



Artigo Original

Reatores Biogeoquímicos Anaeróbios Para Estudos in door de Respiração Microbiana em Processos de Biodegradação em Solos

Pessoa-de-Souza, M.A.^{1,2}, De-Campos, A.B.³¹Programa de Pós Graduação em Agronomia (PPGA); Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos; Universidade Federal de Goiás; pessoa.aurelio@gmail.com²Escola de Ciências Agrárias e Biológicas (ECAB); Pontifícia Universidade Católica de Goiás; pessoa.aurelio@gmail.com³Professor Doutor; Instituto de Geociências, UNICAMP, acampos@ige.unicamp.br

INFO ARTICLE

Histórico do artigo

Recebido: 01 de maio de 2018

Aceito: 10 de outubro de 2018

Palavras-chaves:

Incubação

Organofosforados

Solos inundados

Aparato biogeoquímico

RESUMO

Os reatores biogeoquímicos são aparatos construídos para avaliações em ambientes controlados. Quando bem desenhados podem ser tecnologias ambientais para monitoramento *in situ*, bem como suporte metodológico para análise *ex situ*. Os vários modelos existentes são baseados nos conhecimentos em engenharia química e abarcam conceitos químicos, físicos e biológicos, bem como as interações possíveis entre essas frentes básicas de estudo. O objetivo deste trabalho é expor as possibilidades de uso dos reatores biogeoquímicos nos estudos de degradação, sobretudo de pesticidas orgânicos em solos alagados e propor um design de metodologia para ensaios que tenham este foco para ambientes em anaerobiose.

1. Introdução

Reatores são usados em processos para tratamento de resíduos e/ou avaliação do estado de degradação dos produtos. Muitos destes processos são simulados em pequena escala, por meio de protótipos, para compreensão dos mecanismos de degradação artificiais/ simulados ou naturais/ estimulados (Sagarkar et al., 2014). Os mecanismos de degradação em aerobiose têm sido razoavelmente bem compreendidos, entretanto somente nos últimos anos o metabolismo em anaerobiose tem começado a receber atenção (Singh et al., 1999). Uma das bases fundamentais de compreensão da degradação tem sido a partir de conhecimentos da biologia molecular e compreensão das rotas metabólicas dos organismos (Waggoner; Craighead, 2007).

Os processos microbianos dominam a biogeoquímica de ambientes anaeróbios (Beer et al., 2013; Han et al., 2011). Quando não há limitação de termodinâmica ou de transporte, a função da microbiota pode ser limitada pela cinética oferecida pelas condições físico-químicas do habitat. Esta cinética pode ser reprimida, ou estimulada por compostos tóxicos, altas temperaturas, variação de pH, pressão, salinidade. Dessa forma, para se compreender cada efeito de

forma isolada, são sugeridos modelos e/ou sistemas termodinâmicos que não troquem massa e energia simultaneamente, como os reatores biogeoquímicos.

Muitos modelos de reatores são sistematizados a partir dos conceitos da engenharia química. Os reatores biogeoquímicos utilizados para estudos em laboratório são subdivididos em um número finito de reservatórios (sistema de reação ou reator). Em cada reservatório, as propriedades físicas, químicas e biológicas são relevantes, assumindo ser razoavelmente uniformes, e têm a capacidade de transferir matéria e/ou energia de um ponto a outro (Dejong et al., 2010). A partir desta diferença de transferência é possível fazer inferências sobre os processos de degradação em atmosfera controlada, gerando modelos matemáticos, e caminhos alternativos ainda não explorados.

Existem numerosos modelos e sistemas baseados em diferentes conceitos cinéticos (De-Campos et al., 2012; Picek et al., 2000; Sauer et al., 2012; Scalenghe et al., 2002;), com aplicações em estudos da dinâmica da geoquímica em solos. A grande maioria dos modelos trabalha com processos isolados, sem incluir outros parâmetros que funcionem como indicadores de alterações, como o pH, potencial óxido-redução (redox), temperatura, condutividade ou oxigênio dissolvido.

