Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. III. Síntesis microbiana de polímeros húmicos y su capacidad de adsorción de Zn(II) y Mg(II)[1]

Biochemistry of soils derived from volcanic ashes. III. Microbial synthesis of humic–type polymers and their adsorption capacity for Zn(II) and Mg(II)

Hugo Zunino V.[2]
María Aguilera S.[2]
Pedro Peirano V.[2]
Mario Caiozzi M.[2]
Astrid Rex[2]

SUMMARY

Streptomyces, penycyllium and *aspergillius* species, able to synthesize humic–type polymers, were isolated from several chilean dystrandepts. The species were grown in a liquid Chopex media, during 15 weeks. After the incubation period, the culture media was filtered and purified repeatedly by dialysis, using a semipermeable membrane (cut–of 12,000). The humic–type polymers were then subjected to Zunino and Martin method to determine their maximum binding ability (MBA) of Zn(II) and Mg(II) ions. MBA for the microbial polymers are of the order of 0.3 atom–μg of Zn(II) and 0.1 atom–μg of Mg(II) per mg of polymer. These data are in agree with previous experimental results given elsewhere, and confirm the hypothesis that microbial polymers play an important role on the physical chemical processes governing translocation, adsorption, and availability of micronutrients to biological systems in the soil.

INTRODUCCION

Es un hecho comprobado que la población microbiana del suelo presenta capacidad de sintetizar macromoléculas orgánicas, de naturaleza húmica, a partir de precursores simples (Martin y Haider, 1971). Algunas especies de hongos y actinomicetes se destacan especialmente en este respecto (Martin y Focht, 1978). Los polímeros sintetizados por los microorganismos son resistentes a la degradación biológica en los suelos y contribuyen, en forma importante, a mantener el pool de humus. Por otra parte, la fracción orgánica del suelo constituye un factor importante que influye en la disponibilidad de nutrientes, especialmente nitrógeno y elementos trazas, para los sistemas biológicos.

Recientemente se ha formulado una hipótesis (Zunino, 1975; Zunino y Martin, 1977) sobre los mecanismos químicos que estarían operando en suelos para movilizar y proteger, de reacciones secundarias de hidrólisis o adsorción, a los elementos trazas esenciales para los sistemas biológicos que se desarrollan en el habitat suelo. Esta hipótesis está basada en la afinidad creciente de éstos elementos por sitios dadores de electrones contenidos en los polímeros orgánicos residentes en el suelo. Así, la disponibilidad de elementos trazas para los sistemas biológicos estaría, en último término, regulada por las afinidades relativas de los iones metálicos por los sitios activos de los polímeros y de los complejantes naturales existentes en la solución del suelo.

[1] Recepción de originales: 15 de julio de 1981.
Investigación financiada por el Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y Cooperación Internacional. U. de Chile.
[2] Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. U. de Chile, Casilla 233, Santiago, Chile.

Para experimentar esta hipótesis de trabajo, se desarrolló una metódica experimental ad–hoc, basada en el equilibrio de diálisis (Zunino y Martin, 1977); posteriormente se consolidó la validez de la hipótesis, aplicando la metódica a polímeros de origen microbiano y a modelos sintetizados en el laboratorio (Zunino y otros, 1979).

La alta actividad biológica de especies de hongos y actinomicetes en suelos chilenos derivados de cenizas volcánicas (Zunino y otros, 1982), hace presumir que los procesos de síntesis microbiana están muy desarrollados en ellos. Consecuentemente, los fenómenos de movilización, adsorción y disponibilidad de elementos trazas en estos suelos estarían en estrecha relación con esa actividad biológica. En esta Parte III de esta serie se estudia la capacidad de síntesis de polímeros orgánicos *in vitro*, por parte de varias especies de *aspergillius* y *penicillium* aislados de estos suelos alofánicos. Los polímeros se aislan y purifican, mediante procesos de diálisis, y se estudian sus propiedades de retención de elementos esenciales, eligiéndose para ello Zn y Mg.

