

Estequiometria O/C da Oxidação Biológica de Substâncias Húmicas Aquáticas

Irineu Bianchini Júnior e Marcela Bianchessi da Cunha-Santino

1. Introdução

As principais formas orgânicas presentes nos sedimentos dos ambientes aquáticos podem ser representadas pelos organismos vivos, detritos de origem animal e vegetal, polímeros naturais como os carboidratos e lipídios e substâncias húmicas (SH).¹ As SH aquáticas provêm da degradação da matéria orgânica dos solos adjacentes aos corpos d'água, representando, assim, uma das fontes alóctones dessas substâncias ou da decomposição da vegetação aquática (e.g. macrófitas e algas), constituindo a fonte autóctone.²

As SH são amorfas, com massa molecular variando de 2.000 a 300.000 g mol⁻¹. São constituídas por diversos grupos funcionais, como, por exemplo, carboxilas e carbonilas.³ Os ácidos formadores das SH são os húmicos (AH) e fúlvicos (AF). Esses compostos apresentam diferenças em relação à aromaticidade, massa molecular e predomínio de grupos funcionais; dessa forma, vários modelos estruturais têm sido propostos.⁴

Em virtude da complexidade estrutural das moléculas, as SH, em geral, são bastante resistentes à decomposição.⁵ A refratabilidade das SH em relação à degradação microbiana faz com que, nos ambientes aquáticos, sua mineralização (conversão biológica das SH em compostos inorgânicos, e.g. CO₂ e H₂O) dependa: i) da habilidade enzimática dos microrganismos heterotróficos⁶; ii) da proporção de frações reativas nas moléculas de SH; iii) da disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio; iv) da temperatura.⁷ A humificação e a mineralização das SH dependem das características predominantes do recurso, ou seja, da composição química e do tipo de estrutura vegetal.⁸

Em ambientes anaeróbios, os AH são utilizados como aceptores de elétrons por uma variedade de bactérias.^{9,10} Em condições oxidantes, perdas de massa das SH também foram observadas.⁷ A elucidação dos mecanismos de transformação e degradação biológica das SH é crucial para o entendimento da dinâmica global do carbono nos ambientes aquáticos.³ Nesse contexto, este estudo teve por objetivo avaliar o consumo de oxigênio decorrente da

mineralização aeróbia de AH e AF, assim como o carbono mineralizado nesse processo. Visou, também, verificar as diferenças entre as relações estequiométricas O/C das mineralizações aeróbias de ácidos fúlvicos (AF) e húmicos (AH), provenientes da decomposição de uma macrófita aquática (*Oxycaryum cubense*) e extraídos em diferentes tempos de humificação (10 e 60 dias).

2. Metodologia

2.1 Descrição da área de estudo

A lagoa do Infernã, situada a 21° 35' S e 47° 51' W, possui cerca de 1 km de comprimento e profundidade máxima de 4 m. Pertence ao sistema de lagoas marginais da planície de inundação do rio Mogi-Guaçu, situado na região central do Estado de São Paulo. É uma das 15 lagoas que recebem proteção oficial da Estação Ecológica de Jataí (21° 33' a 21° 37' S e 47° 45' a 47° a 51' W). Une-se ao rio apenas nos períodos de cheia e apresenta, atualmente, a totalidade de sua superfície ocupada por vegetação aquática. Sua região litorânea é dominada, em geral, por macrófitas.¹¹

2.2 Descrição da macrófita *Oxycaryum cubense*

É uma Cyperaceae com ampla ocorrência na América tropical e na África.¹² No Brasil está amplamente distribuída, e.g., reservatórios do rio Tocantins, nos lagos do médio Amazonas, no Pantanal Mato-Grossense e em várias regiões do Estado de São Paulo.¹³ É uma espécie perene que pode se encontrar fixa ao sedimento ou a um substrato flutuante. Na lagoa do Infernã, essa espécie predomina e forma um denso tapete flutuante.¹⁴

2.3 Experimentos de mineralização e modelagem matemática

Exemplares adultos da macrófitas aquática *Oxycaryum cubense* (Poepp. & Kunth) Palla foram coletados na região litorânea da lagoa do Infernã. Também foram coletadas amostras de água da lagoa em três profundidades distintas (superfície, meio e fundo), com auxílio de uma garrafa de *Van Dorn*. Após a coleta, em laboratório, as plantas foram limpas, secas (até massa constante) e adicionadas em câmaras de decomposição contendo água da lagoa previamente filtrada em lâ de vidro (proporção: 10 g de planta seca por litro de água).

