



EFEITO DO COBRE EM CONSÓRCIO BACTERIANO MARINHO

Machado A.C.M

Chequer L.; Crapez, M.A.C.

Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Marinha, Outeiro de São João Batista, s/n^o, CEP 24020 - 140, Campus Valonguinho, Niterói, RJ. Brasil. *(ana_plack@hotmail.com, , luchequer@terra.com.br, mirian@vm.uff.br)

INTRODUÇÃO

A lixiviação de metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos acarreta graves problemas nas áreas urbanas e industriais. A biodisponibilidade desses contaminantes é dependente de sua interação com as matrizes inorgânica e orgânica de cada ambiente (Jalkanen *et al.*, , 2000).

As bactérias interagem com os metais desde a sua superfície, denominada parede celular. São os agentes primários das mudanças geoquímicas graças a sua grande área/volume, distribuição, alto potencial metabólico (diversidade enzimática e nutricional), taxa de crescimento e possibilidades de adaptação. Ao mesmo tempo em que a superfície bacteriana pode se ligar aos metais, ela também sofre variações físico - químicas em função da diversidade de vias metabólicas e suas respectivas taxas e a velocidade do tempo de geração bacteriana (Warren & Haack, 2001 & Branda *et al.*, , 2005).

Os biofilmes são estruturas biológicas produzidas por bactérias, algas, fungos e micro fauna, em contato físico próximo, imersos em uma matriz de mucopolissacarídeos extracelular (Decho *et al.*, , 2003). A existência bacteriana está intimamente ligada à formação de biofilmes, que concentram três vezes mais matéria orgânica que o sedimento e a diferença de afinidade dos metais entre estes dois compartimentos contribui para os processos de absorção/dessorção (Schorer & Eisele, 1997).

Segundo Ledin, (2000), os microrganismos podem criar vias alternativas de interação com os metais como a transformação por processos redox ou alquilação; acumulação por adsorção passiva, independente do metabolismo, ou ativa, dependente do metabolismo; produção ou liberação de substâncias orgânicas/inorgânicas, que podem mudar a mobilidade dos metais; participação na ciclagem do carbono, em função da formação de complexos orgânicos/metál.

Os metais pesados de fontes naturais e antropogênicas são continuamente lançados nos ecossistemas aquáticos, causando grandes ameaças a esses ambientes devido a sua toxicidade, longa persistência, bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica (Eisler, 1988), podendo atingir os níveis su-

periores da cadeia alimentar. Com isso, algumas espécies de peixes são consideradas potenciais bioindicadores no monitoramento ambiental, pois são altamente sensíveis ao cobre (Mazon, 1997) sendo esses organismos também utilizados na alimentação.

Metais não são biodegradáveis e só podem ser transformados de um estado químico para outro. A definição de tolerância aos metais está ligada à habilidade intrínseca do organismo e a resistência, à habilidade do organismo de viver em presença de metais, porque possui mecanismos de detoxificação, produzidos como resposta direta a um determinado metal. (Ledin, 2000).

A presença de elevadas concentrações de metal no solo pode exercer pressão seletiva na comunidade bacteriana, aumentando a tolerância e espécies microbianas resistentes. O melhor critério para estimar a toxidez do metal é o uso da relação entre dose - resposta e a concentração tolerada pela comunidade bacteriana (Baath *et al.*, , 1998).

OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo verificar se o cobre pode se tornar não biodisponível ao se ligar preferencialmente aos exopolímeros presentes nos biofilmes, não alterando o ciclo vital da biomassa bacteriana. Essa adaptação será estudada através da quantificação da atividade das enzimas desidrogenases em função do carbono bacteriano.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Consórcios de Bactérias e manutenção dos meios de cultura

Foram utilizados consórcios bacterianos isolados de sedimento de praia da Praia do Flamengo, Rio de Janeiro - RJ.

Os meios de cultura com as bactérias isoladas da Praia do Flamengo foram mantidos em erlenmeyers de 125mL contendo 50mL de meio de cultura com água do mar a 50%, 2g/L de amido.

Todos os meios de cultura foram autoclavados a uma atmosfera por 15 minutos.

3.2 - Bioensaio

Soluções de cobre (Cu^{+2}) 51 ppm (valor médio encontrado no sedimento na Enseada de Jurujuba) (Baptista Neto, 2004) foram utilizadas no bioensaio com os consórcios bacterianos. A concentração de 0,005 mg/L é o máximo permitido para águas salinas classificadas como classe 1 (CONAMA n.º 357 do ano de 2005).

