

Inibição da mineralização de compostos nitrogenados de lixiviado de macrófita aquática: adequação metodológica

Maíra de Figueiredo Nunes¹, Marcela Bianchessi da Cunha Santino² e Irineu Bianchini Júnior^{2,3*}

¹Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, São Paulo, Brasil. ²Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

³Departamento de Hidrobiologia, Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luiz, km 235, Cx. Postal 676, 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: irineu@power.ufscar.br

RESUMO. Este estudo visou estabelecer as concentrações adequadas da nitrapirina para a inibição das demandas de oxigênio produzidas pelas oxidações dos compostos nitrogenados durante a mineralização aeróbia de lixiviado, utilizando a macrófita aquática *Myriophyllum aquaticum* como fonte de matéria orgânica dissolvida (MOD). Para tanto, realizaram-se incubações com lixiviado com diferentes tratamentos: (i) tratamento com MOD, (ii) tratamento com MOD + nitrapirina em diferentes concentrações (10; 25 e 50 mg L⁻¹), visando encontrar a concentração que inibisse o processo de nitrificação, (iii) tratamento com MOD + NH₄SO₂, (iv) tratamento com MOD + NH₄SO₂ + nitrapirina, e (v) tratamento com MOD + azida. A partir destas incubações, foram efetuadas medições periódicas da quantidade de oxigênio dissolvido destes tratamentos. Os resultados indicaram que a proporção de 10 mg L⁻¹ de nitrapirina para cada 10 mg C de lixiviado é eficaz para inibir a oxidação dos compostos nitrogenados de lixiviados de macrófitas aquáticas.

Palavras-chave: demanda de oxigênio, inibição, nitrificação, lixiviado, macrófita aquática.

ABSTRACT. Inhibition of the mineralization of nitrogen compounds in leachate from aquatic macrophytes: methodological adequacy. This study aimed to establish the adequate concentrations of nitrapyrin for the effective inhibition of oxygen demand required for the oxidation of nitrogen compounds during aerobic mineralization of leachate. The aquatic macrophyte *Myriophyllum aquaticum* was used as a source of dissolved organic matter (DOM). The leachate was incubated in several chambers, containing different composition and treatments: (i) treatment with leachate (DOM), (ii) treatment with DOM plus nitrapyrin in different concentrations (10; 25 and 50 mg L⁻¹), aiming at finding the right concentration that inhibits the nitrification process, (iii) treatment with DOM plus NH₄SO₂, (iv) treatment containing DOM and nitrapyrin plus NH₄SO₂, and (v) treatment with DOM plus azide. The dissolved oxygen amount in each incubation treatment was periodically measured. The results indicated that the ratio of 10 mg L⁻¹ of nitrapyrin for each 10 mg C of leachate is efficient in inhibiting the oxidation of nitrogen compounds from aquatic macrophytes.

Key words: oxygen demand, inhibition, nitrification, leachate, aquatic macrophytes.

Introdução

As macrófitas aquáticas produzem elevadas quantidades de matéria orgânica em ecossistemas aquáticos continentais, principalmente nas zonas litorâneas. Ao se decomporem, tais recursos liberam matéria orgânica dissolvida (MOD) e compostos inorgânicos (p. ex. nutrientes) para a coluna d'água, além de se acumularem no sedimento em forma de matéria orgânica particulada (MOP) (Wetzel, 2001). Tais transferências são fundamentais para a manutenção dos ciclos biogeoquímicos (p. ex. carbono) (Cronin *et al.*, 2006), como o do nitrogênio

(Xie *et al.*, 2004) e também para o fluxo energético dos ecossistemas aquáticos (Wetzel, 1995). Após a morte das plantas, ocorre a perda da integridade celular dos tecidos e grandes quantidades de MOD são dissolvidas. Esse material lixiviado é principalmente procedente das frações citoplasmáticas e constituído basicamente de carboidratos (Best *et al.*, 1990), polifenóis (Suberkropp *et al.*, 1976; Cunha-Santino e Bianchini Jr., 2003) e nutrientes como nitrogênio (p. ex. amônia), orto-fosfatos (Gupta *et al.*, 1996), potássio e cálcio (Mun *et al.*, 2001).