Os bio(geo)reatores possuem diferentes objetivos e aplicações. Enquanto alguns surgem como tecnologias ambientais para descontaminação de solos, sólidos e sedimentos, outros, por sua vez, podem oferecer metodologias de suporte para investigação das alterações biogeoquímicas.

Picek et al. (2000), por exemplo, estudaram o tempo de degradação microbiana em função do tempo de alagamento de solo, por meio de um conjunto de reatores com injeção de gás inerte, para simular as condições de anaerobiose estrita, muito similar ao protótipo proposto no presente estudo. Anschutz et al. (2009) testaram em reatores biogeoquímicos o grau de degradação de matéria orgânica em areias, com resultados muito precisos do comportamento geoquímico, elucidando os processos envolvidos, sobretudo com nitrogênio, fósforo e sua relação com o gás oxigênio. Os mesmos autores observaram que os reatores promoveram ou aceleraram os processos de remineralização. Peoples & Adams (2010), construíram um biorreator para tratamento de águas residuais a partir de microrganismos, o ambiente redutor forneceu doadores de elétrons alterando a superfície de coloides para desenvolver a microbiota. Sauer et al. (2012), contribuíram com os estudos de geomicrobiologia, quando propuseram um reator para incubação em alta pressão de estudos em subsuperfície. De-Campos et al. (2012) investigaram a evolução do redox em solos cultivados e não cultivados com variações no teor de matéria orgânica por até 14 dias de incubação sob a indução dos reatores biogeoquímicos, e observaram alterações consideráveis de pH, NH_4^+ , P, Fe e Mn para solos não cultivados, também muito similar ao proposto aqui. Este estudo de De-Campos apontou possíveis dinâmicas do carbono em ambientes controlados. Todos os estudos de alterações bioquímicas em ambientes limitados têm implicações na ocorrência de organismos e processos específicos, podendo apontar novos caminhos para a tecnologia, monitoramento, e para a indústria.

Em solos alagados, os processos bioquímicos são similares aos observados por Hunter et al., (1998); Megonigal et al., (2004). Devido a uma flutuação sazonal da água no solo, condições redutoras são oferecidas, com variação de disponibilidade eletrônica de metais para o crescimento e funcionamento microbiano. Os reatores ganham uma maior robustez na presença da microbiota, que têm a capacidade de transformar os contaminantes potenciais à moléculas com menores implicações ambiental negativas (Hunter et al., 1998; Peoples; Adams, 2010). Nestes ambientes, uma forma eficiente de fazer o monitoramento biogeoquímico é através da produção de CO_2 , e a alteração de pH associado ao redox (Beer et al., 2013; De-Campos et al., 2012; Picek et al., 2000; Peter; Conrad, 1996;).

As taxas das reações de redox e transformações biogeoquímicas associadas são dependentes da presença de matéria orgânica disponível (p.e., De-Campos et al., 2012; Picek et al., 2000) ou de nutrientes bioestimulantes (Baptista et al., 2005; Schnurer et al., 2006). Dessa forma, os pesticidas orgânicos podem servir como bioestimulantes de microrganismos endógenos, pois possuem níveis de nitrogênio e fósforo suficientes para estimular bioprocessos de crescimento microbiano (Baptista et al., 2005; Araújo et al., 2003). O glifosato, por exemplo, é um organofosforado que possui N (nitrogênio), P (fósforo) e C (carbono) na sua composição, e por isso possui um grande valor bioquímico para consumo e consequente biodegradação pela microbiota do solo, e assim, pode condicionar a um meio seletivo para alguns organismos com potencial de degradação.

O foco deste estudo foi construir um reator com fluxo de gás controlado, com referência nas atribuições estudadas por Picek et al. (2000), com a finalidade de medir de CO_2 produzidos pela biodegradação, em sistemas de trapper, por titulometria, principalmente em solos alagados, para condições tropicais. Reatores semelhantes foram construídos

por Baptista et al. (2005) e De-Campos et al. (2009), com entrada e saída de gás inertes exclusivamente para transporte advectivo de fluxos de CO_2 produzidos dentro do sistema.