Após 10 e 60 dias de incubação, as SH a serem utilizadas nos experimentos de mineralização foram extraídas da fração dissolvida das câmaras de decomposição. Na sequência, os AH e AF foram isolados a partir dos procedimentos analíticos que se baseiam em diferenças de solubilidade em meio ácido e alcalino¹⁵ e tiveram seus teores de carbono orgânico determina-

dos em analisador específico (marca Shimadzu TOC analyser, modelo 5000A). As câmaras de mineralização foram preparadas adicionando cerca de 30 mg C (AF ou AH) por litro de amostra de água da lagoa (previamente filtrada). Após preparadas, as soluções foram aeradas até que a concentração de oxigênio dissolvido (OD) fosse próxima a de saturação (ca. 8,05 mg L⁻¹). Durante o experimento, os frascos foram mantidos a 21,0 ± 0,6°C. Durante 40 dias foram registradas, periodicamente, as concentrações de oxigênio dissolvido (OD) por polarografia (oxímetro marca YSI, modelo 58; precisão: 0,03 mg L⁻¹). Sempre que as concentrações de OD foram iguais ou menores que 2,0 mg L⁻¹, as soluções foram aeradas novamente.

Paralelamente, as concentrações de carbono mineralizado (CM) foram analisadas pela diferença do carbono orgânico dissolvido remanescente e o carbono orgânico inicial das câmaras de mineralização. Durante a mineralização aeróbia, admitiu-se que os consumos de OD corresponderam à formação de CO₂ decorrente da mineralização aeróbia dos AF e AH.¹⁶ Os coeficientes de desoxigenação (k_d) e as quantidades máximas de oxigênio consumido (OC_{max}) foram obtidos dos ajustes cinéticos dos resultados experimentais de OD acumulado no tempo ao modelo matemático (1ª ordem) proposto por Peret & Bianchini Jr. (2004)¹⁷; Equação 5. Os ajustes cinéticos foram efetuados por regressões não lineares, calculadas por meio da utilização de algoritmo iterativo.¹⁸

Modelo para descrição da cinética de consumo de OD (Equações 1 a 5):

$$\frac{dL_t}{dt} = -k_d L_t \quad (1)$$

Rearranjando a Equação 1 e integrando resulta:

$$L_t = L_0 \times e^{-k_d t} \quad (2)$$

$$OC = L_0 - L_t \quad (3)$$

$$OC = L_0 - L_0 \times e^{-k_d t} \quad (4)$$

$$OC = OC_{max} \times (1 - e^{-k_d t}) \quad (5)$$

em que: L_t = consumo de oxigênio no tempo t (mg L⁻¹); k_d = coeficiente de desoxigenação (d⁻¹); OC = oxigênio consumido (mg g⁻¹ C); OC_{max} = consumo máximo de oxigênio (mg g⁻¹ C); t = tempo (dia).

As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por ANOVA de medidas repetidas. As relações estequiométricas O/C foram calculadas por meio das relações entre as taxas diárias de oxigênio consumido ($d[OC]/dt$) e carbono mineralizado ($d[CM]/dt$).

