

LOS COMPUESTOS FENOLICOS COMO EFECTORES DE INTENSIDAD Y CAPACIDAD REDOX EN EL SUELO

A PIDELLO

Laboratorio de Química Biológica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario - Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario. Boulevard Ovidio Lagos y Ruta 33 - 2170 Casilda - Santa Fe - Argentina

PHENOLIC COMPOUNDS AS EFFECTORS OF SOIL REDOX INTENSITY AND CAPACITY

The redox state evolution in terms of redox intensity (Eh) and capacity (quantity of electrons that can provide or accept the system) was studied, under hydric saturation conditions, in an Vertic Argiudoll which was supplemented with vanillic, p-hydroxybenzoic and gallic acids (phenolic compounds with the same theoretical reducing power which are part of vegetal matter). During the period studied (168 h) the effect of the compounds employed upon redox state depended on the potential of the microbial community to transform them and to diversify the electron acceptor spectrum. Besides, the results suggest that the presence of an oxidant with high redox potential (e.g. NO_3^-) does not guarantee the prevalence of the metabolic pathway involved in its reduction, and that this behaviour may be highlighted by the presence of compounds with high redox character such as phenol compounds.

Key words: Redox state-Intensity and capacity factors-Redox potential-Phenolic compounds

INTRODUCCION

En la escala de los microorganismos, los suelos son sistemas particularmente dinámicos (Coleman *et al.* 1994). En términos energéticos esto corresponde a un intercambio permanente de electrones entre los componentes bióticos y abióticos. En efecto, la transferencia de electrones es el mecanismo de base para la obtención de energía que utiliza el componente biótico (en este caso microbiano). Este mecanismo involucra a la mayoría de las moléculas inorgánicas y orgánicas del sistema suelo (componente abiótico) (Pelmont 1993), las cuales modifican el estado redox de un ecosistema en términos de factor de intensidad (en función de la ubicación de las mismas dentro de la serie electroquímica) y en términos de factor de capacidad, es decir en función de la cantidad de electrones que pueden proveer o aceptar.

Los compuestos fenólicos intervienen en la composición de la lignina principalmente a través de derivados del ácido benzoico y cinámico. En función del tipo y de la cantidad de grupos funcionales que posean (carbonilos, hidroxilos, metilos), pueden presentar diferencias de poder reductor teórico. Por otra parte, los fenoles cambian de estado de oxidación a través de reacciones en las cuales intervienen electrones y protones y pueden manifestar disociaciones ácido-base en las cuales sólo intercambian protones. Resulta obvio, entonces, que como sustratos dadores de electrones y de carbono en los

procesos microbianos del suelo, pueden presentar un comportamiento bastante amplio, el cual debe ser conocido para comprender los mecanismos reaccionales que involucran al componente biótico.

En este estudio se determinó el efecto de tres derivados del ácido benzoico sobre las condiciones redox del suelo en términos de factor de intensidad redox (potencial redox, Eh) y en términos del factor capacidad.

MATERIALES Y METODOS

Compuestos fenólicos

Se utilizó ácido gálico (AG), vainillínico (AV) y p-hidroxibenzoico (pHB) (Sigma Chemical Co) en una concentración de $0,2 \text{ mg C gr}^{-1}$ suelo. Los compuestos utilizados poseen un poder reductor teórico (Eroshin 1977) de 0,28; 0,33 y 0,33 mEq electrones $\text{gr}^{-1} \text{ C}$.

Suelo

Se utilizó un suelo Argiudol Vértico (serie Peyrano), afectado a prácticas agrícolas, que poseía las siguientes características: 37 % carbono orgánico, 2,3 % nitrógeno total, pH (H_2O , 1:2,5) 6,1 y capacidad de canje catiónico de $21,7 \text{ cmol kg}^{-1}$.

En todos los experimentos el suelo (250 g) se mantuvo en condiciones de saturación a una temperatura constante de 26°C . Los compuestos fenólicos se aportaron al suelo en forma separada y durante 168 h se monitoreó el potencial redox (factor de intensidad redox) y en distintos tiempos (0, 24, 48 y 168 h), se tomaron muestras de suelo para las determinaciones analíticas. Cada tratamiento se repitió tres veces.

