

**DOSAGEM DE PROTEÍNAS COMO
MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
HIDROCARBONOCLÁSTICA DE COMUNIDADE
MICROBIANA AUTÓCTONE EM SEDIMENTOS
MARINHOS**

M.A.C. Crapez

Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, RJ

D.C. Pereira

Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, RJ

Z.T. Tosta

Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, RJ

M.M. Souza

Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, RJ

ABSTRACT

Three xenobiotics, benzene, toluene and benzoic acid (1, 5, 10 and 15 mM) were assayed as substrates to indigenous microbial community of marine intertidal sediments sampled from a beach near Niterói's ferryboat station, at Guanabara bay, Rio de Janeiro (22° 53' 36" S and 43° 07' 30" W). The microbial population, especially the hydrocarbon degraders, was evaluated by Lowry's protein method. Benzene had an inhibitory effect on microbial biomass when its concentration increases from 1 to 15 mM. Considering the 15mM concentration, the benzoic acid and toluene showed the higher biomass on the 19th and 5th days, respectively. The presence of toluene or benzoic acid (1-, 5-, 10- and 15 mM) in the culture medium induced an increasing on the microbial biomass between 119 and 910%. The Lowry's protein method may be a practical and reliable alternative to the usual microbiological methods used to estimate the microbial biomass exposed to xenobiotics.

RESUMO

O aumento de biomassa hidrocarbonoclástica em amostras de sedimentos marinhos que receberam ácido benzóico, tolueno ou benzeno, *in vitro*, nas concentrações de 1, 5, 10 e 15mM, foi avaliado pelo método de Lowry para dosagem de proteínas. As amostras foram coletadas na interface água/sedimento, no limite do batimento das águas da praia adjacente à Estação Hidroviária de Niterói, localizada na Baía de Guanabara, RJ (22° 53' 36" S e 43° 07' 30" W). Os resultados sugerem que o ácido benzóico e o tolueno foram utilizados como fontes de carbono e de energia pela microbiota, pois verificou-se aumento de biomassa nas diferentes concentrações de substratos aromáticos adicionados. O benzeno revelou-se como o xenobiótico mais tóxico à microbiota, visto que em todas as concentrações utilizadas ocorreu decréscimo de biomassa. A biomassa apresentou níveis mais elevados entre o máximo de 19 dias para ácido benzóico 15mM e o mínimo de 5 dias para tolueno 15mM, com aumento percentual de 351%. Ácido benzóico 5mM, tolueno 1mM e 5mM aumentaram, em 7 dias, a biomassa hidrocarbonoclástica em 193%, 119% e 128%, respectivamente, em relação aos controles. Com tolueno 10mM houve aumento de 196%, em 10 dias. O sistema que apresentou maior aumento de biomassa foi o do ácido benzóico 10mM, com 910% em 9 dias. O método de Lowry para dosagem de proteínas mostrou-se adequado para quantificar a microbiota hidrocarbonoclástica apta a biodegradar ácido benzóico e tolueno. Sendo assim, a dosagem de proteínas poderá ser utilizada, tanto na avaliação, como na monitorização de ambientes impactados, pois poderão ser acompanhados o aparecimento e a aclimação de microbiota específica, antes que ela possa ser detectada pelos métodos microbiológicos convencionais.

INTRODUÇÃO

A biodegradação é o mecanismo primário pelo qual os hidrocarbonetos e as substâncias aromáticas são eliminados do meio ambiente (Alexander, 1981; Crapez, 1982). As comunidades naturais de microorganismos reconhecem as substâncias xenobióticas, metabolizando-as completamente, desde que haja exposição prévia à(s) fonte(s) poluidora(s) (Crapez et al., 1989; Crapez et al., 1993), condições físico-químicas e nu-

trientes adequados (Swindoll et al., 1988; Rijnaarts et al., 1990). O fenômeno de reconhecimento induz a uma seleção inicial, adaptação, aclimação e proliferação de microbiota autóctone especializada. A aquisição adaptativa de vias de degradação de substâncias xenobióticas tem sido demonstrada em bactérias de diversos ecossistemas (Barkay & Pritchard, 1988; Madsen et al., 1991). Então, a sobrevivência das espécies, que compõem a microbiota, está ligada à habilidade de se adapta-

rem ao estresse ambiental.