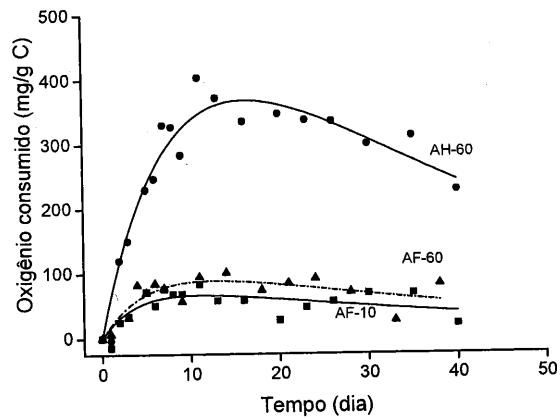
3. Resultados e Discussões

As SH derivadas das macrófitas aquáticas são recursos heterogêneos,¹⁹ constituídos por frações mais ou menos resistentes ao catabolismo microbiano. Durante a degradação aeróbia das SH, essas frações geraram demandas de OD de curto, médio e longo prazo, dependendo da refratibilidade de suas frações. Os consumos de OD foram similares aos registrados em estudo que avaliou a mineralização aeróbia de AH e AF derivados de *Oxycaryum cubense*, *Cabomba piauhyensis*, sedimento e matéria orgânica dissolvida (MOD) da lagoa do Infernã.¹⁶

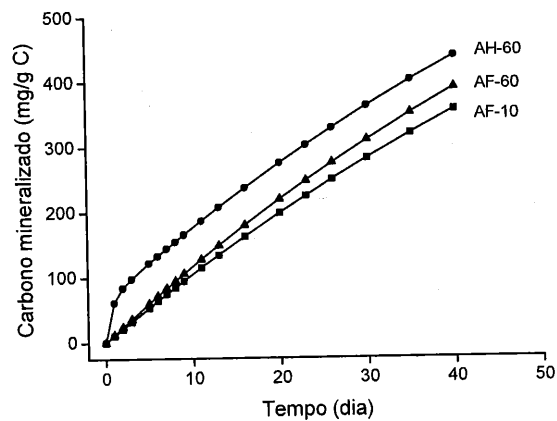
Observou-se tendência mais acentuada de consumo de OD desde o início da mineralização até o 15º dia. Após esse período, observaram-se decréscimos graduais com tendência à estabilização nas fases finais. As cinéticas do consumo de OD, decorrentes das mineralizações aeróbias, são apresentadas na Figura 1A. Os valores dos consumos de OD dos AF e AH tiveram neutralizados os efeitos das mineralizações das amostras de água da lagoa do Infernã em que AF e AH foram adicionados (i.e. controle: câmaras de mineralização sem adição de AF ou AH).

Pela heterogeneidade dos AH e AF, os consumos registrados no início decorreram das oxidações das frações lábeis que, normalmente, geram demandas elevadas de oxigênio. De acordo com experimento enzimático de degradação de polímero²⁰, essas frações são compostas por agrupamentos alifáticos (e.g. C-O, C-H) que são mais fáceis de ser degradados. Nesse contexto, as reduções nos consumos de OD relacionaram-se às mineralizações das frações refratárias, compostas, por exemplo, por anéis aromáticos das moléculas de AF e AH, ligados por grupos -CHO- e -CN.

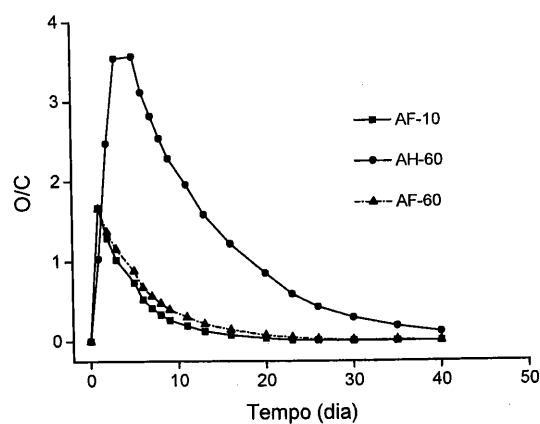
Os parâmetros OC_{max} e k_d do modelo matemático proposto para as descrições das mineralização aeróbias dos AH e AF (Equação 5) são apresentados na Tabela 1. Também estão elencados os parâmetros cinéticos obtidos de um estudo similar de mineralização de AF e AH originados de outros recursos orgânicos (matéria orgânica dissolvida, sedimento e *Cabomba piauhyensis*) da lagoa do Infernã.¹⁶



A



B



C

Figura 1 (A) Oxigênio consumido, (B) carbono mineralizado e (C) relações estequiométricas O/C durante a mineralização de AF e AH extraídos em diferentes tempos de humificação. Fonte: Irineu Bianchini Jr.

Tabela 1 Quantidade máxima de oxigênio consumido (OC_{max}) e coeficiente de desoxigenação (k_d) da mineralização aeróbia de AF e AH de diversas fontes da lagoa do Infernã. Os dias referem-se ao tempo de humificação.