Técnicas analíticas

Los cambios en la concentración de los derivados fenólicos aportados fueron determinados por barridos de la absorbancia en UV (220-380 nm) con un espectrofotómetro UV-visible (Metrolab 7000, Rodríguez Corswant, Bernal, Argentina) en la fracción fácilmente hidrolizable del suelo. Esta fracción se obtuvo luego de hidrolizar 1 g de suelo (0,1 M CIH durante 1 h a reflujo) y centrifugar la mezcla a 3000 g (10 minutos).

Con el propósito de determinar si durante la hidrólisis del suelo los fenólos modificaban su absorbancia en el espectro UV (270-290 nm), se estudió el comportamiento de un hidrolizado de fenol puro. Por otra parte, interesaba saber si en las condiciones de nuestro estudio los valores de absorbancia podían estar afectados por otros compuestos presentes en el suelo que tuvieran el mismo comportamiento óptico, por lo cual se comparó el comportamiento de los hidrolizados de pHB con el de los hidrolizados de suelo solo y furfural. La inclusión del furfural se debe a que este compuesto es un producto normal durante la transformación de los sacáridos en medio ácido, por lo cual luego de la hidrólisis de un suelo agrícola su concentración debería ser importante. La Figura 1 muestra que luego del fraccionamiento sobre G25 (Pharmacia), los hidrolizados de pHB, furfural y suelo sin aporte, presentaron una fuerte absorbancia (285 nm) para las mismas fracciones. Se pudo concluir, por lo tanto, que las fracciones de hidrolizados de suelo responsables de la absorbancia en esta longitud de onda contienen este tipo de moléculas. La producción de CO_2 y N_2O fue medida por cromatografía en fase gaseosa (Konik Tech, SA, Barcelona) utilizando una columna de Porapak Q y helio como gas carrier.

Medida de la intensidad redox

El monitoreo del potencial redox (Eh) se realizó con un electrodo de platino combinado ubicado en el suelo a una profundidad de un cm y conectado a un módulo de control y registro (Parsec Instrumentos, Ciudadela, Buenos Aires). El electrodo fue calibrado antes de cada incubación con una solución que contenía 3 mM de ferricianuro de potasio, 3 mM ferrocianuro de potasio y 100 mM de cloruro de potasio (ZoBell 1946). A la fuerza electromotriz (fem) medida se le sumó 242 mV (que correspondían a la fem de la referencia utilizada) para poder

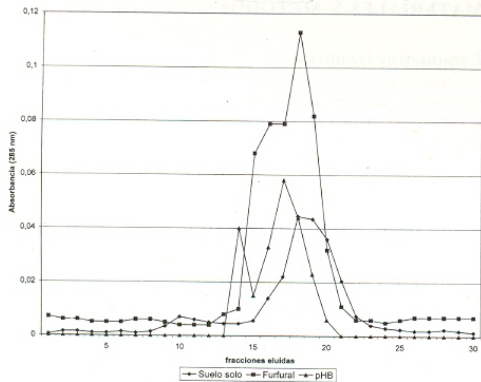


Figura 1. Absorbancia (285 nm) de las fracciones de los hidrolizados de suelo control, ácido p-hidroxibenzoico (pHB) y furfural, separadas por Sephadex G25. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

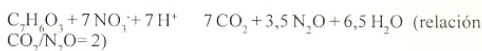
expresarla como Eh.

Medida de la capacidad redox

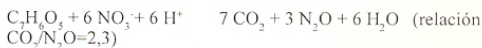
El factor capacidad se determinó a través de la cantidad de electrones equivalentes (Yu 1985) y a través de la producción de CO_2 (Kludze, Delaune 1995). Los equivalentes reductores (electrones equivalentes g^{-1} suelo) se determinaron por oxidación con un exceso de dicromato de potasio y posterior titulación con sulfato ferroso (Jackson 1958) aplicando el cálculo utilizado por Harris y Adams (1979):

Si se asume que la medida de la producción de CO_2 refleja la cantidad de electrones transferidos cuando se oxida el carbono orgánico, y que estos electrones serán utilizados en la reducción de los compuestos oxidados que posean potenciales redox más positivos, la estequiometría de las reacciones redox donde los compuestos estudiados actúan como dadores de electrones y el nitrato como único aceptor de electrones puede escribirse:

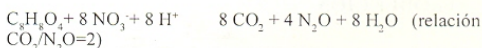
pHB



AG



AV



En este trabajo se determinó la capacidad redox del sistema a partir de la producción de CO_2 (capacidad de proveer electrones) y se utilizó la relación $\text{CO}_2/\text{N}_2\text{O}$ para comparar el comportamiento de los sistemas suplementados respecto a su aptitud para generar aceptores de electrones (Pidello *et al.* 1996).