Para a obtenção da concentração de 51,0 mg/L de cobre, foi utilizado o sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

O meio de cultura utilizado no bioensaio foi o mesmo usado para o isolamento dos consórcios bacterianos do sedimento da Praia do Flamengo/RJ, conforme descrito no item 2.1.

O bioensaio foi realizado em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura. O controle recebeu somente a inoculação das bactérias e o tratamento, além das bactérias, foi adicionado 50l da solução de Cu^{+2} (51 ppm). A solução de Cu^{+2} (51 ppm) foi adicionada 24 horas após a inoculação das bactérias no meio de cultura.

As análises realizadas foram atividade das enzimas esterases (EST), atividade do sistema transportador de elétrons (ASTE) e de carbono orgânico bacteriano (COB) nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas tanto no controle quanto no tratamento.

3.3 - Quantificação da atividade das enzimas esterases (EST)

A determinação das esterases foi realizada por espectrofotômetro óptico, baseado em Stubberfield *et al.*, (1990). O método é baseado na estimativa da fluorescência produzida em amostras (solo, água, etc.) tratadas com solução de diacetato de fluoresceína e incubadas a 24°C.

Esterases são enzimas capazes de hidrolisar ligações ésteres de proteínas, lipídeos e carboidratos transformando em moléculas de até 600 Da, para posteriormente serem metabolizadas.

3.4 - Quantificação da atividade do sistema transportador de elétrons (ASTE)

A determinação da ASTE foi realizada segundo Trevors (1984) e Hourri - Davignon & Relexans (1989). O método é baseado na mudança de coloração do 2 - [(*p* - iodofenil) - 3 - (*p* - nitrofenil) - 5 - fenil tetrazolium] como acceptor artificial de elétrons, que é o INT. O produto da reação é o INTF (cloreto de iodonitrotetrazolium formazan).

As desidrogenases são enzimas intracelulares e sua atividade está diretamente ligada à respiração e conseqüentemente geração de ATP, estando diretamente relacionada com a biomassa.

Vários trabalhos têm demonstrado que as desidrogenases são utilizadas para avaliar a toxicidade dos hidrocarbonetos de petróleo, pesticidas e metais na qualidade microbiológica dos solos (Baath, 1989, Kizilkaya *et al.*, ., 2004, Mora *et al.*, ., 2005, Shen *et al.*, ., 2005).

3.5 - Quantificação de biomassa bacteriana viável

Na numeração de células foi utilizado microscópio de epifluorescência (Zeiss, mod. Axiosp 1) (Kepner e Pratt, 1994) com o cromóforo laranja de acridina e a quantificação do carbono bacteriano (g C.g^{-1}) foi realizada segundo Carlucci, *et al.*, (1986).

3.6 - Imagem com Microscopia eletrônica de varredura ambiental

Para obtenção de imagens dos consórcios bacterianos, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) ambiental. Ele produz imagens de alta definição através de um feixe de elétrons e com uma pressão próxima a ambiental, suportada por organismos vivos não sendo necessário nenhum tipo de preparação da amostra.

RESULTADOS

As bactérias do consórcio marinho, crescidas em presença de cobre, concentração de 51 mg/L, apresentaram maior biomassa no bioensaio controle até T24 horas (0,13 g C.cm^{-3}). A partir de T48 horas, a biomassa foi para 1,30 g C.cm^{-3} , em presença de cobre. Em T96 horas, o bioensaio controle e o experimento apresentaram biomassa de 1,03 e 0,62 g C.cm^{-3} , respectivamente.

A atividade das enzimas esterases apresentou valores iguais para controle e tratamento em T24 horas de bioensaio (0,008 g $\text{O}_2/\text{h/g}$). A adição de cobre às 24 horas, fez com que a atividade enzimática decrescesse para (0,018 g $\text{O}_2/\text{h/g}$), passando a 0,026 g $\text{O}_2/\text{h/g}$ em T72 horas.

A atividade das enzimas desidrogenases no bioensaio controle manteve estável até T72 horas (0,008 - 0,010 g $\text{O}_2/\text{h/g}$). A adição do cobre às 24 horas, provocou redução na atividade para 0,001 g $\text{O}_2/\text{h/g}$ até T72 horas. Entretanto, a atividade aumentou no T96 horas (0,012 g $\text{O}_2/\text{h/g}$).

Nas imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura foi possível a visualização de bactérias nos sulcos dos grãos de areia da Praia do Flamengo, onde foi coletado sedimento para a realização das culturas bacterianas. Juntamente com as bactérias foi observado óleo e cristais de sal.

