

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo



Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo

María Elena Castelán · Claudina María Hack
Miriam Porta · Cristina Esther Sotelo

COORDINADORAS

Silvia A. Arzuaga · Karina R. Ávalos Llano
Natalia Banegas · Sebastián Carnicer
Mónica M. Collavino · Stella M. Contreras Leiva
Amilcar Correa · Marcela R. Cossoli
Mario R. Delfino · Mariana Ferrerira
Daniela González · Daniel H. Grasso
María C. Iglesias · Natalia Mansilla
Cecilia Martin · Gernán L. Pérez
José M. Recalde · Amalia M. E. Romero
Julieta Rojas · Matías H. Serafini
Andrea A. Sirio · Cristina E. Sotelo
Marcela Toledo · Emilce Viruel

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo / Silvia A. Arzuaga ... [et al.]; coordinación general de María Elena Castelán ... [et al.]. - 1a edición para el alumno - Corrientes : Editorial de la Universidad Nacional del Nordeste EUDENE ; Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo, 2022. Libro digital, PDF - (Ciencia y técnica)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-656-211-3

1. Técnicas de Análisis. 2. Microbiología. 3. Suelos. I. Arzuaga, Silvia A. II. Castelán, María Elena, coord.

CDD 577.57

Edición: Irina Wandelow

Corrección: Facundo Alarcón / Irina Wandelow

Diseño y diagramación: Julia Caplan



© EUDENE. Coordinación de Comunicación Institucional, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, 2023.

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723.
Reservados todos los derechos.

25 de Mayo 868 (cp 3400) Corrientes, Argentina.
Teléfono: (0379) 4425006
eudene@unne.edu.ar / www.eudene.unne.edu.ar

Capítulo 2. Carbono de la biomasa microbiana del suelo.

Método de fumigación-extracción

Cristina E. Sotelo, Andrea A. Sirio
y Germán L. Pérez

La importancia de la determinación del carbono en la biomasa microbiana se debe al papel principal de los microorganismos del suelo en la retención como en la liberación de nutrientes y energía del sistema. Este parámetro ha sido empleado como bioindicador de los cambios en la materia orgánica del suelo, por representar un índice más sensible que el carbono orgánico total. El carbono orgánico extraído en una solución de sulfato de potasio es determinado en muestras de suelo fumigadas con cloroformo (biocida) y no fumigadas, y el carbono de su constitución es valorado por dicromatometría. El incremento en las cantidades de carbono en las muestras fumigadas con respecto a los controles es considerado como carbono de la biomasa microbiana del suelo.

La biomasa microbiana del suelo se define como el componente microbiano vivo del suelo (Sparling, 1985) que, al ser microbiano, excluye a la macrofauna y a las raíces de las plantas (Jenkinson y Ladd, 1981). La importancia de la determinación del carbono de la biomasa microbiana se debe al papel principal que juega la materia orgánica del suelo, por representar un índice más sensible que el carbono orgánico total, debido a que en este último existe un elevado porcentaje de fracciones muy estables, que pueden llegar a enmascarar las alteraciones de aquellas fracciones más susceptibles de cambio (Powlson y Jenkinson, 1981).

La biomasa microbiana del suelo tiene las siguientes funciones:

- a. Es una fuente lábil o un sumidero inmediato para el carbono, nitrógeno, fósforo y azufre (Dalal, 1998), de forma que regula la transformación de la materia orgánica (Gregorich *et al.*, 1994; Turco, Kennedy y Jawson, 1994).
- b. Conduce la transformación de nutrientes (Smith y Paul, 1990).

c. Es un agente cementante de los agregados del suelo (Chan y Heenan, 1999).

La biomasa se encuentra principalmente constituida por bacterias y hongos, aunque también forman parte de ella la microfauna del suelo y las algas. Es una fracción enormemente importante de la materia orgánica del suelo, pese a que representa solo entre un 1 y un 5% del total de la misma (Jenkinson, 1988). Esta proporción tiende a ser mayor en los suelos arcillosos que en los arenosos (Wardle, 1992), aparentemente debido al proceso protector de las arcillas sobre la biomasa microbiana (Mercx, Den Hatog y Van Veen, 1985; Van Veen, Ladd y Amato, 1985).

La biomasa microbiana se renueva mucho más rápido que el resto de la materia orgánica (Jenkinson y Ladd, 1981; Paul, 1984), lo que hace que se haya sugerido el empleo de la misma como indicador de la calidad del suelo.