2. Material e métodos

Reator biogeoquímico de atmosfera inerte

O aparato (Fig. 1) foi constituído por um cilindro de gás nitrogênio (N_2 99.98% de pureza) de 10 m^3 , conectado e vedado a um frasco de vidro rosqueado com tampa azul e vedado com rolha de borracha nº 15, com capacidade de 500 mL, entretanto com volume máximo foi de 300 mL de NaOH 1N. A finalidade do hidróxido de sódio foi para captura de CO_2 , retirando qualquer resíduo de gás carbônico que pudesse estar presente no gás nitrogênio, que não era 100% puro, e, dessa forma, poderia superestimar os resultados de CO_2 que não fossem provenientes da biomassa microbiana. Em sequência, o gás nitrogênio passou por uma hidratação em um frasco de capacidade similar e mesmo volume (300 mL), entretanto contendo água deionizada, para, então seguir até um sistema de *manifold*. Os volumes máximos, tanto de limpeza do gás nitrogênio (por meio do NaOH) e hidratação foi de 300 mL, para evitar possíveis perdas por refluxo no sistema e entupimentos, no caso de ocorrências de variação de vazão do gás.

O fluxo de N_2 foi controlado por um fluxômetro acoplado a um manômetro na saída do cilindro de gás, para regulação do volume total de gás no sistema e verificação de gás restante no cilindro, respectivamente. Um *niple* de pressão adaptada para mangueira foi colocado no fluxômetro, para conectar o gás ao primeiro conjunto de frascos. Cada reator passou por uma bateria de testes com medição de CO_2 para verificar a melhor pressão de trabalho, sendo testadas pressões que variaram de 8 a 30 cc/ min. A pressão de trabalho por reator que obteve melhor desempenho para captura de gás foi a de 14 ± 2 cc/ min (testes não apresentados). A partir desta condição, os reatores foram testados durante intervalos de 8 horas, diariamente, durante todo o experimento, para assegurar as mesmas condições de pressão em todos os reatores. Averiguações de pressão eram feitas também em momentos que a pressão total do reator mudava, em função de algum encrustamento nas mangueiras do sistema ocasionado ressecamento do hidróxido de sódio. Qualquer anormalidade na vazão era controlada por micro-válvulas que faziam parte do sistema antes e depois das câmaras de incubação, bem como no eixo de distribuição de gás para cada reator.

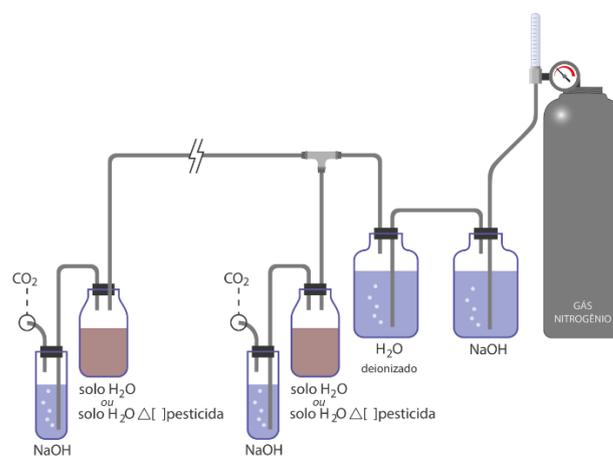


Figura 1. Esquema de reator biogeoquímico com influxo advectivo de gás nitrogênio, para formação de ambiente inerte. O gás é purificado em base forte (NaOH) e hidratado em água deionizada para entrada nos reservatórios, na presença de solo (ou sólidos) e o pesticida de interesse. Por diferença de pressão oferecida pelo gás nitrogênio, o CO_2 , fonte do metabolismo microbiano, é capturado na fase terminal do reservatório por uma base forte.

