidos exhiben valores más bajos o no diferentes que el control y los suelos no molidos muestran valores más altos que el control. Si relacionamos el  $t_p$ ,  $-q$  y  $\mu$  del suelo no molido tratado con las tres concentraciones de acetato de etilo, y las comparamos con el suelo control no molido, podríamos decir que el solvente no solo no afectó a los microorganismos sino que tuvo un efecto positivo; pero si observamos los valores de  $\mu$  de los suelos molidos, no podemos decir lo mismo, por lo que podríamos pensar que el hecho de moler o no el suelo solo tiene incidencia cuando se emplea acetato de etilo para inocular los suelos.

Los valores de  $\mu$  para los suelos tratados con CHCl<sub>3</sub> y MeOH decrecen linealmente con el incremento de la concentración del solvente. MeOH:  $\mu = 0,167 - 0,006 c$ ,  $R^2 = 0,99$ ; CHCl<sub>3</sub>:  $\mu = 0,209 - 0,021 c$ ,  $R^2 = 0,99$ .

**Tabla 2.** Valores del calor específico ( $-q$ ) proveniente de la degradación de 3,0 mg g<sup>-1</sup> de glucosa, tiempo de pico ( $t_p$ ), potencia térmica específica del pico ( $p_i$ ), potencia térmica específica sin glucosa ( $p_0$ ) y constante de crecimiento microbiana ( $\mu$ ) para el suelo original (SO), el suelo control (SC) y los suelos tratados.

Suelo	$t_p$ / h	$p_0$ / $\mu\text{W g}^{-1}$	$p_i$ / $\mu\text{W g}^{-1}$	$-q$ / $\text{J g}^{-1}$	$\mu$ / $\text{h}^{-1}$
<b>SCm</b>	11,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	22,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	743,6 ± 43,9 <sup>b</sup>	11,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,153 ± 0,006 <sup>a</sup>
<b>SCnm</b>	9,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	22,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	568,7 ± 55,6 <sup>a</sup>	11,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,153 ± 0,006 <sup>a</sup>
<b>SOm</b>	8,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	22,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	568,7 ± 55,6 <sup>a</sup>	10,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,153 ± 0,006 <sup>a</sup>
<b>SOnm</b>	10,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	22,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	743,6 ± 43,9 <sup>b</sup>	14,1 ± 0,8 <sup>b</sup>	0,153 ± 0,006 <sup>a</sup>
<b>DMSO</b>					
<b>1</b>	10,8 ± 0,2 <sup>d</sup>	12,6 ± 3,6 <sup>b</sup>	755,0 ± 50,1 <sup>b</sup>	12,5 ± 1,2 <sup>a,b</sup>	0,173 ± 0,010 <sup>b</sup>
<b>3</b>	11,2 ± 0,3 <sup>c,d</sup>	15,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	771,0 ± 31,2 <sup>b</sup>	13,0 ± 0,7 <sup>b</sup>	0,168 ± 0,007 <sup>a,b</sup>
<b>5</b>	10,7 ± 0,3 <sup>c,d</sup>	12,0 ± 3,0 <sup>b</sup>	757,0 ± 54,5 <sup>b</sup>	13,5 ± 0,9 <sup>b</sup>	0,181 ± 0,014 <sup>a,b</sup>
<b>MeOH</b>					
<b>1m</b>	11,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	29,5 ± 9,0 <sup>a,c</sup>	824,0 ± 129,0 <sup>b,c</sup>	15,7 ± 2,3 <sup>b</sup>	0,162 ± 0,025 <sup>a,b</sup>
<b>1nm</b>	9,2 ± 0,2 <sup>a,b</sup>	12,0 ± 2,9 <sup>b</sup>	495,0 ± 28,8 <sup>a</sup>	15,7 ± 2,3 <sup>b</sup>	0,162 ± 0,025 <sup>a,b</sup>
<b>3m</b>	10,7 ± 0,4 <sup>b,c,d</sup>	19,9 ± 1,9 <sup>a</sup>	695,0 ± 33,4 <sup>b</sup>	14,9 ± 1,7 <sup>b</sup>	0,148 ± 0,013 <sup>a,c</sup>
<b>3nm</b>	8,6 ± 0 <sup>a</sup>	19,9 ± 1,9 <sup>a</sup>	495,7 ± 69,9 <sup>a</sup>	14,9 ± 1,7 <sup>b</sup>	0,148 ± 0,013 <sup>a,c</sup>
<b>5m</b>	10,6 ± 0,4 <sup>b,c,d</sup>	28,8 ± 0,5 <sup>c</sup>	780,4 ± 27,8 <sup>b</sup>	12,9 ± 1,0 <sup>b</sup>	0,139 ± 0,001 <sup>c</sup>
<b>5nm</b>	8,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	16,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	445,3 ± 73,0 <sup>a</sup>	12,9 ± 1,0 <sup>b</sup>	0,166 ± 0,005 <sup>a,b</sup>
<b>CHCl<sub>3</sub></b>					
<b>1m</b>	11,5 ± 0,3 <sup>c</sup>	7,9 ± 1,8 <sup>b</sup>	801,2 ± 11,7 <sup>b</sup>	14,1 ± 0,9 <sup>b</sup>	0,185 ± 0,009 <sup>b</sup>
<b>1nm</b>	10,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,9 ± 1,8 <sup>b</sup>	545,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	14,1 ± 0,9 <sup>b</sup>	0,185 ± 0,009 <sup>b</sup>
<b>3</b>	10,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	20,0 ± 3,6 <sup>a</sup>	751,7 ± 60,8 <sup>b,c</sup>	13,5 ± 3,5 <sup>a,b</sup>	0,150 ± 0,006 <sup>a,c</sup>
<b>5</b>	9,5 ± 0,5 <sup>b</sup>	95,50 ± 7,7 <sup>d</sup>	836,8 ± 18,2 <sup>c</sup>	15,2 ± 2,1 <sup>a,b</sup>	0,100 ± 0,002 <sup>d</sup>
<b>AcOEt</b>					
<b>1m</b>	11,0 ± 0,2 <sup>c,d</sup>	26,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	760,7 ± 56,2 <sup>b,c</sup>	12,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	0,137 ± 0,006 <sup>c</sup>
<b>1nm</b>	9,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	12,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	617,0 ± 10,4 <sup>a</sup>	15,2 ± 0,6 <sup>b</sup>	0,181 ± 0,001 <sup>b</sup>
<b>3m</b>	11,0 ± 0,1 <sup>c,d</sup>	24,6 ± 1,2 <sup>a</sup>	796,8 ± 18,0 <sup>b</sup>	15,2 ± 2,3 <sup>b</sup>	0,141 ± 0,003 <sup>c</sup>
<b>3nm</b>	9,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	12,9 ± 2,1 <sup>b</sup>	696,0 ± 19,5 <sup>a,b</sup>	15,2 ± 2,3 <sup>b</sup>	0,187 ± 0,008 <sup>b</sup>
<b>5m</b>	11,0 ± 0,2 <sup>c,d</sup>	15,5 ± 3,6 <sup>b</sup>	847,3 ± 4,1 <sup>d</sup>	13,7 ± 1,2 <sup>b</sup>	0,156 ± 0,007 <sup>a,b,c</sup>
<b>5nm</b>	10,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	15,5 ± 3,6 <sup>b</sup>	787,8 ± 14,4 <sup>b</sup>	13,7 ± 1,2 <sup>b</sup>	0,178 ± 0 <sup>b</sup>

Diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores,  $p < 0,05$

## CONCLUSIONES

La calorimetría es una técnica que no insume mucho tiempo y permite un seguimiento constante de lo que ocurre en el sistema. Los resultados que se obtienen con ella se conciben con resultados de otras investigaciones.

Los resultados de nuestras investigaciones empleando calorimetría muestran que de los solventes empleados los que tendrían un marcado efecto negativo sobre la población microbiana del suelo serían el cloroformo y el metanol. El dimetilsulfóxido es el solvente que menos afectaría a los microorganismos del suelo. Aún no podemos dilucidar el efecto que ocurre en el suelo al ser inoculado con acetato de etilo.



La calorimetría permitió observar también el efecto que tiene moler el suelo sobre los microorganismos que en él residen. Un suelo molido sufre modificaciones de sus parámetros termodinámicos durante su almacenamiento.

## BIBLIOGRAFIA

- Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. A.G.T. México. 491.
- Barros, N; I Gomez-Orellana; S Feijóo & R Balsa. 1995. The effect of soil moisture on soil microbial activity studied by microcalorimetry. *Thermochim. Acta* 249: 161-168.
- Chen HL; J Yao; L Wan; F Wang; E Bramanti; T Maskow & G Zaray. 2009. Evaluation of solvent tolerance of microorganisms by microcalorimetry. *Chemosphere* 74: 1407-1411.
- De Bont, JAM; JP Van Dijken & W Harder. 1981. Dimethyl Sulphoxide and Dimethyl Sulphide as a Carbon, Sulphur and Energy Source for Growth of *Hjphomicrobium* S. J. *Gen. Microbiol.* 127: 315-323.
- Forero, JR; HI Castro & JA Guerrero. 2009. Extracción de plaguicidas en suelo empleando dióxido de carbono supercrítico-cosolventes. *Rev. Colomb. Quim.* 38: 425-434.
- Jackson, ML. 1970. Análisis Químicos de Suelos, 2da ed. Omega S.A. Barcelona, España. 662 pp.
- Levich VG. 1996. Curso de Física Teórica Vol. 1 y 2, 2º Edición. Editorial Reverté, S.A. España.
- Madigan, MT; JM Martinko; PV Dunlap & DP Clark. 2009. Ciclo de los nutrientes, biorremediación y simbiosis. En: Brock. *Biología de los microorganismos*. 12º edición. 769. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 1296 pp.
- Ning, XQ; WW Qiao; L Zhang & X Gao. 2013. Applications of Microcalorimetry in Environmental Sciences. *Asian J. Chem.* 25: 8838-8842.
- Pankhurst, CE & JM Lynch. 1993. The role of soil microbiology in sustainable intensive agriculture. *Adv. Plant Pathol.* 11: 233-235.
- Prado, AGS & C Airoidi. 2000. Effect of the pesticide 2,4-D on microbial activity of the soil monitored by microcalorimetry. *Thermochim. Acta* 349: 17-22.
- Sella A. 2016. Laplace's calorimeter. <https://www.chemistryworld.com/opinion/laplaces-calorimeter/1010082.article>. Consultado en 2017.
- Sesto Cabral, M. E. & E. E. Sigstad. 2011. A new approach to determine soil microbial biomass by calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 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 onoopordopicrin 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.