Por otra parte, diversos autores (Powlson y Jenkinson, 1981; Powlson, Brookes y Christensen, 1987; Sparling, 1992) han sugerido que las variaciones del contenido de la biomasa microbiana en los suelos reflejan tendencias a largo plazo en los contenidos de materia orgánica y, debido a ello, se ha recomendado como indicador del carbono orgánico del suelo. Varios estudios han puesto de manifiesto la importante relación existente entre la biomasa microbiana, la velocidad de descomposición de la materia orgánica y la mineralización del nitrógeno (Jenkinson, 1988, Carter *et al.*, 1999). Para evaluar la biomasa microbiana se utilizan varios métodos, en este capítulo describiremos el de fumigación-extracción.

2.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La determinación de la biomasa microbiana mediante fumigación con cloroformo abarca dos técnicas diferentes: el método de fumigación-incubación (CFI) y el método de fumigación-extracción (CFE), de acuerdo con Brookes *et al.* (1985) y Vance *et al.* (1987). En ambos casos, los vapores de cloroformo matan a los microorganismos del suelo y se diferencian en la forma de medir el tamaño de la biomasa muerta.

En el método CFI se estima por cuantificación del CO₂ respirado tras un período específico de incubación, mientras que en el CFE se determina por extracción directa del suelo tras la fumigación, seguida de cuantificación del carbono extraíble. Este último método ha venido sustituyendo al anterior, debido a su rapidez, ya que evita el período de incubación de 10 días.

Otro método indirecto empleado comúnmente es el de respiración inducida por sustrato (SIR). Este método tiene en cuenta solamente la fracción metabólicamente activa de la biomasa microbiana (Carter *et al.*, 1999), a partir de medidas del cambio inicial en la velocidad de respiración del suelo como consecuencia de la adición de un sustrato fácilmente degradable (glucosa), según Anderson y Domsch (1978).

El único inconveniente que presentan los métodos indirectos es que solo permiten cuantificar la biomasa microbiana, sin detallar su composición (Bailey *et al.*, 2002), de modo que la biomasa microbiana representaría una «caja negra» que permite conocer poco sobre la estructura de la comunidad microbiana o de los procesos que tienen lugar en dicha comunidad (Dalal, 1998).

Una de las ventajas del método CFE es que implica la extracción con K_2SO_4 0,5 M, por lo que en esta determinación también se obtiene una medida de carbono lábil (Haynes, 2005). La extracción de carbono con K_2SO_4 simula la solución del suelo, que es el principal recurso para que los microorganismos obtengan nutrientes. Por lo tanto, esta medida de carbono –en adelante se hará referencia a ella como carbono lábil– puede emplearse como medida del carbono actualmente disponible para los microorganismos (West *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1998).

La metodología de CFE utiliza también cloroformo, porque es un biocida efectivo y no solubiliza la materia orgánica del suelo no microbiana (Jenkinson, 1976); los microorganismos del suelo son lisados y valorados por dicromatometría (Page, 1982). El C (carbono) y N (nitrógeno) orgánico extraídos en una solución de sulfato de potasio (0,5 M) son determinados en muestras de suelo fumigadas y no fumigadas. El incremento en las cantidades de C y N determinados en las muestras fumigadas con respecto a los controles son considerados como carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana del suelo.

Los principios de este método, de acuerdo con Paz Ferreiro (2006), son:

- La fumigación del suelo mata la biomasa microbiana y no afecta la materia orgánica no viva.
- El número de organismos muertos en el suelo no fumigado es insignificante comparado con el del suelo fumigado.
- La fracción del carbono mineralizado de la biomasa microbiana muerta en un período de tiempo de 10 días no difiere en diferentes suelos.

El cloroformo es escogido como fumigante debido a que es un producto comercial más fácil de remover del suelo que el

metilbromido, formaldehído y el cloropicrín. Para el método que describimos, el cloroformo debe estar libre de etanol, que generalmente se encuentra en la presentación normal del reactivo.

El cloroformo provoca la muerte celular al lisar las membranas celulares. La lisis de las células microbianas depende del tiempo, de la temperatura, así como de la localización de los microorganismos en la estructura y características del suelo, tales como porosidad y materia orgánica, arcilla y contenido de carbonatos. Es por eso que es importante utilizar un factor de corrección (k_c) para obtener valores más aproximados.