Em condições aeróbias, durante a decomposição, os microrganismos transformam os detritos em moléculas orgânicas menores e, em seguida, estas em produtos inorgânicos, como: H_2O e CO_2 e NH_4^+ . Esses processos de transformação dos compostos orgânicos em inorgânicos são denominados, de modo geral, de *mineralizações*. Parte dos compostos orgânicos (p. ex. compostos nitrogenados e de carboidratos) é, ainda, utilizada pelos microrganismos para aumentarem em número e biomassa (Stockar et al., 2006). Em oposição à mineralização, o processo de manutenção dos compostos na forma orgânica é denominado *imobilização* ($\approx$ assimilação biológica da matéria orgânica). A formação de compostos húmicos é outro evento que contribui para a imobilização, mas, neste caso, o processo é químico.

As transformações que ocorrem no ciclo do nitrogênio (amonificação, nitrificação, desnitrificação) são intensamente acopladas umas às outras e influenciadas pela disponibilidade de carbono orgânico e pelo metabolismo da microbiota. A mineralização do nitrogênio, ou seja, a amonificação é controlada pela razão C:N do meio. Em condições de elevada razão C:N, o nitrogênio é basicamente convertido em biomassa de microrganismos e, em baixa razão, observa-se a produção de NH_4^+ (Strauss e Lamberti, 2002).

Tendo em vista que os processos degradativos são essencialmente constituídos por reações de oxidação (químicas, fotoquímicas e bioquímicas), os consumos de oxigênio têm sido utilizados frequentemente para as avaliações das cinéticas das mineralizações. A exemplo dos procedimentos adotados nos testes de DBO, esses experimentos de longo prazo registram, para um determinado período de incubação, a quantidade de oxigênio dissolvido (OD) consumido, servindo para quantificar a degradação bioquímica (demanda carbonácea) dos compostos orgânicos (Santos et al., 2006). Esses experimentos também permitem determinar a quantidade de oxigênio utilizada para oxidar formas reduzidas de nitrogênio (demanda nitrogenada), não-prevenida por inibidor. Nesse caso, a oxidação da amônia pode ser inibida pela nitrapirina (2-cloro-6-triclorometil-piridina; Sigma Chemical®) que atua sobre a amônia monooxigenase, impedindo a nitrificação. Esse método de inibição fornece o rendimento da demanda nitrogenada pela diferença desta em relação à demanda total de oxigênio (demanda dos compostos de carbono e dos compostos nitrogenados). Vários estudos realizados em solos utilizaram a nitrapirina como inibidor da oxidação do nitrogênio reduzido, principalmente em solos e

sedimentos (Strauss e Lambert, 2000; 2002). Assim, considerando a importância da avaliação do consumo de oxigênio na degradação da matéria orgânica (compostos de carbono e nitrogênio) nos sistemas aquáticos, este estudo visou estabelecer as concentrações adequadas da nitrapirina para a efetiva inibição das demandas de oxigênio produzidas pelas oxidações dos compostos nitrogenados, durante a mineralização aeróbia de lixiviado de uma macrófita aquática (*Myriophyllum aquaticum*).

Material e métodos

Coleta de material

Exemplares adultos de *Myriophyllum aquaticum* foram coletados manualmente em dois pontos (margem direita) da região litorânea do reservatório do Monjolinho (22°00'S e 47°54'W; campus da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Estado de São Paulo). Em laboratório, as plantas foram lavadas para a remoção de perifíton, partículas de sedimento e material aderido; em seguida, foram secas em estufa (50°C) e trituradas em moinho tipo Willie (Tecnal; modelo TE 650).