As metodologias, comumente utilizadas em microbiologia, para a monitorização de ambientes potencialmente impactados, são de execução demorada, com obtenção de resultados após dias de incubação e ineficientes para evidenciar todas as bactérias viáveis *in vitro* (Roszak & Colwell, 1987). Em verdade, os métodos de numeração do crescimento *in vitro* são seletivos e não abrangem o estudo da totalidade da comunidade bacteriana (Sieburth,

1967). Em laboratório, as bactérias são cultivadas, geralmente, em meio líquido; contudo, o meio ambiente é bem mais complexo, sendo que a superfície do solo ou do sedimento são os maiores sítios da atividade microbiana (van Loosdrecht et al., 1990). No intuito de minorar tais dificuldades, existe uma tendência de se escolher metodologias sensíveis para monitorar o estresse ambiental, que detectem alterações metabólicas iniciais em organismos expostos a um amplo espectro de substâncias tóxicas, mesmo em baixas concentrações. Os métodos de dosagem de proteínas permitem uma avaliação precisa da variação de biomassa microbiana, evitando os métodos de numeração e de isolamento. São de fácil execução e bastantes sensíveis (Klinkenberg & Schiewer, 1991; Melchiorri-Santolini et al., 1991; Kajan et al., 1992). Até então, não havia sido verificada a validade desse método para acompanhar a resposta da microbiota, submetida a agentes estressantes, em um microcosmo. Sendo assim, foi escolhido o método de Lowry para determinar o impacto causado por substâncias aromáticas, em concentrações xenobióticas, na microbiota autóctone de sedimentos marinhos (Lowry et al., 1951). Conhecendo-se a importância dos sedimentos como microhabitats para as bactérias marinhas, realizamos experimentos com amostras de sedimento coletados na praia adjacente à Estação Hidroviária de Niterói, localizada na Baía de Guanabara, RJ (22° 53' 36" S e 43° 07' 30" W).

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sedimen-

to foram coletadas na interface água/sedimento, no limite do batimento das águas na praia, em profundidade de 0-10cm, pesadas, distribuídas em frascos de rolha esmerilhada e incubadas à temperatura ambiente, tendo, como fonte de carbono, ácido benzóico, tolueno ou benzeno, nas concentrações de 1, 5, 10 e 15mM. Os grupos controle continuam apenas a matéria orgânica endógena do sedimento como fonte de carbono e de energia.

As bactérias adsorvidas ao sedimento foram desagregadas por agitação mecânica durante trinta minutos (Doria & Bianchi, 1982), em solução de NaOH 0,2N. Em seguida, fez-se filtração em papel Whatman nº 1. A biomassa bacteriana foi estimada pela metodologia de dosagem de proteínas (Lowry et al., 1951), realizada em triplicata, em intervalos de tempo regulares durante 30 dias para cada substrato testado. Os controles da reação química

entre as substâncias aromáticas e o reagente para dosagem de proteínas foram utilizados para calibrar a leitura espectrofotométrica.

RESULTADOS

O ácido benzóico e o tolueno foram utilizados como fontes de carbono e de energia pela microbiota do sedimento estudado, sendo que o aumento da concentração dos substratos aromáticos foi seguido por aumento de biomassa hidrocarbonoclástica (Figs. 1 e 2). A análise estatística pelo teste *t* de Student evidenciou os seguintes valores de *p*: ácido benzóico 1mM ($p=0,0098^*$), 5mM ($p=0,0030^{**}$), 10mM ($p=0,0242^*$) e 15mM ($p<0,0001^{***}$); tolueno 1mM ($p=0,0022^{**}$), 5mM ($p<0,0001^{***}$), 10mM ($p<0,0001^{***}$) e 15mM ($p<0,0001^{***}$).

O benzeno, como fonte de carbono, revelou-se como o

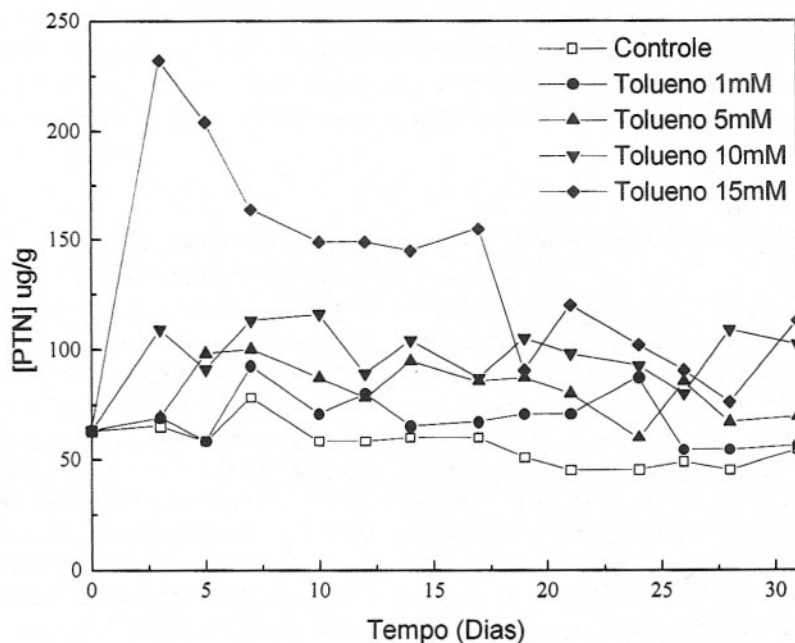


Figura 1 - Biomassa ([PTN]µg/g) e degradação de tolueno (1, 5, 10 e 15mM) em sedimento marinho ao longo de 31 dias de incubação.