El valor k_c se considera constante para todos los suelos sin importar el tipo de microorganismos que existan en ellos. Sin embargo, se encuentran muchos trabajos en los que se cuestiona dicha afirmación. Lynch y Panting (1980) reportan que la fumigación con cloroformo mata el 82 y 89% de las bacterias y cerca del 99% de los hongos en un suelo arcilloso. Hu y Van Bruggen (1998) encontraron que la eficiencia de fumigación con cloroformo para bacterias es de 98,5 a 93,46%. Toyota *et al.* (1996) proponen que esta diferencia puede deberse a los exopolisacáridos secretados por las bacterias que las protegen de la acción del cloroformo, así como a la propia matriz del suelo cuando estas están embebidas en ella, y Anderson y Domsch (1978) encontraron que el promedio de la mineralización de hongos y bacterias no es el mismo después de la fumigación, datos contrarios a los encontrados por Jenkinson y Powlson (1976). Como en los suelos de la región aún no se determinó el valor de K_c , para las determinaciones se utiliza un $k_c=0,35$, basado en datos bibliográficos.

2.2. OBJETIVO DE LA DETERMINACIÓN

El objetivo de la determinación de biomasa microbiana es conocer los valores para poder comparar distintas situaciones de manejo y construir índices de calidad de suelos a partir de los datos obtenidos.

Estos índices son útiles para decidir acciones con relación a la prevención, al monitoreo, a los servicios ambientales y a la valoración de tierras (Albanesi, 2013). La identificación de indicadores que permitan monitorear o predecir la degradación del recurso suelo resulta fundamental, ya que los grandes problemas agroecológicos pueden ser traducidos sobre la base de criterios que pueden ser medidos. Se plantea que las características más dinámicas del suelo, tales como la biomasa microbiana, responden más rápidamente a los cambios en las prácticas de manejo o condiciones ambientales. En este capítulo desarrollaremos la metodología de

fumigación-extracción, describiendo los procedimientos con algunos detalles importantes a tener en cuenta para el desarrollo de la misma.

2.3. EQUIPAMIENTO

Los equipamientos necesarios para la realización de la marcha son:

- Plancha digestora a 140 °C o digestor automático
- Centrífuga (2000 rpm)
- Espectrofotómetro (590 nanómetros)
- Agitador orbital.

2.4. REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Para realizar las soluciones, se deben secar los reactivos en estufa a 100 °C durante 1 h; según qué solución se desea preparar, los mismos se detallan en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1. Reactivos y preparación de soluciones

Reactivo	Fórmula química y peso molecular	Preparación de la disolución
Sulfato de potasio 0,5 M (*)	K_2SO_4 PM 174,5 g/mol	87,250 g en 1000 ml de agua destilada
Dicromato de potasio 0,0667 M	$K_2Cr_2O_7$ PM 294,2 g/mol	1,992 g en 100 ml de agua destilada
Ácido sulfúrico	H_2SO_4 PM 98.079 g/mol	Proanálisis
Biftalato de potasio(**) Concentración final: 3 g C.L.⁻¹	$KC_8H_5O_4$ PM 204,220 g/mol	6,382 g en 1000 ml de agua destilada
Glucosa Concentración final: 3 g C.L.⁻¹	$C_6H_{12}O_6$ PM 180 g/mol	7,500 g en 1000 ml de agua destilada

* Preparar 1 hora antes, ya que tarda mucho en disolverse. Se puede calentar la solución para acelerar.

** Biftalato de K (sinónimos: ftalato de potasio e hidrógeno, ftalato ácido de potasio, ácido ftálico, sal de potasio, ácido 1,2, bencenodicarboxílico, sal monopotasio).

2.5. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

La limpieza del material del laboratorio es importante porque mediante ese proceso eliminaremos residuos de sustancias y polvo que interfieren en las reacciones de los análisis. Existen distintos procedimientos para este fin, por lo que a continuación detallaremos uno de ellos.

- Lavar el material de vidrio y plástico con cepillo, cuidando que no queden residuos de ningún tipo.
- Lavar con una solución de HCl (4 ml de HCl por cada 3 l de agua).
- Enjuagar con agua corriente 3 veces.
- Enjuagar con agua destilada (2 o 3 veces, aproximadamente).
- Secar el material de vidrio recién lavado en la estufa (controlar que la temperatura no supere los 40 °C).