Análisis estadístico

Los datos fueron evaluados estadísticamente mediante el análisis de la varianza y test de Tukey para comparación entre medias (Pimentel Gómez 1978).

RESULTADOS Y DISCUSION

Evolución del Eh y de la cantidad de equivalentes reductores en el suelo

La Figura 2A muestra que 48 h después del aporte de los compuestos fenólicos en el suelo, en condiciones de 100 % de humedad, se produjo un rápido descenso del Eh, y que el mismo no fue tan marcado como el que experimentó el suelo control. Nosotros observamos que en este mismo suelo una suplementación sacarídica de casi idéntico poder reductor teórico ($0,33 \text{ mEq g}^{-1} \text{ C}$) generó un descenso del Eh significativamente más importante que el que experimentaba el suelo control (Pidello *et al.* 1996). Durante un período importante de tiempo, entonces, el suelo enriquecido con fenólos presentó un estado de óxido-reducción elevado, en términos de factor de intensidad, en relación con el comportamiento normal de este suelo luego de ser humectado.

Por otra parte, estos suelos presentaron valores de equivalentes reductores bastante próximos a los observados en el suelo control (4,27 equiv. electrones g^{-1} suelo) y los valores observados no estuvieron relacionados con los potenciales redox que presentaba el suelo en ese momento (Figura 2B). Estos resultados sugieren que la evolución del factor capacidad, en términos de electrones equivalentes parece depender más de las transformaciones que experimentan los compuestos agregados que de su poder reductor teórico y que en este caso no existió una relación con el factor de intensidad (Eh) como lo prevee la relación clásica de Nernst (Segel 1976).

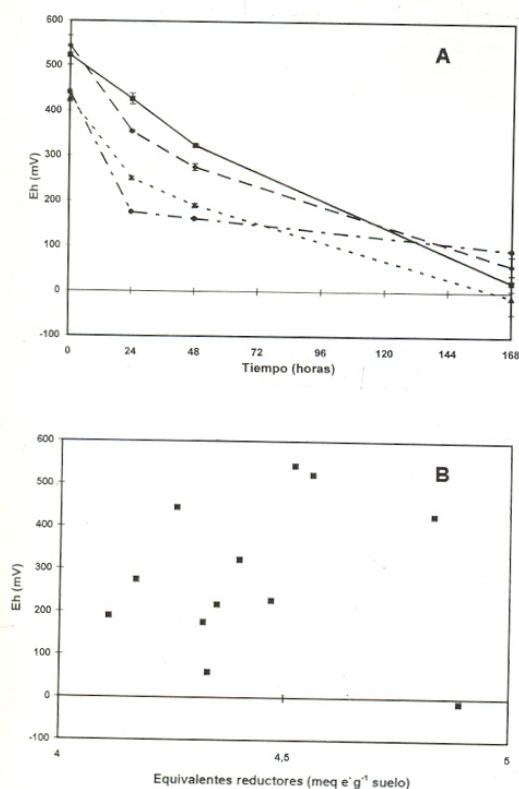


Figura 2. (A) Variaciones del potencial redox (Eh) en el suelo suplementado con los ácidos p-hidroxibenzoico (pHB) (■—), gálico (AG) (◆—), vainillínico (AV) (▲---) y control (●---). Cada valor es el promedio de tres experimentos. Las barras representan los valores de error estándar. (B) Relación entre el potencial redox (Eh) y los equivalentes reductores en el suelo.

Los fenoles como efectores de capacidad redox

Los tres compuestos fenólicos estudiados aumentaron la producción de CO_2 en suelo a partir del momento en que fueron aportados y durante todo el período analizado. El AV y el AG aumentaron la producción de N_2O respecto al suelo control en todos los tiempos estudiados, mientras que en presencia de pHB fue inferior, igual o marcadamente superior que la observada en el suelo control (Figura 3A-B).