Fonte: Irineu Bianchini Jr.

Substrato	OC_{max} (mg g ⁻¹ C)	k_d (dia ⁻¹)
AF-10 (<i>Oxycaryum cubense</i>): 10 dias	83,7	0,24
AF-60 (<i>Oxycaryum cubense</i>): 60 dias	116,5	0,12
AH-60 (<i>Oxycaryum cubense</i>): 60 dias	565,7	0,19
AF-120 (<i>Oxycaryum cubense</i>): 120 dias ¹	484,8	0,28
AF sedimento ¹	1124,2	0,13
AF matéria orgânica dissolvida ¹	278,3	0,29
AF-120 (<i>Cabomba piauhyensis</i>): 120 dias ¹	567,4	0,12
AH sedimento ¹	142,1	0,25
AH-120 (<i>Oxycaryum cubense</i>): 120 dias ¹	141,1	0,17

1. Segundo Cunha-Santino e Bianchini Jr (2004).¹⁶

O consumo mais elevado de OD (ca. 5,6 vezes maior; $p < 0,0001$) foi observado na mineralização de AH-60 (OC_{max} : 565,7 mg g⁻¹ C) em comparação com a de AF-10 (OC_{max} : 83,7 mg g⁻¹ C) e de AF-60 (OC_{max} : 116,5 mg g⁻¹ C; Tabela 1). Os k_d (Tabela 1) apresentaram a mesma ordem de grandeza ($p = 0,756$). Esses coeficientes aludem processos com tempo médio de meia-vida de quatro dias.

A análise dos consumos máximos de OD e k_d (Tabela 1) mostrou variação elevada dos valores de OC_{max} (de 83,7 a 1124,2 mg g⁻¹ C), definindo uma amplitude de 13,4 vezes no consumo de OD e de 2,4 vezes para k_d (variação: 0,12 a 0,29 dia⁻¹). Independente dos substratos (AF ou AH), da origem do recurso e do tempo de humificação, as magnitudes das variações indicam que, basicamente, os parâmetros OC_{max} e k_d estão vinculados com as características moleculares das SH.

Independente do tipo de recurso (AF ou AH), os consumos de carbono apresentaram tendência de aumento durante todo o período experimental (Figura 1B). À medida que houve a mineralização aeróbia dos AF e AH, os valores de CM foram sendo incrementados. Esses resultados sugerem que os acúmulos iniciais de CM referem-se à degradação das frações lábeis e com o decorrer do tempo ocorreu predomínio gradual das frações refratárias, representados por compostos aromáticos de degradação mais lenta.²⁰

As variações temporais dos coeficientes estequiométricos (O/C) ocorridas durante a mineralização aeróbia de AH e AF são apresentadas na Figura 1C. Verificou-se, na fase inicial, o predomínio de coeficientes

estequiométricos com valores elevados. As relações estequiometrias O/C foram maiores para a mineralização de HA-60 (3,56), seguida da mineralização de AF (FA-10: 1,67; FA-60: 1,66). Assim, no início da mineralização, o consumo tendeu a ser elevado e, em seguida, observou-se redução gradual e contínua nos coeficientes estequiométricos (Figura 1C). Se tomada por referência a relação estequiométrica teórica (i.e., $O/C = 2,66^{21}$), constata-se que, predominantemente, os valores experimentais obtidos foram menores. Esse fato decorre das reações competitivas entre a mineralização (catabolismo) e anabolismo (i.e. aquisição do carbono para manutenção e aumento da biomassa microbiana).

Experimentos de mineralização aeróbia de recursos diferentes das SH (cascas, galhos, folhas e serapilheira) apresentaram o mesmo padrão de variação temporal de O/C que os verificados (Figura 1C). Foram observados aumentos dos valores nas fases iniciais da mineralização seguidos de diminuições.^{22,23}

As variações dos coeficientes estequiométricos provavelmente estiveram relacionadas com a oxidação de frações lábeis, apresentando relações O/C mais elevadas, e com a composição química dos AF e AH. Ressalta-se que a densidade e a diversidade microbiana da comunidade decompositora podem representar um fator direto na mineralização²⁴, alterando os coeficientes estequiométricos. Dessa forma, considerando que esses recursos sejam heterogêneos²⁵, presumiu-se que a oxidação da fração lábil predominou no início, produzindo demandas elevadas de OD. Estudos da composição química das substâncias húmicas mostram que o N faz parte da estrutura molecular²⁶; assim, durante a mineralização aeróbia desses recursos, a nitrificação e outros processos de oxidação não diretamente relacionados com a mineralização do carbono também podem ter contribuído para o consumo de OD.