2.6. PROCEDIMIENTO

Para realizar la marcha, debemos elaborar una curva patrón. La misma es una curva de referencia construida con cantidades conocidas de una sustancia que se utilizará para determinar la cantidad de esa sustancia en la muestra problema.

2.6.1. Curva patrón

En la construcción de la curva patrón se pueden elegir dos reactivos: glucosa o biftalato de potasio –según nuestra experiencia, es más estable el biftalato–. La concentración y preparación de la solución madre patrón se vio en el apartado 2.4. Reactivos y preparación de soluciones.

Tabla N° 2. Dilución del compuesto patrón elegido

<u>ml de solución madre patrón</u>	<u>ml de agua destilada</u>	<u>Concentración final obtenida (g de C L⁻¹)</u>
0	100	0
0,5	99,5	0,015
1	99	0,03
1,5	98,5	0,045
2	98	0,06

1. Lavar el material como se ha indicado anteriormente.
 2. Utilizar 4 a 5 matraces de 100 ml; si se utilizan 4 matraces, el agua destilada se puede pipetear de un vaso de precipitados lavado correctamente.
 3. Realizar las diluciones del compuesto patrón elegido (en los matraces apropiados), en las proporciones de la Tabla N° 2.
 4. Trabajar con estas diluciones como si se tratase de la muestra (procesarlas de igual manera, tomando 4 ml de las diluciones realizadas).
 5. Agregar 4 ml de la dilución al balón de digestión (un tubo por dilución), adicionar 1 ml de dicromato de potasio 0,0667 M y, por último, 4 ml de H_2SO_4 con el cuidado de agitar cada 1 ml dispensado (reacción muy exotérmica); al finalizar, pasar por el vórtex para homogeneizar. Recordar que por cada dilución se utiliza una pipeta distinta.
 6. Digerir a 140 °C en la placa digestora durante 30 minutos.
 7. Dejar enfriar¹. Encender el espectrofotómetro, aproximadamente 30 minutos antes de la determinación, de manera que se estabilice el equipo. Ajustar la longitud de onda a 590 nm.
 8. Agregar 1 ml de agua destilada. Si se observan variaciones de densidad, debe agitar 2-3 pulsos de vórtex hasta que desaparezca.
 9. Medir absorbancia en espectrofotómetro a 590 nm².
 10. Con los valores obtenidos de absorbancia, realizar la regresión lineal. Para el mismo, se cargan en una planilla de cálculo los datos y se realiza un gráfico de dispersión. En la abscisa se cargan las concentraciones y en la ordenada, el origen de las lecturas de absorbancia. Se le pide al programa la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión –es recomendable que los valores del coeficiente sean igual o mayor a 0,99–, y con esos datos de la ecuación después realizaremos los cálculos (Figura N° 1).
- La regresión lineal ajustada –realizada con la curva patrón– a la ecuación

$$Y=a+b*x$$

1. Evitar el cambio brusco de temperatura cuando se terminen de digerir las muestras, ya que se generan partículas en suspensión que interfieren luego en la lectura del espectrofotómetro.

2. Tener la precaución de usar guantes y de colocar un papel absorbente alrededor de donde se trabaje, ya que la solución usada es corrosiva (leer la ficha de seguridad de este reactivo).

Siendo: a la ordenada al origen (constante) y b la pendiente (g de C L⁻¹ de glucosa o biftalato de K). Entonces:

$$g \text{ de C L}^{-1} = (Y-a)/b$$

Siendo: Y el valor de absorbancia leída.

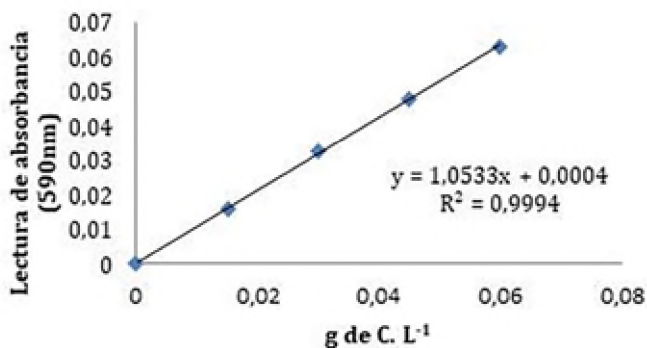


Figura N° 1. Gráfico de dispersión realizado con los datos de la curva patrón, donde se observa la ecuación de la recta y el R².