Los hidrolizados de suelo en presencia de los fenoles estudiados presentaron un aumento de absorción respecto al suelo control en toda la zona del espectro UV (230-380 nm). Este hecho probablemente enmascaró el pico característico de los fenoles e impidió que los cambios en la concentración de AV y AG pudieran determinarse por este método. Por otra parte, debe destacarse el hecho que, si bien los valores de absorbancia

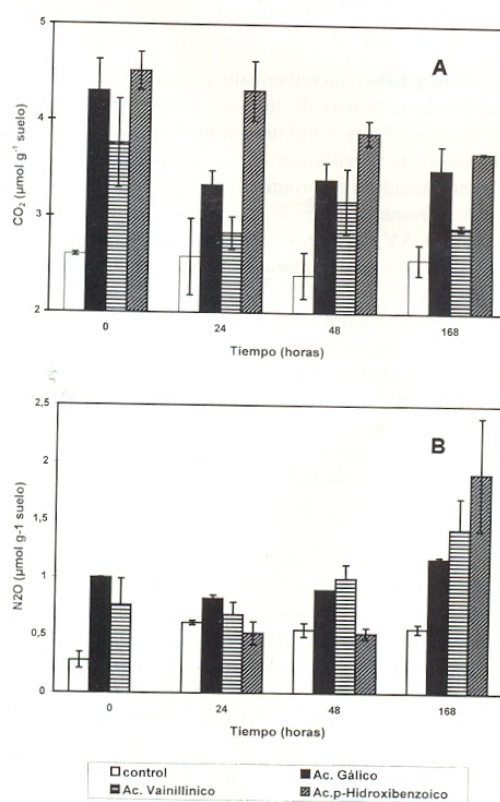


Figura 3. Producción durante 24 h de CO_2 (A) y N_2O (B) en el suelo control y suelo suplementado con fenoles. Las barras representan los valores de error estándar.

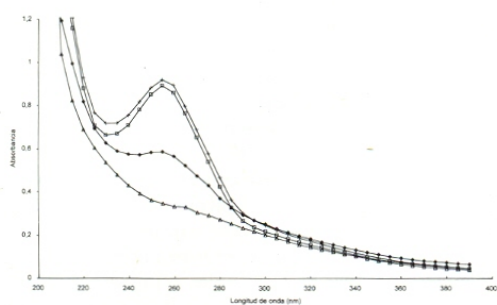


Figura 4. Absorbancia en el espectro UV del hidrolizado del suelo suplementado con ácido p-hidroxibenzoico (pHB) en los distintos tiempos dentro del periodo analizado (0h □, 24h +, 48h ◆, 168h △).

se pueden haber incrementado por la transformación durante la hidrólisis de los sacáridos del suelo, este efecto no se observó en el suelo control, lo que indica que el proceso de transformación de los materiales nativos fue modificado al incorporar los compuestos fenólicos.

A diferencia de los casos de la suplementación con AG y con AV, los hidrolizados del suelo suplementado con pHB presentaron claramente el pico característico de los fenoles, lo que permitió estudiar su evolución en el tiempo. La Figura 4 muestra claramente que el compuesto comenzó a ser degradado recién después de 48 h de ser incorporado. Este hecho descarta la posibilidad de que el pHB haya sido utilizado rápidamente por la biomasa (como fuente de carbono o de electrones), lo que no coincide con la producción de CO_2 observada, la cual fue superior, en todos los tiempos analizados, a la que presentaron los suelos suplementados con AG y AV.

Los resultados sugieren que los compuestos estudiados tuvieron dos tipos de comportamiento: por un lado el AG y AV, cuyo aporte significó un aumento de la capacidad del sistema para reducir al NO_3^- (aumento de la capacidad redox), hecho que se tradujo en un aumento de la producción de CO_2 y N_2O durante todo el período estudiado (168 h); y por otro lado el pHB que también incrementó la producción de CO_2 durante ese período, pero deprimió inicialmente (al menos durante 48 h) la producción de N_2O .