Para a obtenção dos lixiviados de *M. aquaticum* foram realizadas extrações aquosas a frio (4°C) com duração de 24h (Müller et al., 1999). A extração constituiu-se de 10 g (PS) de fragmentos de planta íntegra (previamente esterilizados) em 1,0 L de água (destilada esterilizada). As esterilizações das plantas (previamente secas, trituradas e embaladas em papel alumínio) e das amostras de água destilada foram realizadas em autoclave vertical (Fabbe; modelo 103) durante 15 min., a 1 atm e 121°C (Ward e Johnson, 1996).

Após as extrações, as frações particuladas foram separadas das dissolvidas por filtração em membranas de éster de celulose, previamente lavadas com 100 mL de água destilada, com poro de 0,45 μm (Millipore).

Experimentos de mineralização (com inibidores: nitrapirina e azida)

Para a execução dos experimentos, duas amostras de água do reservatório foram coletadas nas regiões selecionadas para as coletas de *M. aquaticum*. Em seguida, foram misturadas (para obtenção de uma amostra integrada) e filtradas em membrana de éster de celulose (Millipore; diâmetro de poro = 0,45 μm).

Teste 1: Inicialmente, foram montadas dez câmaras de mineralização contendo lixiviado de *M. aquaticum* e água do reservatório filtrada com adição ou não de nitrapirina:

- (i) três câmaras com lixiviados (conc.: 202,6 mg C L⁻¹);
- (ii) três câmaras com lixiviados (conc.: 202,6 mg

C L⁻¹) acrescidos de nitrapirina (conc.: 10 mg L⁻¹), de acordo com APHA (1998);

(iii) duas câmaras-controle contendo apenas água do reservatório filtrada;

(iv) duas câmaras-controle com água do reservatório e nitrapirina (conc.: 10 mg L⁻¹).

Teste 2: Posteriormente, realizou-se outro experimento que contemplou os seguintes tratamentos:

(i) duas câmaras com lixiviados (conc.: 69,2 mg C L⁻¹);

(ii) três câmaras com lixiviados (conc.: 69,2 mg C L⁻¹) acrescidos de nitrapirina (conc.: 25 mg L⁻¹);

(iii) três câmaras com lixiviados (conc.: 69,2 mg C L⁻¹) acrescidos de nitrapirina (conc.: 50 mg L⁻¹);

(iv) três câmaras com lixiviados (conc.: 69,2 mg C L⁻¹) enriquecidas com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄; conc.: 3,0 mg L⁻¹);

(v) três câmaras com lixiviados (conc.: 69,2 mg C L⁻¹) acrescidos de nitrapirina (conc.: 50 mg L⁻¹) e enriquecidas com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄; conc.: 3,0 mg L⁻¹);

(vi) duas câmaras com lixiviados (conc.: 69,2 mg C L⁻¹) acrescidos azida (0,5%), conforme Santos *et al.* (2006);

(vii) duas câmaras-controle contendo apenas água do reservatório filtrada;

(viii) duas câmaras-controle com água do reservatório e nitrapirina (conc.: 25 mg L⁻¹);

(ix) duas câmaras-controle com água do reservatório e nitrapirina (conc.: 50 mg L⁻¹);

(x) duas câmaras-controle contendo água do reservatório enriquecida com sulfato de amônio (conc.: 3,0 mg L⁻¹);

(xi) duas câmaras-controle com água do reservatório e nitrapirina (conc.: 50 mg L⁻¹) enriquecidas com sulfato de amônio (conc.: 3,0 mg L⁻¹);

(xii) duas câmaras-controle com água do reservatório e azida (0,5%).

Durante 45 (Teste 1) e 49 dias (Teste 2) foram registradas as concentrações de OD por método polarográfico (oxímetro YSI, modelo 58). Depois de efetuadas as determinações, os frascos foram fechados para evitar as difusões de oxigênio. Os processos degradativos anaeróbios foram evitados pela oxigenação (com ar comprimido filtrado), quando as concentrações de OD aproximaram-se de 2,0 mg L⁻¹. Os valores médios das concentrações de oxigênio dos controles foram, posteriormente, subtraídos dos valores médios das incubações enriquecidas com lixiviado. Dessa forma, neutralizaram-se os efeitos dos consumos de oxigênio das oxidações da matéria orgânica presente na água do reservatório.