CONCLUSÃO

O consórcio bacteriano, isolado da Praia do Flamengo, em presença de cobre dissolvido, concentração de 51mg/L, apresentou crescimento da biomassa e da atividade das enzimas que fazem a hidrólise da matéria orgânica (esterases) bem como das responsáveis pela síntese de energia (desidrogenases). Esse fenômeno adaptativo está indicando a resistência bacteriana à concentrações crescentes de metais, mas também informa sobre a biodisponibilidade do cobre para outros níveis tróficos, através da predação da biomassa bacteriana pelos nanoprotistas bacterívoros e mesoprotistas zooplantônicos.

REFERÊNCIAS

- Baath, 1989. E. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water Air Soil Pollut.*, 47:335 - 379.
- Baath, E., Diaz - Raviña, M., Frostegard, A., Campbell, C., 1998. Effects of metal - rich sludge on the soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:238 - 254.

- Baptista Neto, J.A.; Crapez, M.; Mcalister, J.J., and Vilela, C.G., 2004.** Concentration and bioavailability of heavy metals in sediments from Niterói Harbour (Guanabara Bay/S.E. Brazil). *Journal of Coastal Research*, 20(0), 10em. West Palm Beach (Florida), ISSN 0749 - 0208.
- Branda, S. S., Vik, A., Friedman, L. and Kolter, R., 2005.** Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*. Vol 13 n^o 1, 20 - 27.
- Carlucci, A.F; Craven, D.B; Robertson, D.J. & Williams, P.M., 1986.** Surface - film microbial populations diel amino acid metabolism, carbon utilization and growth rates. *Marine Biology*, 92:289 - 297.
- Chequer, L., 2008.** Fito - biorremediação em área de mangue impactada por petróleo. Dissertação de Graduação. Faculdades Integradas Maria Thereza, Niterói. Rio de Janeiro.
- Decho AW, Kawaguchi T, Allison MA, Louchard EM, Reid RP, Stephens FC, Voss KJ, Wheatcroft RA, Taylor BB., 2003.** Sediment properties influencing upwelling spectral reflectance signatures: The “biofilm gel effect” *Limnol. Oceanogr.*, 48(1, part 2), p. 431–443.
- Eisler R., 1988.** Zink Harzards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *US Fish Wildlife Serv. Biol. Rep.*, vol 85.
- Houri - Davignon, C. & Relexans, J - C., 1989.** Measurement of actual electron transport system (ETS). Activity in marine sediments by incubation with INT. *Environmental Technology Letters*, 10:91 - 100.
- Jalkanen, L., Mäkinen, A., Häsänen, E., Juhanoja, J., 2000.** The effect of large anthropogenic particulate emissions on atmospheric aerosols, deposition and bioindicators in the eastern Gulf of Finland region. *Sci. Total Environ.* 262:123 - 136.
- Kepner, Jr., Pratt, J.R., 1994.** Use fluorochromes for direct enumerations of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews*, 58:603 - 615.
- Kizilkaya, R., Aaskin, T., Bayrakli, B., Saglam, M., 2004.** Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. *Europ. J. Soil Biol.* 40:95 - 102.
- Ledin, M., 2000.** Accumulation of metals by microorganism-processes and importance for soil systems. *Earth Science Reviews*, 51: 1 - 31.
- Mazon, A. F., 1997.** Efeito dos íons cobre sobre Curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. São Paulo.
- Mora, A.P., Ortega - Calvo, J.J., Cabrera, F., Madejón, E., 2005.** Changes in enzyme activities and microbial biomass alter “in situ” remediation of a heavy metal contaminated soil. *Appl. Soil Ecol.*, 28:125 - 137.
- Schorer, M., Eisele, M., 1997.** Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilms in the aquatic environment. *Water Air Soil Pollut.* 99:651 - 659.
- Shen, G., Lu, Y., Zhou, Q., Hong, J., 2005.** Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzymes. *Chemosphere* (corrected proof).
- Stubberfield, L.C.F. & Shaw, P.J.A., 1990.** *J. Microbiological Methods* 12:151 - 162 (Papyrus n0 316)
- Trevors, J., 1984.** Effect of substrate concentration, inorganic nitrogen, O₂ concentration, temperature and pH on dehydrogenase activity in soil. *Water Research*, 77:285 - 293.
- Warren, L.A., Haack, E.A., 2001.** Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. *Earth - Science Reviews* 54:261 - 320.