Si se analiza el comportamiento del pHB en términos de la evolución del cociente $\text{CO}_2/\text{N}_2\text{O}$ durante las primeras 48 h después de la suplementación (Figura 5), se observa que el mismo presentó valores fuertemente

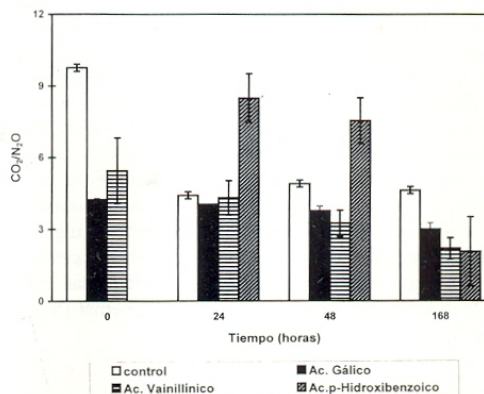


Figura 5. Evolución de la relación $\text{CO}_2/\text{N}_2\text{O}$ en el tiempo y en los diferentes tratamientos. No se incluye el valor correspondiente a la suplementación con el ácido p-hidroxibenzoico (pHB) en el tiempo 0 donde el N_2O producido se encontraba en el límite de la detección. Las barras representan los valores de error estándar.

superiores a los valores teóricos y a los que presentaron los sistemas controles o con aporte de AV y AG (que también fueron mayores a los teóricos). Este hecho indica, por una parte, la existencia de una expresión simultánea (pero con intensidades diferentes) de la reducción del nitrato y de otros procesos de reducción al suplementar el suelo con este tipo de compuestos carbonados. Por otra parte, los resultados diferencian claramente el comportamiento del pHB de los otros dos fenoles, y muestran que la presencia de pHB estuvo asociada con la existencia de una fuerte concentración de aceptores de e^- diferentes del NO_3^- .

Esta diferencia en el comportamiento, sólo puede ser explicada si se asume que el pHB, contrariamente al AV y del AG, actuó principalmente como aceptor y no como dador de electrones. Apoya esta interpretación el hecho que el compuesto impuso valores de Eh bastante más elevados que los que se observaron con los otros dos fenoles (lo que permite suponer que la concentración de la forma oxidada con respecto a la reducida puede haber sido mayor) (Figura 2A); sólo cuando fue degradado (tiempo 168h) se observó un importante aumento en la producción de N_2O .

Estos resultados muestran, que en función del compuesto aportado (aunque posean similar poder reductor teórico) el funcionamiento de la comunidad microbiana generó situaciones redox diferentes.

Los resultados sugieren, por otra parte, que cuando se aumenta significativamente la capacidad reductora del suelo, la presencia de un aceptor de electrones con un potencial elevado (en este caso el NO_3^-) aún en concen-

traciones importantes, no garantiza que los electrones sean transferidos direccionalmente hacia este oxidante.

La evolución del sistema va a depender, entonces, de su diversidad en términos de aceptores de electrones, lo que en definitiva depende de la potencialidad del componente biótico para generarlos. Este mecanismo puede estar acentuado por la aparición de compuestos con un fuerte carácter redox, como lo son los fenoles o sus derivados.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a LT Menéndez su valiosa participación en este trabajo.

REFERENCIAS

- Coleman DD. 1994. Compositional analysis of microbial communities: is there room in the middle. En: Beyond the Biomass. Ed. K Ritz, J Dighton and KE Giller. Wiley-Sayce Publication
- Eroshin VK. 1977. Material-energetic balance of micro-organism growth. *Process. Biochem* 12:29-31
- Jackson ML. 1958. Soil chemical analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ
- Kludze HK, DeLaune RD. 1995. Wetland response to redox intensity and capacity. *Soil Sci Soc Am J* 59:939-945
- Harris RF, Adams SS. 1979. Determination of the carbon-bound electron composition of microbial cells and metabolites by dichromate oxidation. *Appl Environ Microbiol* 37:237-243
- Pelmont J. 1993. Bacteries et Environnement. Presses Universitaires de Grenoble. Grenoble. 899 p
- Pidello A, Menéndez L, Perotti ABR. 1996. Saccharidic compounds as soil redox effectors and their influence on potential N₂O production. *Biol Fertil Soils* 23:173-176
- Pimentel Gómez F. 1978. Curso de estadística experimental. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. pp 323
- Segel I. 1976. Biochemical calculations, 2nd. edn. John Wiley and Sons New York. pp 389.
- Yu Tian-ren (Ed). 1985. Physical chemistry of paddy soils. Science Press. Beijing. pp 217.
- ZoBell CE. 1946. Studies on the redox potential of marine sediments. *Bull Am Assoc Pet Geol* 30:477-513