2.6.2. Obtención del extracto de la muestra

Una vez obtenida la curva patrón, se debe extraer del suelo problema el carbono de la biomasa microbiana, la misma se realiza en dos días. El primero, de incubación y el segundo, de extracción y lectura.

Día 1

1. Pesar 7,5 g de suelo en un tubo tipo Falcon de 50 ml.
2. Agregar al suelo, ubicado en posición tipo pico de flauta para ampliar la superficie de mojado, 2,5 ml de agua destilada (relación 3:1, suelo: agua). Tapar en forma no hermética (tapón apoyado, tapón sin rosca o tapón de aluminio).
3. Incubar durante 15 horas, $\pm 1h$ a 30 °C en la oscuridad (estufa). Hacer 6 tubos por muestra.

Día 2

1. Fumigar tres tubos de una muestra con 0,4 ml de cloroformo libre de etanol durante 30 minutos tapando herméticamente, con tapa a rosca o tapones de goma si los tubos no tuvieran rosca. Los otros tres tubos no se fumigan y se constituyen en blancos sin cloroformo.



Figura N° 2. Tubos con suelos humedecidos en forma de pico de flauta y colocados en la gradilla para llevar a incubar.

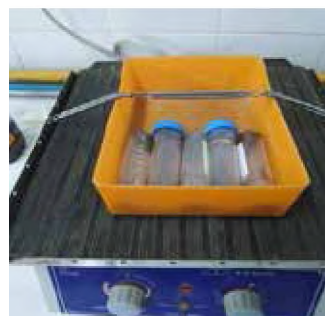


Figura N° 3. Agitación de los tubos en forma horizontal.

2. Agregar a todos los tubos el extractante: 30 ml de K_2SO_4 0.5 M.
3. Agitar 1 hora en agitador mecánico, acostando los tubos cerrados herméticamente.
4. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos.
5. Filtrar con papel de filtro banda azul y recoger el extracto en tubos tipo Falcon de 50 ml limpios. Los extractos se pueden guardar en heladera para su uso en los próximos 2 o 3 días, o en freezer durante un tiempo prolongado. Es común la aparición de un mucílago en el extracto –mencionado en las normas ISO 14240-2– y ello no modifica el resultado. No obstante, hay que evitar tomar el mucílago con la pipeta en la alícuota para la determinación del carbono de la biomasa microbiana (CBM), porque ello complica la determinación por espectrofotometría. Si se realiza el mismo día la digestión de la muestra, centrifugar el extracto antes; si se realiza al día siguiente, el reposo favorece la precipitación de ese mucílago.

2.6.3. Digestión del extracto y lectura en el espectrofotómetro

Para determinar el carbono de la biomasa microbiana, se realiza una digestión del extracto y posterior lectura en espectrofotómetro.

1. Agregar 4 ml del extracto al tubo de digestión previamente rotulado (un tubo por extracto), adicionar 1 ml de dicromato de potasio 0,0667 M y, por último, agregar 4 ml de H_2SO_4 con el cuidado de ir agitando cada 1 ml dispensado (reacción muy exotérmica). Al finalizar, pasar por el vórtex para homogeneizar. Recordar que por cada extracto se utiliza una pipeta distinta.
2. Realizar en un tubo un blanco, en el que en vez de la muestra, se colocan 4 ml de agua destilada. Este se realiza para cada tanda de determinaciones, ya que es para llevar a cero el espectrofotómetro.
3. Digerir a 140 °C en la placa digestora durante 30 minutos.
4. Dejar enfriar. Mientras tanto, encender el espectrofotómetro, aproximadamente 30 minutos antes de la determinación, de manera que se estabilice el equipo. Ajustar la longitud de onda a 590 nm.
5. Agregar 1 ml de agua destilada. Si se observan variaciones de densidad, se debe agitar en 2-3 pulsos de vórtex hasta que desaparezca esa imagen.
6. Medir absorbancia en espectrofotómetro a 590 nm. Tener la precaución de usar guantes y de colocar un papel absorbente alrededor de donde trabaje, ya que la solución de trabajo es corrosiva.



Figura N° 4. Centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos.



Figura N° 5. Filtrado de la muestra con filtro banda azul.



Figura N° 6. Recolección del extracto en tubos limpios.