As diminuições nas taxas de consumo de OD e as mudanças na amplitude da estequiometria O/C relacionaram-se com a mineralização das frações refratárias dos AF e AH. Outros fatores, como a hidroxilação de compostos aromáticos orgânicos²⁷ e reações químicas e bioquímicas que formam peróxido de hidrogênio,²⁸ também podem afetar o balanço das relações estequiométricas.

4. Conclusões

Não houve diferenças significativas nos OC_{max} nas mineralizações aeróbias dos AF, independentemente do estágio de humificação (10 e 60 dias). Entretanto, as mineralizações entre os AF e AH foram significativamente diferentes. Embora essas substâncias apresentem caráter refratário, os coeficientes de desoxigenação obtidos permitiram concluir que as mineralizações aeróbias dos AF e AH interferem no balanço global de oxigê-

nio da lagoa do Infernã. Essas interferências foram também verificadas nas relações O/C: a estequiometria O/C mostrou demanda acentuada de OD nos primeiros estágios da mineralização de AH e AF, caracterizando-se, sistemicamente, como processo de curto prazo que atua como fonte de carbono inorgânico para os ecossistemas aquáticos. Em relação ao tipo de substâncias húmica, a ciclagem dos AH tem potencial de interferir mais (ca. 5,6) no balanço de OD da lagoa do Infernã que a dos AF.

Agradecimentos – Os autores agradecem à FAPESP pelos auxílios à pesquisa (Processos nº 95/0119-8 e 2007/08602-9).

Referências Bibliográficas

1. REUTHER, R. Trace metal speciation in aquatic sediments: methods, benefits and limitations. In: MUDROCH, A., AZCUE, J.M., MUDROCH P. (Ed.). **Manual of bioassessment of aquatic sediment quality**. Boca Raton: Lewis Publishers; 1999. p. 1-54.
2. McKNIGHT, D. M.; ANDREWS, E. D.; SPAULDING, S. A.; AIKEN, G. R. Aquatic fulvic acids in algal-rich Antarctic ponds. **Limnology Oceanography**, v. 39, n. 8, p. 1972-1979, 1994.
3. GADEL, F.; BRUCHET, A. Application of pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry to the characterization of humic substances resulting from decay of aquatic plants in sediments and waters. **Water Research**, v. 21, n. 10, p. 1195-1206, 1987.
4. COOK, R. L.; LANGFORD, C. H. Structural characterization of a fulvic acid and a humic acid using solid-state ramp-CP-MAS ¹³C nuclear magnetic resonance. **Environmental Science Technology**, v. 32, n. 5, p. 719-725, 1998.
5. BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 716 p.
6. GRINHUT, T.; HERTKORN, N.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; HADAR, Y.; CHEN Y. Mechanisms of humic acids degradation by white rot fungi explored using H NMR spectroscopy and FTICR mass spectrometry. **Environmental Science Technology**, v. 45, p. 2748-2754, 2011.
7. CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI Jr., I. Humic substances cycling in a tropical oxbow lagoon (São Paulo, Brazil). **Organic Geochemistry**, v. 39, n. 2, p. 157-166, 2008.
8. ABAKUMOV, E.V.; CAJTHAML, T.; BRUS, J.; FROUZ J. Humus accumulation, humification, and humic acid composition in soils of two post-mining chronosequences after coal mining. **Journal of Soils Sediments**, v. 13, p. 491-500, 2012.
9. BRADLEY, P.M.; CHAPELLE, F.H.; LOVLEY, D.R. Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 3102-3105, 1998.
10. KAPPLER, A.; BENZ, M.; SCHINK, B.; BRUNE, A. Electron shuttling via humic acids in microbial iron(III) reduction in a freshwater sediment. **FEMS Microbiology Ecology**, p. 47, n. 1, p. 85-92, 2004.
11. MOZETO, A. A.; ESTEVES F. A. Ecologia de lagoas marginais. **Ciência Hoje**, v. 5, p. 73, 1986.
12. HOEHNE F.C. **Plantas Aquáticas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1979. 168 p.
13. POTT, V. P.; POTT A. **Plantas aquáticas do pantanal**. Brasília: Embrapa; 2000. 15 p.