Cada unidade do reator era composto por uma câmara de incubação feita em vidro transparente e 4 mm de espessura, vedados por rolha inerte branca, perfuradas com duas agulhas descartáveis de 0,70X25 mm (22 G 1polegada) para permitir a entrada e saída do fluxo de gás N₂. À medida que as agulhas encrustavam por uma variação de pressão nas unidades do reator, elas eram descartadas e rapidamente trocadas. O canhão das agulhas permitiam o rosqueamento para o encaixe das microválvulas, que regulavam a entrada e saída do gás. Com o sistema vedado, as câmaras de incubação ofereciam as condições de anaerobiose para os estudos de captura de CO₂ das amostras. Para garantir a vedação do sistema, nos encaixes das válvulas foi utilizado silicone gel-sólido para diminuir os possíveis vazamentos de gás.

A saída de gás da câmara de gás conduzia a uma sequência de dois frascos com capacidade de 30 cm³ em volume. Na sequência, o segundo frasco continha 25 mL de solução de NaOH 0,3 M para capturar o CO₂ produzido pela microbiota nas amostras presentes nas câmaras de incubação, vedado com borracha inerte marrom 20 mm, e também rosqueadas para diminuir os focos de vazamento por compressão e vedação. No segundo frasco foi feita uma perfuração com agulha para saída do N₂ residual do sistema. O primeiro frasco foi deixado vazio para eventuais problemas de depressurização do sistema em relação ao segundo, evitando perdas de hidróxido de sódio.

Todos os materiais utilizados foram de materiais recicláveis, e portanto de baixo custo, representando como uma alternativa para ensaios em série com microrganismos em ambientes anaeróbicos (materiais suplementares). Ademais, para confirmação da funcionalidade do aparato, foram testadas a capacidade de produção de CO₂ em solos de textura média a arenosos de Veredas, sob a aplicação do pesticida glifosato.

Após a aplicação, as amostras foram incubadas e distribuídas em fatorial, em cinco datas distintas, nos 8 compartimentos construídos no aparato. O tempo mínimo de incubação foi de um (01) dia, e máximo de trinta (30) dias, com avaliações diárias de produção de dióxido de carbono, para todos os tempos de incubação, por titulometria ácido-base. A variação de datas de incubação foi importante para mensurar ao longo de um período a capacidade de redução do sistema (por avaliação do potencial redox e pH) e a biomassa microbiana, que são importantes para interpolação dos dados de produção de CO₂, que foi crescente (dados não apresentados).

3. Resultados e discussão

Desenvolvimento da biomassa para produção de CO₂

A digestão anaeróbia é um processo biológico que permite o consorciamento de vários grupos de microrganismos, com dinâmicas metabólicas específicas, na ausência de oxigênio molecular, com a promoção de transformação de compostos (Faulwetter et al., 2009; Richardson; Vepraskas, 2001). Em reatores anaeróbios, a produção de gases é desejável, quer seja pelo ponto de vista energético, quer seja indicar que ocorre degradação de compostos orgânicos, por isto, os sistemas bioquímicos anóxicos são considerados eficientes para remoção de pesticidas orgânicos.

De Jong et al., 2011 afirmam que o próprio solo atua como um sistema multifuncional, chamado de engenharia do solo *in vivo*. Por sua vez, esta engenharia, usa da biogeoquímica e suas redes de processos químicos e biológicos nos habitats do solo para desenvolver tecnologias de monitoramento em campo e em larga escala, e os reatores se baseiam neste conceito para oferecer dados sobre a dinâmica do solo em anaerobiose.

Um sistema anaeróbio procura acelerar o processo de degradação com o favorecimento de condições ideais para o desenvolvimento da microbiota. Performances semelhantes são observadas para o tratamento de efluentes e águas residuais (Haider; Schaffer, 2009).

Os organismos que se desenvolvem nestes ambientes são os quimiorganotrófico. De acordo com a equação de Monod, se existe disponibilidade de alimento, os organismos crescem de forma exponencial, se estabilizam e em seguida decaem, a medida que o estoque é diminuído pelo consumo, e dessa forma, prevalecem no sistema os organismos que têm a sua catálise favorecida.