2.7. CÁLCULOS

De acuerdo con la Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo y el Interlaboratorio de Comisión Biología de Suelos (2012), se calculó la cantidad de C (en g C L^{-1}) de la muestra, con la lectura de absorbancia medida en las muestras fumigadas y no fumigadas, por referencia a un gráfico de calibración de C de glucosa o de biftalato de K o de ftalato de K $\text{g C L}^{-1} = (\text{Absorbancia}-a)/b$. Siendo: a la ordenada al origen y b, la pendiente.

Luego, se transformó g C L^{-1} a $\text{ug C g de suelo}^{-1}$, siendo $\text{ug C g de suelo}^{-1} = ((\text{g de C L}^{-1}) * 30/7,5) * 1000$, y se calculó el carbono de la biomasa microbiana, siendo $\text{ug CBM g de suelo}^{-1} = \text{Fumigado (ug C g}^{-1}) - \text{No Fumigado (ug C g}^{-1}) / \text{kc}^3$ de 0,35.

En resumen. Para realizar el cálculo del carbono de la biomasa microbiana del suelo con el método fumigación-extracción, se deben seguir los siguientes pasos:

1. Humedecer las muestras con 2,5 ml de agua destilada,
2. Incubar a 30°C durante 15 h (no cerrar herméticamente los tubos),
3. Fumigar tres tubos de cada muestra con 0,4 ml de cloroformo por 30 minutos y tapar herméticamente –los otros tres tubos no se fumigan y se constituyen en blancos sin cloroformo–,
4. Agregar a todos los tubos el extractante: 30 ml de sulfato de potasio 0,5 M,
5. Agitar los tubos acostados y herméticamente cerrados una hora en agitador mecánico,
6. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos, filtrar con papel de filtro banda azul y recoger el extracto en tubos tipo Falcon de 50 ml limpios,
7. Agregar 4 ml del extracto al tubo de digestión previamente rotulado, 1 ml de dicromato de potasio y 4 ml de H_2SO_4 ,
8. Digerir a 140°C en la placa digestora durante 30 minutos,
9. Dejar enfriar y agregar 1 ml de agua destilada a la digestión y homogeneizar,
10. Medir absorbancia en espectrofotómetro a 590 nm,
11. Realizar los cálculos.

3. El factor de corrección kc es tomado de la bibliografía, ya que para suelos del Nordeste argentino aún no se determinó.



Figura N° 7. Digestión del extracto a 140°C por 30 minutos.



Figura N° 8. Extracto luego de la digestión, en el que se observan distintas coloraciones según el contenido de biomasa microbiana.



Figura N° 9. Celda del espectrofotómetro con el extracto a medir.



Figura N° 10. Espectrofotómetro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.P.E. y Domsch, K.H. (1978). «A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils». *Soil Biology and Biochemistry*, 10, 207-213.
- Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo e Interlaboratorio Comisión Biología de Suelos (2012). *Protocolo del Carbono de la biomasa microbiana por fumigación extracción*.
- BAILEY, V.L., Peacock, A.D., Smith, J.L. y Bolton, H. (2002). «Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation-extraction, substrate induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis». *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1385-1389.
- BROOKES, P.C., Landman, A., Pruden, G. y Jenkinson, D.S. (1985). «Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil». *Soil Biology and Biochemistry*, 22, 725-727.
- CARTER, M.R., Gregorich, E.G., Angers, D.A., Beare, M.H., Sparling, G.P., Wardle, D.A. y Voroney, R.P. (1999). «Interpretation of microbial biomass measurements for soil quality assessment in humid temperate regions». *Canadian Journal of Soil Science*, 79, 507-520.
- CHAN, K. y Heenan, D. (1999). «Estabilidad de los agregados del suelo inducida por microbios bajo diferentes rotaciones de cultivos». *Biology and Fertility of Soils*, 30, 29-32. Disponible en <https://bit.ly/3rVRGGe>
- DALAL, R.C. (1998). «Soil microbial biomass. What do the number really mean?». *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38, 645-665.
- GREGORICH, E.G., Carter, M.R., Angers, D.A., Monreal, C.M. y Ellert, B.H. (1994). «Towards a minimum data set to assess soil organic-matter quality in agricultural soils». *Canadian Journal of Soil Science*, 74, 367-385.
- HU, S. y Van Bruggen, A.H.C. (1998). «Efficiencies of chloroform fumigation in soil: effects of physiological states of bacteria». *Soil Biology and Biochemistry*, 30(13), 1841-1844.
- JENKINSON, D.S. (1988). «Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil». En Wilson, J.R. (ed.) *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems* (pp. 368-386). Wallingford, UK: CAB.
- JENKINSON, D.S. y Ladd, J.N. (1981). «Microbial biomass in soil: measurement, and turnover». En Paul, E.A. y Ladd, J.N. (eds.) *Soil Biochemistry* (pp. 415-471). Vol. 5. Nueva York y Basel: Marcel Dekker Inc.
- JENKINSON, D.S. y Powlson, D.S. (1976). «The effects of biocidal treatment on metabolism in soil. V. A method for measuring soil microbial biomass». *Soil Biology and Biochemistry*, 24, 675- 683.