MATERIALES Y METODOS

1. Síntesis microbiana de polímeros de naturaleza húmica

En primer lugar se seleccionó, de una serie de cultivos microbiológicos provenientes de suelos trumaos, todas aquellas colonias que a su alrededor fueron capaces de generar sustancias coloreadas, semejantes a sustancias húmicas. Para ello se usó el método de dilución en placa y el medio Chopex recomendado para estos fines (Martin y Haider, 1971).

Las colonias seleccionadas fueron aisladas, purificadas y en su gran mayoría clasificadas, con excepción de un número reducido de hongos no comunes.

Para obtener los polímeros húmicos en cantidades adecuadas, en un medio Chopex líquido se incubaron las colonias seleccionadas por períodos de 45 a 90 días, hasta la obtención del medio fuertemente coloreado. El polímero húmico se purificó por filtración y luego por diálisis exhaustiva, hasta obtener una solución de polímeros húmicos con un peso molecular mayor de 12.000. Se determinó su concentración por peso seco. Para designar los distintos polímeros se usó el nombre del hongo generador seguido del suelo del cual se obtuvo.

– Medio Chopex:

Extracto de levadura	0,75 g
Peptona	0,75 g
KCL	0,0375 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,075 g
Agua potable	70 cc
Agua destilada	70 cc
KH_2PO_4 ó K_2HPO_4	0,3 g (según los hongos)
Solución estéril de sacarosa (450 g/lt)	10 cc

2. Determinación de capacidad máxima de retención de cationes (CMR).

Para determinar la CMR de los polímeros húmicos obtenidos, se empleó el método de diálisis descrito por Zunino y Martin (1977). La determinación de Zn y Mg se efectuó por absorción atómica, en un espectrofotómetro Perkin Elmer 403.

La metodología experimental empleada en esta investigación permite estudiar las propiedades retentivas de iones metálicos de polímeros en soluciones coloidales. Evidentemente, en los suelos este tipo de polímeros se encuentran formando parte de coloides mixtos arcilla–humus y no en forma de solución coloidal. La sociación arcilla–humus (alofán–humus en suelos volcánicos de naturaleza alofánica) se produce, desde luego, a través de los grupos funcionales activos del polímero que interactúan físico–químicamente con los sitios activos de la superficie inorgánica. Para estudiar directamente los aspectos químicos de la retención de iones metálicos por parte de los polímeros, es necesario primero que nada aislarlos desde el suelo; esto forzosamente altera su composición en lo referente a pesos moleculares, naturaleza y número de sus grupos funcionales (Zunino y otros, 1975). Este grave problema experimental se obvía empleando polímeros húmicos de origen microbiano o bien empleando polímeros modelos obtenidos por síntesis química o enzimática (Zunino y otros, 1979). Estas macromoléculas así obtenidas no presentan las alteraciones estructurales mencionadas y constituyen, en la actualida, una buena alternativa para obtener datos experimentales que sean extrapolables a las situaciones reales en suelos, especialmente en aquéllos de naturaleza alofánica (Tate y Theng, 1980).

RESULTADOS Y DISCUSION

Varias especies de hongos y actinomicetes, aislados de los suelos alofánicos estudiados, presentaron propiedades claras de síntesis de polímeros húmicos. Mediante el cultivo de placa, las especies sintetizadoras de sustancias húmicas se detectaron fácilmente por la aparición de halos de color pardo alrededor de las colonias, como se señalara en la sección anterior. Estas colonias se aislaron, se purificaron y se clasificaron de acuerdo a normas clásicas de taxonomía, Enseguida se cultivaron en un medio Chopex líquido y se determinó el rendimiento de síntesis de polímeros húmicos, de acuerdo al procedimiento descrito. En el Cuadro 1 se resumen los resultados obtenidos.