Neste processo, o composto presente no sistema, para ser eliminado, precisa da interferência das exoenzimas que são excretadas inicialmente por bactérias fermentativas (Conrad, 1996; Conrad et al., 2011; Faulwetter et al., 2009; Paul; Clark, 1989), que são limitadas por reações de hidrólise (Haider; Schaffer, 2009).

Com o avanço do consumo pela microbiota, alguns processos são encadeados, como a acidogênese, que transforma compostos simples em ácidos orgânicos, e acetogênese, que degrada os ácidos orgânicos para compostos, que estequiometricamente oferecem como residual hidrogênio e gás carbônico. Pela cinética de produção de CO₂ é possível fazer inferências sobre o consumo dos compostos orgânicos (Haider; Schaffer, 2009).

4. Considerações Finais

Os reatores apresentam a vantagem de controlar os fatores ambientais em função do desejado, e por isso, forçar a situações de estagnação do sistema. Amparados pelos dados podem ser gerados modelos com predições futuras do comportamento da biodegradação, no caso, de pesticidas. O ambiente anóxico é naturalmente seletivo pela ausência de oxigênio, e força a permanência dos organismos anaeróbios em detrimento da extinção dos organismos aeróbios. A aplicação simulada de contaminantes neste solo contribui ainda mais para que ocorra uma seleção da microbiota, restando apenas os que possuem potencial de degradação, sem que precise testar em campo. Do mesmo lado, os reatores também permitem entender o quão danoso um contaminante pode ser a um solo, e com maior clareza, os compartimentos ambientais que podem alcançar, com possibilidade de se calcular a taxa de erosão genética da matriz solo.

Neste contexto, os reatores biogeoquímicos podem contribuir muito para a geobiologia, não apenas como uma tecnologia ambiental para monitoramento em laboratório de compostos em ambientes frágeis, mas, sobretudo como um método de análise para detectar extremismos que podem ocorrer nos ambientes, bem como a construção de modelos matemáticos com aplicação *in situ*. Para avaliação de contaminação de pesticidas em ambientes alagados pode ser apontado como uma alternativa para estudos, sem a implicação da contaminação de lençóis freáticos, uma vez que as condições simuladas em laboratório apresentam similaridade com a observada em campo.

5. Referências

- Anschutz, P.; Smith, T.; Mouret, A.; Deborde, J.; Bujan, S.; Poirier, D.; Lecroart, P. (2009) Tidal sands as biogeochemical reactors. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 84, 1, 84-90.
- Araújo, A.S.F.; Monteiro, R.T.R.; Abarkeli, R.B. (2003) Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52, 1, 799-804.
- Baptista, S. J.; Cammarota, M. C.; Freire, D. D. C. (2005) Production of CO₂ in crude oil bioremediation in clay soil.