Considerou-se que o consumo de oxigênio

estivesse diretamente relacionado com a oxidação do recurso orgânico e que esse processo pudesse ser representado por um modelo cinético de primeira ordem (Bitar e Bianchini Jr., 2002), similar ao utilizado nos testes de DBO. Os ajustes cinéticos de oxigênio consumido (OC) foram realizados utilizando regressões não lineares, calculadas com o algoritmo iterativo de Levenberg-Marquardt (Press *et al.*, 1993).

De acordo com esses procedimentos, desprezaram-se as variações temporais do consumo de oxigênio (Equação 1).

$$OC = OC_{\text{máx}} \left(1 - e^{-k_d t}\right) \quad (1)$$

em que:

OC = valores acumulados das concentrações de oxigênio consumido (mg L⁻¹); OC_{máx} = quantidade máxima de oxigênio consumido (mg L⁻¹); k_d = coeficiente de desoxigenação (dia⁻¹); e t = tempo (dia).

Os consumos acumulados de OD dos tratamentos foram linearizados e os testes de variância unidirecional (Anova, um-fator) e de comparação múltipla de Tukey-Kramer foram aplicados para avaliar as diferenças entre os tratamentos a que os lixiviados foram submetidos, sendo adotado um nível de significância alfa de 0,05.

Resultados e discussão

Os consumos de oxigênio dissolvido durante a mineralização aeróbia dos lixiviados (MOD) de *M. aquaticum* no Teste 1 são apresentados na Figura 1. O tratamento com nitrapirina na concentração de 10 mg L⁻¹ foi semelhante ao tratamento que continha apenas MOD (p > 0,05). Dessa forma, o OC_{máx} de ambos os tratamentos foram similares (MOD = 94 mg g⁻¹ C e MOD + nitrapirina = 97 mg g⁻¹ C; Figura 1), concluindo que a concentração utilizada de nitrapirina não foi suficiente para inibir o processo de nitrificação.

O Teste 2 foi, então, realizado na tentativa de encontrar concentração de nitrapirina que inibisse efetivamente a nitrificação. Nesse caso, levou-se em consideração a concentração inicial de carbono da MOD e a concentração inicial de nitrapirina. Optou-se por diminuir a concentração inicial de carbono das amostras (Teste 1 = 202,6 e Teste 2 = 69,2 mg C L⁻¹) e também se elevou a concentração de nitrapirina, inicialmente, sugerida no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998) que foi de 10 mg L⁻¹. As concentrações de nitrapirina adotadas no Teste 2 foram 25 e 50 mg L⁻¹, o que garantiu menor proporção entre MOD e o agente inibidor.

Os consumos de oxigênio dos tratamentos considerados no Teste 2 apresentaram diferenças relevantes que possibilitaram a conclusão de significância do teste estatístico em relação ao

delineamento experimental. Nesse contexto, com base nos resultados apresentados na Figura 2, observa-se o consumo de oxigênio na mineralização de cada um dos tratamentos.