CUADRO 1. POLIMEROS DE NATURALEZA HUMICA (P.M. >12.000) SINTETIZADOS POR ESPECIES MICROBIANAS AISLADAS DE SUELOS VOLCANICOS

TABLE 1. Humic–type polymers (M.W. >12,000), synthesized by microbial species isolated from volcanic Chilean soils

Suelo	Especie aislada*	Rendimiento de síntesis de polímeros húmicos (mg/lt de medio)
Lastarria	actinomyces	780
Lastarria	streptomyces	940
Lastarria	penicillium	1.010
Osorno	– ?	300
Osorno	penicillium	440
Osorno	aspergillius	135
Victoria	– ?	180
Victoria	– ?	1.040
Collipulli	– ?	503
Purranque	penicillium	710
Licanray	penicillium a	504
Licanray	penicillium b	290
Licanray	penicillium c	155

* Las especies no clasificadas correspondían a especies de hongos no comunes y que exigían un estudio taxonómico más detallado.

a, b, c indican especies diferentes de penicillium. Los polímeros se obtuvieron por cultivo del microorganismo en un medio Chopex líquido.

Estos resultados indican que las especies de *penicillium* resultaron las más comunes entre los microorganismos aislados, productores de material húmico. Los rendimientos de polímeros aislados por diálisis repetidas (de peso molecular mayor de 12.000) se indican en el cuadro y varían desde 155 mg/lt de medio de cultivo, para un *penicillium* del suelo Licanray, hasta 1.040 mg/lt, para un hongo aislado del suelo Victoria.

Se eligieron las soluciones más concentradas de polímeros microbianos para estudiar las propiedades de retención de iones. El Cuadro 2 muestra los niveles de Zn(II) retenidos por esos polímeros y las afinidades relativas ión–polímero. Estos datos experimentales, obtenidos aplicando el método de Zunino y Martin, son analíticamente consistentes y conforman una respuesta hiperbólica clara, al graficar concentración del ión ofrecida versus cantidad de ion retenido por mg de polímero. El cálculo de la capacidad máxima de retención (CMR) y de las energías o afinidades de los enlaces ión–sitio activo producidos, se efectuó aplicando la isoterma de Langmuir, que transforma la hipérbola en una línea recta (Zunino y Martin, 1977ab).

Los valores de CMR obtenidos, para estos polímeros microbianos, son semejantes a los obtenidos en otros trabajos para polímeros modelos, obtenidos por síntesis auto–oxidativa y enzimática (Zunino y otros, 1979; Droguett, 1980); también son semejantes a los

CUADRO 2. RETENCION DE ZN(II) POR POLIMEROS HUMICOS DE ORIGEN MICROBIANO

TABLE 2. Retention of Zn(II) by humic–type polymers of microbial origin

Polímero	Zn(II) retenido, (átomo–μg/mg polímero) x 10^3						CMR* x 10^3	Afinidad relativa (k_2)**
	Concentración de Zn(II) en equilibrio (moles/lt) x 10^4							
	3,06	7,7	15,3	30,6	61,2	153		
Actinomyces Lastarria	45	55	65	75	75	110	114	778
Streptomyces Lastarria	76	137	156	192	227	241	241	840
Penicillium Lastarria	67	83	101	147	180	234	256	540
Penicillium (a) Licanray	319	310	506	617	477	618	620	1.787
Penicillium (b) Licanray	130	160	205	185	229	260	268	1.430
Aspergillius Osorno	70	110	170	210	220	270	276	928
———— Collipulli	80	–	110	120	150	200	223	458
Penicillium Purranque	33	41	87	119	100	147	158	574
———— Victoria	9	14	29	32	38	42	45	818

* CMR : capacidad máxima de retención, expresada en átomo–μg de Zn(II)/mg;

** : calculada mediante la isoterma de Langmuir (Zunino y Martin, 1977b).

obtenidos con polímeros microbianos sintetizados por microorganismos aislados de algunos suelos de Estados Unidos (Zunino y otros, 1979). Los datos del Cuadro 2 indican que los valores de CMR para Zn(II) varían en amplios rangos, desde 0,045 hasta 0,62 átomos–μg de Zn(II)/mg de polímero. Esto indica que los polímeros húmicos producidos por diferentes microorganismos en los suelos presentan características propias, en cuanto a sus propiedades físico–químicas de adsorción de cationes. Así entonces, podemos deducir que el habitat microbiológico de un suelo es un factor determinante de las propiedades de adsorción o retención de elementos nutrientes en suelos. Los elementos más importantes involucrados preferentemente en estos procesos serían los llamados elementos trazas, que pertenecen a la serie de los elementos de transición. Es un hecho químicamente comprobado que la estructura electrónica de ellos facilita la formación de compuestos de coordinación con grupos funcionales o compuestos que posean O, S o N, como átomos dadores de electrones. La materia orgánica de los suelos posee justamente esos átomos y, por lo tanto, ella es fundamental en las reacciones de coordinación (complejación o quelación) de esos metales en el suelo (Zunino, 1975).