- Brazilian archives of biology and technology, 48, 1, 249-255.
- Beer, D.; Haeckel, M.; Neumann, J.; Wegener, G.; Inagaki, F.; Boetius, A. (2013) Saturated CO₂ inhibits microbial processes in CO₂-vented deep-sea sediments. *Biogeosciences Discuss*, 10, 1899-1927.
- Busse, M.D.; Ratcliff, A.W.; Shestak, C.J.; Power, R.F. (2000) Non-target effects of glyphosate on soil microbes. Pacific Southwest Research Station, USDA Forest Service. *Proceeding of the California Weed Science Society*, 52, 146-150.
- Conrad, R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews*, 60; 4; 609 -640.
- Conrad, R.; Noll, M.; Claus, P.; Klose, M.; Bastos, W.R. e Enrich-Prast, A. (2011). Stable carbon isotope discrimination and microbiology of methane formation in tropical anoxic lake sediments. *Biogeosciences*, 8, 1, 795-814.
- De-Campos, A.B.; Mamedov, A.I.; Huang, C. (2009) Short-term reducing conditions decrease soil aggregation. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 73, 550-559.
- De-Campos, A.B.; Huang, C.H.; Johnston, C.T. (2012) Biogeochemistry of terrestrial soils as influenced by short-term flooding. *Biogeochemistry*, 111, 1-3, 239-252.
- De Jong, J.; Soga, K.; Banwart, S.A.; Whalley, R.; Ginn, T.R.; Nelson, C.R.; Mortensen, B.M.; Martinez, B.C.; Barkouki, T. (2011) Soil engineering in vivo: harnessing natural biogeochemical systems for sustainable, multi-functional engineering. *J. R. Soc. Interface*, 8, 1-15.
- Druille, M.; Cabello, M.N.; Omacini, M.; Golluscio, R.A. (2013). Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 64, 1, 99-103
- Faulwetter, J.L.; Gagnon, V.; Sundberg, C.; Chazaren, F.; Burr, M.D.; Brisson, J.; Camper, A.K.; Stein, O.R. (2009) Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. *Ecological Engineering*, 35, 1, 987-1004.
- Haider, K; Schaffer, A. (2009) *Soil biochemistry*. Science Publishers, 112 p.
- Han, H.; Hemp, J.; Pace, L.A.; Ouyang, H.; Ganesan, K.; Roh, J.H.; Daldal, F.; Blanke, S.R.; Gennis, R.B. (2011) Adaptation of aerobic respiration to low O₂ environments. *PNAS*, 108, 34, 14109-14114.
- Hunter, K.S.; Wang, Y.; Cappellen, P.V. (1998). Kinetic modeling of microbially-driven redox chemistry of subsurface environments: coupling transport, microbial metabolism and geochemistry. *Journal of Hydrology*, 209, 53-80.
- Megonigal, J.P., Hines, M.E.; Visscher, P.T. (2004) Anaerobic Metabolism: Linkages to trace gases and aerobic processes. Pag. 317 - 424 In: Schlesinger, W.H. (editor). *Biogeochemistry*. Elsevier - Pergamon, Oxford, UK.
- Paul, E.A.; Clark, F.E. (1989) *Soil Microbiology and Biochemistry*. United Kingdom Edition published by Academic Press Limited, United States of America (USA), 273p.
- Peoples, M.; Adams, D.J. (2010). *Electro-biochemical reactor for removal of metals and nitrates*. Society for mining, metallurgy and exploration - SME. The University of Utah, 5p.
- Peter, V; Conrad, R. (1996) Sequential reduction processes and initiation of CH₄ production upon flooding of oxic upland soils. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 3, 371-382.
- Picek, T.; Simek, M.; Santruckova, H. (2000) Microbial responses to fluctuation of soil aeration status and redox conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 31, 1, 315-322.
- Richardson, J.L.; Vepraskas, M.J. (2001) *Wetland soils: Genesis, Hydrology, Landscapes and Classification*. CRC Press LLC; International Standard Book, 417 Florida - USA, 417p.
- Sagarkar, S; Nousiainen, A.; Shaligram, S.; Bjorklof, K; Lindstrom, K; Jorgensen, K.S.; Kapley, A. (2014) Soil mesocosm studies on atrazine bioremediation. *J. Environ. Manage.* 139, 1, 208-216.
- Sauer, P.; Glombitza, C.; Kallmeyer, J. (2012) A system for incubations at high gas partial pressure. *Frontiers in Microbiology - extreme microbiology*, 3, 25.
- Scalenghe, R.; Edwards, A.C.; Marsan, F.A.; Barberis, E. (2002) The effect of reducing condition on the solubility of phosphorus in a diverse range of European Agricultural Soils. *European Journal of Soil Science*, 53, 1, 439-337.
- Schnurer, Y.; Persson, P.; Nilsson, M.; Nordgren, A. Giesler, R. (2006) Effects of surface sorption on microbial degradation of glyphosate. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1, 4145-4150.
- Singh, B.K.; Kuhad, R.C.; Singh, A.; Lal, R.; Tripathi, K.K. (1999) *Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms*. CRC Press LLC, p. 197-225.
- Waggoner, P. S.; Craighead, H. G. (2007) Micro- and nanochemical sensors for environmental, chemical, and biological detection. *Lab Chip - The Royal Society of Chemistry*, 7, 1238-1255.