14. CARLOS, Viviane Moschini. **Aspectos ecológicos da associação vegetal de *Scirpus cubensis* na Lagoa do Infernã - SP.** 1991. 132 f. Dissertação (Mestrado e, Ecologia e Recursos Naturais) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1991.
15. THURMAN E. M. **Organic geochemistry of natural waters.** Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. 497 p.
16. CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI Jr., I. Oxygen uptake during mineralization of humic substances from Infernã Lagoon (São Paulo, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 3, p. 583-590, 2004.
17. PERET, A. M.; BIANCHINI Jr. I. Stoichiometry of aerobic mineralization (O/C) of aquatic macrophytes leachate from a tropical lagoon (São Paulo - Brazil). **Hydrobiologia**, p. 528, n. 1-3, p. 167-178, 2004.
18. PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T.; FLANNERY, B. P. **Numerical recipes in C: the art of scientific computing.** New York: Cambridge University Press, 1993. 965 p.
19. CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI Jr., I. Humic substance mineralisation from a tropical oxbow lake (São Paulo, Brazil). **Hydrobiologia**, v. 236, p. 34-44, 2002.
20. SHAH, A. A.; EGUCHI, T.; MAYUMI, D.; KATO, S.; SHINTANI, N.; KAMINI, N. R.; NAKAJIMA-KAMBLE, T. Degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic co-polyesters by depolymerases from Roseateles depolymerans strain TB-87 and analysis of degradation products by LC-MS. **Polymer Degradation Stability**, v. 98, n. 12, p. 2722-2729, 2013.
21. DAVIS, M. L.; CORNWELL, D.A. **Introduction to Environmental Engineering.** Singapore: McGraw-Hill, 2008. 1056 p.
22. CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI Jr., I. Estequiometria da decomposição aeróbia de galhos, cascas serapilheira e folhas. In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; MAUAD, F. F.; SCHALCH, W.; ROCHA, O.; FELICIDADE, N.; RIETZLER A. C, eds. **Recursos hidroenergéticos: usos, impactos e planejamento integrado.** São Carlos: RiMa Editora, 2002. p. 43-56.
23. CUNHA-SANTINO, M. B.; PACOBAHYBA, L. D.; BIANCHINI Jr., I. Decomposition of aquatic macrophytes from Cantá stream (Roraima, Brazil): kinetics approach. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 22, n. 2, p. 237-246, 2010.
24. PARK, H. J.; CHAE, N.; SUL, W. J.; LEE, B.Y.; LEE, Y. K.; KIM D. Temporal changes in soil bacterial diversity and humic substances degradation in subarctic tundra soil. **Soil Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 668-675, 2015.
25. CHEN, H. L.; ZHOU, J.M.; XIAO, B.H. Characterization of dissolved organic matter derived from rice straw at different stages of decay. **Journal of Soils Sediments**, v. 10, p. 915-922, 2010.
26. SILVA, A. C.; HORÁK, I.; VIDAL-TORRADO, P.; CORTIZAS A. M.; RACEDO J. R.; CAMPOS. J. R. R. Turfeiras da Serra do Espinhaço Meridional - MG: II - influência da drenagem na composição elementar e substâncias húmicas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 33, n. 5, p. 1399-1408, 2009.
27. DAGLEY, S. Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. **Advances in Microbiol Physiology**, v. 6, p. 1-46, 1971.
28. MOPPER, K.; ZIKA, R. G. Natural photosensitizers in sea water: riboflavin and its breakdown products. In: ZIKA, R. G.; COOPER, W. J. (Eds.). **Photochemistry of environmental aquatic systems.** Washington: American Chemical Society, 1987. p. 74-190.