La capacidad de retención de Mg(II) de los polímeros microbianos se muestra en el Cuadro 3. En ella se aprecia que los valores de CMR–Mg son similares a los CMR–Zn (Cuadro 2), con algunas excepciones, siendo la más notable el polímero Penicillium (a) Licanray. Esto significa que los grupos activos de coordinación de Zn(II) lo son también para retener Mg(II), aunque probablemente lo efectúen mediante enlaces de naturaleza iónica, en lugar de enlaces coordinados. Los datos del Cuadro 4 indican que los grupos funcionales activos de los polímeros microbianos presentan una alta selectividad para Zn(II) con respecto a Mg(II); los datos de CMR para ambos cationes indican que, aproximadamente, 70–80% de los grupos activos están coordinados con Zn(II), después del equilibrio de diálisis, y el resto está unido a Mg(II). Cabe hacer presente el hecho que, en estos equilibrios competitivos, la composición de las soluciones binarias ofrecidas correspondía a 50% de cada catión.

De los datos anteriormente discutidos, se deduce que cada tipo o serie de suelo presentará una característica propia de retención de metales de transición, definida por su ecología microbiana. La disponibilidad biológica de estos metales, cuyo lecho natural lo constituye el humus, representará la resultante de la interacción de estos factores bióticos y de los abióticos, fundamentalmente composición y propiedades de la fracción arcilla del suelo (Zunino, 1979).

CUADRO 3. RETENCION DE Mg(II) POR POLIMEROS HUMICOS DE ORIGEN MICROBIANO

TABLE 3. Retention of Mg(II) by humic-type polymers of microbial origin

Polímero	Mg(II) retenido, (átomo–μg/mg polímero) x 10^3						CMR* x 10^3	Afinidad relativa (k_2)**
	Concentración de Mg(II) en equilibrio (moles/lt) x 10^4							
	3,56	8,90	17,80	35,6	71,2	178,0		
Actinomyces Lastarria	60	60	70	80	100	120	126	790
Streptomices Lastarria	68	85	106	151	92	268	298	372
Penicillium Lastarria	60	70	92	128	179	243	275	339
Penicillium (a) Licanrray	–	130	180	245	280	317	333	919
Penicillium (b) Licanrray	8	55	95	130	160	180	237	216
Aspergillius Osorno	——— no hay correlación ———							
——— Collipulli	–	9	26	44	49	79	116	129
Penicillium Purranque	23	38	51	66	79	89	96	710
——— Victoria	8	15	26	27	35	36	39	796

*CMR : Capacidad máxima de retención, expresada en átomo–μg de Mg(II)/mg de polímero.

** : Calculada mediante la isoterma de Langmuir (Zunino y Martin, 1977b).

CUADRO 4. COMPETENCIA DE Zn(II) y Mg(II) POR SITIOS ACTIVOS DADORES DE ELECTRONES EN POLIMEROS DE NATURALEZA HUMICA DE ORIGEN MICROBIANO

TABLE 4. Competition of Zn(II) and Mg(II) for active electron releasing sites from humic–type polymers of microbial origin

Polímero	Cantidad de ion retenido* (átomo–μg)/mg de polímero x 10^3						CMR	Afinidad relativa (k_2)
	Concentración total de iones en equilibrio** (moles/lt) x 10^4							
	3,33	8,30	16,55	33,10	66,2	165,5		
	Zn(II)							
Penicillium (a) Licanrray	170	205	245	268	197	272	270	4.414
Penicillium (b) Licanrray	111	140	160	190	170	160	161	20.367
	Mg(II)							
Penicillium (a) Licanray	82	62	82	76	91	76	77	15.394
Penicillium(b) Licanray	50	60	70	90	70	80	80	8.490

* Calculada mediante la aplicación de la isoterma de Langmuir (Zunino y Martin, 1977b).
** Fracción molar de Zn(II): 0,46; fracción molar de Mg(II): 0,54.