- LYNCH, J.M. y Panting, L.M. (1980). «Cultivation and the soil biomass». *Soil Biology and Biochemistry*, 12, 29-33.
- MERCX, R., Den Hatog, A. y Van Veen, J.A. (1985). «Turnover of root-derived materials and related microbial biomass formation in soils of different texture». *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 565-569.
- PAGE, A.L. (ed.) (1982). *Methods of soil analysis*. Parte 2. Chemical and microbiological properties. Madison, Wisconsin, USA: Agronomy 9, ASA, Soil Science Society of America.
- PAUL, E.A. (1984). «Dynamics of organic matter in soil». *Plant and Soil*, 76, 275-285.
- PAUL, E.A. y Voroney, R.A. (1989). «Field interpretation of microbial biomass activity and measurements». En Kleng, M.J. y Reedy, C.A. (eds.) *Current perspective in microbial ecology*. Washington DC, EE.UU.: American Society for Microbiology.
- PAZ FERREIRO, J. (2006). *Propiedad bioquímica de suelos de Galicia*. Tesis doctoral. España: Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Farmacia, Departamento de Edafología y Química Agrícola. Disponible en <https://bit.ly/3pW3SEp>
- POWLSON, D.S., Brookes, P.C. y Christensen, B.T. (1987). «Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation». *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 159-164.
- POWLSON, D.S. y Jenkinson, D. (1981). «A comparison of the organic matter, biomass, adenosine triphosphate and mineralizable nitrogen content of ploughed and direct drilled soils». *Journal of Agricultural Science*, 97, 713-721.
- SMITH, J.L. y Paul, E.A. (1990). «The significance of soil microbial biomass estimations». En Stotzky, G. y Bollag, J.M. (eds.) *Soil Biochemistry*, 6, 359-396. Dekker, Nueva York.
- SPARLING, g.P. (1992). «Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter». *Australian Journal of Soil Research*, 30, 195-207.
- ____ (1985). «The soil microbial biomass». En Vaughan, D. y Malcolm, R.E. (eds.) *Soil Organic Matter and Biological Activity* (pp. 223-262). Dordrecht, Países Bajos: Springer Science-Business Media Dordrecht.
- TANAKA, S., Funakawa, S., Kaewkhongkha, T. y Yonebayashi, K. (1998). «Labile pool of organic matter and microbial biomass in the surface soils under shifting cultivation in northern Thailand». *Soil Science and Plant Nutrition*, 44, 527-537.
- TOYOTA, K., Ritz, K. y Young, I.M. (1996). «Survival of bacterial and fungal populations following chloroform-fumigation: Effects of soil matrix potential and bulk density». *Soil Biology and Biochemistry*, 28(10), 1545-1547.

- TURCO, R.F., Kennedy, A.C. y Jawson, M.D. (1994). «Microbial indicators of soil quality». En Doran, J.W. y Jones, A.J. (eds.) *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment* (pp. 293-310). Madison, Wiscosin: Soil Science Society of America.
- VAN VEEN, J.A., Ladd, J.N. y Amato, M. (1985). «Turnover of carbon and nitrogen through the microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with ^{14}C glucose and ^{15}N NH_4SO_4 under different moisture regimes». *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 747-756.
- VANCE, E.D., Brookes P.C. y Jenkinson D.S. (1987). «An extraction method for measuring soil microbial biomass C». *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 703-707.
- WARDLE, D.A. (1992). «A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil». *Biological Reviews*, 67, 321-358.
- WEST, A.W., Sparling, G.P., Feltham, C.W. y Reynolds, J. (1992). «Microbial activity and survival in soils dried at different rates». *Australian Journal of Soil Research*, 30, 209-222.