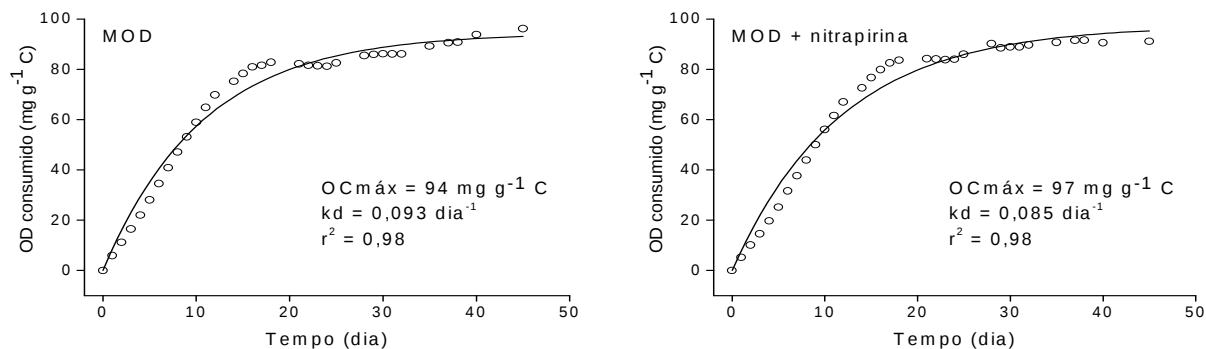


Figura 1. Ajustes cinéticos do consumo de oxigênio de MOD de *M. aquaticum* submetido a dois tratamentos no Teste 1.