RESUMEN

Se aislaron diversas especies de hongos y actinomyces desde suelos derivados de cenizas volcánicas, preferentemente *streptomyces, penicillium* y *aspergillius*. Las especies se aislaron desde las colonias, cultivadas en medio sólido de agar especial, que presentaban una zona de pardeamiento nítido, característicos de la síntesis de sustancias húmicas. Una vez aisladas las especies se cultivaron durante 15 semanas en un medio Chopex líquido. Posteriormente se purificó el caldo de cultivo mediante diálisis repetida, aislándose así las sustancias de peso molecular superior a 12.000 y de naturales húmica. Los polímeros se sometieron al método de Zunino y Martin, determinando su capacidad máxima de retención (CMR) de Zn(II) y Mg(II). Los resultados obtenidos indican que los niveles de CMR son de orden de 0,3 átomo–μg de Zn(II) y 0,1 átomo–μg de Mg(II). Por otra parte, la competencia entre Zn y Mg se vé ampliamente favorecida para el Zn(II). Esto corrobora datos informados con anterioridad y confirma la hipótesis de que los polímeros de origen microbiano participan activamente en los procesos de movilización, retención y bio–disponibilidad de micronutrientes en suelos.

LITERATURA CITADA

DROGUETT, B. 1980. Interacción de Mg(II) y Zn(II) con macromoléculas polifuncionales de estructura húmica. Fac. de Ciencias Químicas y Farmacológicas. U. de Chile. (Tesis mimeografiada)

MARTIN, J.P. and K. HAIDER. 1971. Microbiological activity in relation to soil humus formation. Soil Sci. 111: 54–63.

MARTIN, J.P. and D. FOCHT. 1978. Biological properties of soil. En: Soils for management and utilization of organic waste products. American Society of Agronomy.

TATE, K.R. and B.K.G. THENG. 1980. Organic matter and its interactions with inorganic soil constituents. En: "Soil with variable charge". B.K.G. Theng (ed.). Soil Bureau, Dept. of Sci. and Ind. Res. Lower Hutt. New Zealand Soc.

of Soil Sci.

ZUNINO, H. 1975. Metal–ion binding ability of some polymers synthetized by soil microorganisms and a discussion of their role in the translocation of essential elements from rocks to biological systems. Ph.D. Dissertation, University of California, Riverside.

ZUNINO, H.; P. PEIRANO; M. AGUILERA; and E.B. SCHALSCHA. 1975. Measurement of metal–complexing ability of polyfunctional macromolecules: A discussion of the relationship between the metal–complexing properties of extracted soil organic matter and soil genesis and plant nutrition. Soil Science 119: 210–216.

ZUNINO, H. 1979. Metal–complexing macromolecules. En: The Encyclopedia of Soil Science. Part 1. (ed.) R.W. Fairbridge and C.W. Finkl, Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, Penn. USA. Vol. XII: 286–288.

ZUNINO, H. and J.P. MARTIN. 1977a. Metal–binding organic macromolecules in soil. I. Hypothesis interpreting the role of soil organic matter on the translocation of metal–ions from rocks to biological systems. Soil Sci. 123: 65–76.

ZUNINO, H. and J.P. MARTIN. 1977b. Metal binding organic macromolecules in soil. II. Characterization of maximum binding ability of macromolecules. Soil Sci. 123: 188–202.

ZUNINO, H.; M. AGUILERA; M. CAIOZZI; P. PEIRANO; F. BORIE; and J.P. MARTIN. 1979. Metal–binding organic macromolecules in soil. III. Competition of Mg(II) and Zn (II) for binding sites in humic and fulvic–type model polymers. Soil Sci. 128: 257–266.

ZUNINO, H.; F. BORIE; M. AGUILERA; J.P. MARTIN; and K. HAIDER. 1982. Decomposition of ^{14}C–labeled glucose, plant and microbial products and phenols in volcanic ash–derived soils of Chile. Soil Biol. Biochem. 14: 37–43.