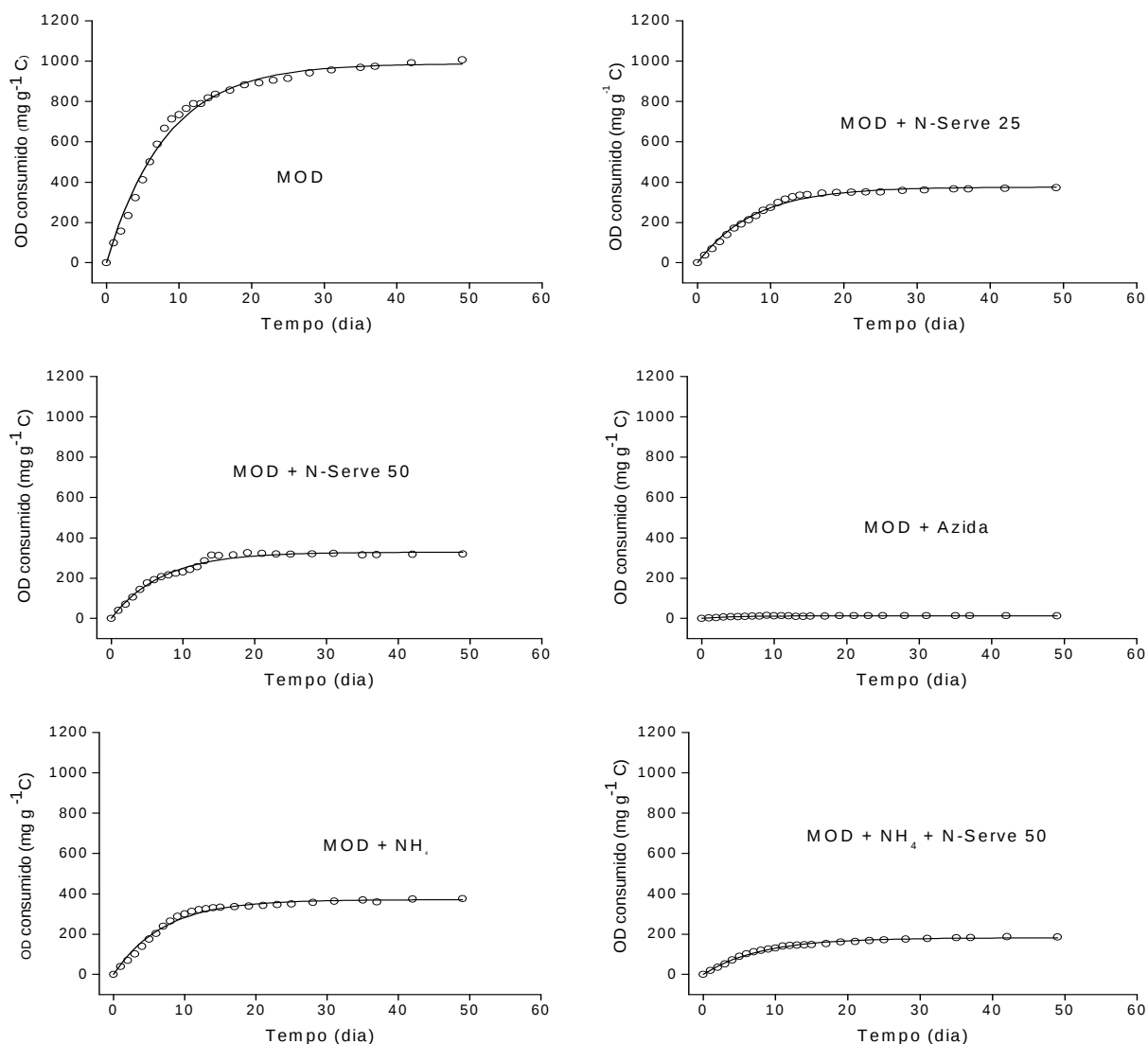


Figura 2. Ajustes cinéticos dos consumos de oxigênio das mineralizações de MOD lixiviados de *M. aquaticum* submetidas a diferentes tratamentos (Teste 2).

Pelas análises estatísticas, pode-se verificar que o valor médio de $OC_{\max}$ (Tabela 1) das câmaras que continham apenas MOD foi significativamente diferente das demais ($p < 0,001$). Os tratamentos que incluíram MOD com adição de nitrapirina nas concentrações de 25 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹ foram semelhantes entre si ($p > 0,05$). O tratamento com MOD e azida apresentou, também, consumo de oxigênio distinto dos demais ($p < 0,01$).

Tabela 1. Parâmetros cinéticos do consumo de oxigênio de MOD de *M. aquaticum* submetido a diferentes tratamentos no Teste 2.

Tratamentos	$OC_{\max}$	Erro	kd	Erro	r^2
MOD (sem inibidores)	987	13	0,122	0,005	0,99
MOD + nitrapirina 25	375	4	0,130	0,005	0,99
MOD + nitrapirina 50	329	5	0,142	0,007	0,98
MOD + Azida	13	0	0,240	0,028	0,90
MOD + NH ₄	371	5	0,143	0,006	0,99
MOD + NH ₄ + nitrapirina 50	181	2	0,127	0,003	0,99

A partir dos resultados obtidos, pode-se verificar que o aumento da concentração da nitrapirina de 10 mg L⁻¹ para 25 e 50 mg L⁻¹ causou inibição do processo de nitrificação, reduzindo o consumo de oxigênio ca. 3 vezes. A concentração de 10 mg L⁻¹ sugerida no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA et al., 1998) pode não ter causado o efeito inibidor, uma vez que a nitrapirina é uma substância que apresenta baixa solubilidade em substâncias polares (p. ex. água). É possível, ainda, que a elevada proporção entre MOD (e, consequentemente, NOD) e nitrapirina experimentada no primeiro tratamento tenha concorrido para a ausência de inibição.

No segundo teste, o sulfato de amônio foi adicionado a MOD para garantir a presença de nitrogênio nas incubações, uma vez que o lixiviado poderia apresentar baixas concentrações deste composto. Nos tratamentos enriquecidos com o (NH₄)₂SO₄ e na presença de nitrapirina (50 mg L⁻¹), houve diferenças significativas em relação à MOD acrescida de (NH₄)₂SO₄ ($p < 0,01$), mostrando que esta proporção de nitrapirina foi adequada para a inibição do processo de nitrificação.

De acordo com os valores elevados dos coeficientes de determinação ($r^2 = 0,90$ a $0,99$; Tabela 1), observa-se que o modelo cinético adotado foi adequado para descrever as cinéticas de consumo de oxigênio dos processos aeróbios de oxidação do lixiviado de *M. aquaticum*. A exceção do tratamento com azida, que apresentou um k_d de 0,240 dia⁻¹, os demais tratamentos apresentaram k_d que variaram de 0,122 a 0,143 dia⁻¹, não havendo diferenças entre estes coeficientes.

Conclusão

Com base nos tratamentos utilizados e na análise estatística, sugere-se que a proporção de 10 mg L⁻¹ de nitrapirina para cada 10 mg C de MOD seja eficaz no processo de inibição da oxidação dos compostos nitrogenados de lixiviados de macrófitas aquáticas. Por sua vez, a solução que contém 0,5% de azida foi suficiente para inibir as oxidações mediadas pelos microrganismos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq: Processos: 300959/2004-4 e 150169/2004-3, pela concessão das bolsas de estudo.

Referências

- APHA-American Public Health Association et al. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, D.C., 1998.
- BEST, E.P.H. et al. Studies on decomposition of *Ceratophyllum demersum* litter under laboratory and field conditions: losses of dry mass and nutrients, qualitative changes in inorganic compounds and consequences for ambient water and sediments. *Hydrobiologia*, Dordrecht, v. 194, p. 91-114, 1990.
- BITAR, A.L.; BIANCHINI JR., I. Mineralization assays of some organic resources of aquatic systems. *Braz. J. Biol.*, São Carlos, v. 62, n. 4A, p. 557-564, 2002.
- CUNHA-SANTINO, M.B.; BIANCHINI JR., I. Changes in the amount of soluble carbohydrates and polyphenols contents during decomposition of *Montrichardia arborescens* (L.) Schott. *Acta Amazon.*, Manaus, v. 33, n. 3, p. 469-476, 2003.
- CRONIN, G.M. et al. Influence of freshwater macrophytes on the littoral ecosystem structure and function of a young Colorado reservoir. *Aquat. Bot.*, Amsterdam, v. 85, p. 37-43, 2006.
- GUPTA, M.K. et al. Decomposition of Young water hyacinth leaves in lake water. *Hydrobiologia*, Dordrecht, v. 335, p. 33-41, 1996.
- MUN, H.T. et al. Decay rate and changes of nutrients during the decomposition of *Zizania latifolia*. *Korean Journal of Ecology*, Coréia, v. 24, p. 81-85, 2001.
- MÜLLER, J. et al. Fungal-bacterial interaction on beech leaves: influence on decomposition and dissolved organic carbon quality. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, v. 31, p. 367-374, 1999.
- PRESS, W.H. et al. *Numerical recipes in C: the art of scientific computing*. New York: Cambridge University Press, 1993.
- SANTOS, M.G. et al. Photodegradation, chemical and biologic oxidations from mineralization of *Utricularia breviscapa* leachate. *Acta Limnol. Bras.*, São Carlos, v. 18, p. 347-355, 2006.
- STOCKAR, U. et al. Thermodynamics of microbial

growth and metabolism: an analysis of the current situation. *J. Biotechnol.*, Amsterdam, v. 121, p. 517-533, 2006.

STRAUSS, E.A.; LAMBERTI, G.A. Regulation of nitrification in aquatic sediments by organic carbon. *Limnol. Oceanogr.*, Baltimore, v. 45, n. 8, p. 1854-1859, 2000.

STRAUSS, E.A.; LAMBERTI, G.A. Factors regulating nitrification in aquatic sediments: effects of organic carbon, nitrogen availability, and pH. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, Toronto, v. 59, n. 3, p. 554-563, 2002.

SUBERKROPP, K. *et al.* Changes in the chemical composition of leaves during processing in a woodland stream. *Ecology*, Washington, D.C., v. 57, p. 720-727, 1976.

WARD, A.K.; JOHNSON, M.D. Heterotrophic

microorganisms. *In*: HAUER, F.R.; LAMBERTI, G.A. (Ed.). *Methods in stream ecology*. San Diego: Academic Press, 1996. cap. 12, p. 233-268.

WETZEL, R.G. Death, detritus and energy flow in aquatic ecosystems. *Freshw. Biol.*, Oxford, v. 33, p. 83-89, 1995.

WETZEL, R.G. *Limnology: lake and river ecosystems*. San Diego: Academic Press, 2001.

XIE, Y. *et al.* Effects of nitrogen and phosphorous availability on the decomposition of aquatic plants. *Aquat. Bot.*, Amsterdam, v. 80, p. 29-37, 2004.

Received on August 08, 2007.

Accepted on March 28, 2008.