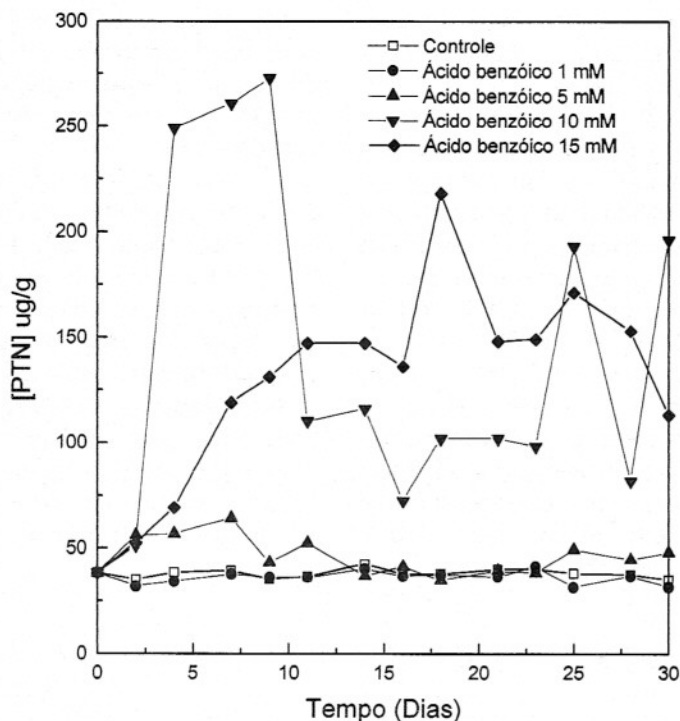


Figura 2 - Biomassa ([PTN] µg/g) e degradação de ácido benzóico (1, 5, 10 e 15 mM) em sedimento marinho, ao longo de 30 dias de incubação.

xenobiótico mais tóxico à microbiota do local estudado, visto que, nas concentrações 1, 5, 10 e 15 mM, ocorreu decréscimo de biomassa no bioensaio realizado. Na concentração de 1 mM, foram obtidas 49,3 µg g⁻¹ de proteínas em 9 dias; com 5 mM, 48,0 µg g⁻¹ de proteínas em 14 dias; com 10 mM, 46,7 µg g⁻¹ de proteínas em 16 dias e com 15 mM, 45,8 µg g⁻¹ de proteínas em 12 dias (Tabela 1).

A biomassa microbiana, caracterizada na população hidrocarbonoclástica, apresentou níveis mais elevados entre o máximo de 19 dias para ácido benzóico 15 mM e o mínimo de 5 dias para tolueno 15 mM (Figs. 1 e 2). O aumento percentual da biomassa hidrocarbonoclástica para os dois substratos citados foi de 351% em relação aos controles de cada experimento. Os substratos ácido benzóico 5 mM, tolueno 1 mM e 5 mM fo-

ram utilizados como fontes de carbono, aumentando, em 7 dias, a biomassa hidrocarbonoclástica em 193%, 119% e 128%, respectivamente, em relação aos controles. Com tolueno 10 mM, houve aumento de 196% de biomassa espe-

cífica em 10 dias (Fig. 1). O sistema que apresentou maior aumento de biomassa hidrocarbonoclástica foi o do ácido benzóico 10 mM, com o percentual de 910% em 9 dias (Fig. 2). Após o provável esgotamento das fontes de carbono, todos os sistemas entraram em declínio, com sensível queda na concentração de proteínas, indicando a substituição da população hidrocarbonoclástica por outras heterotróficas, que se nutriram da matéria orgânica acumulada com a morte das bactérias da primeira fase.

Ácido benzóico 1 mM foi utilizado como fonte de carbono, mas a sua concentração não permitiu aumento significativo de células bacterianas; esse resultado só foi obtido a partir da concentração de 5 mM (Fig. 2). O crescimento de biomassa com tolueno 1 mM foi significativo.

O aumento de biomassa bacteriana, quantificada pela dosagem de proteínas, foi verificada desde o segundo dia de incubação, tanto para o ácido benzóico, como para o tolueno, nas concentrações testadas.

Tabela 1 - Biomassa (*[PTN] µg/g) e degradação de benzeno (1, 5, 10 e 15 mM) em sedimentos marinhos ao longo de 31 dias de incubação.

TEMPO DE INCUBAÇÃO (dias)	CONTROLE [PTN]*	1mM [PTN]*	5mM [PTN]*	10mM [PTN]*	15mM [PTN]*
0	32,4	32,4	32,4	32,4	32,4
2	41,9	34,9	36,0	37,5	37,9
5	34,1	36,3	44,5	38,2	40,6
7	40,0	34,8	42,9	41,2	44,0
9	34,5	49,3	40,0	38,5	41,4
12	36,1	33,4	39,2	45,3	45,8
14	37,1	37,2	48,0	40,0	45,0
16	37,1	35,6	42,3	46,7	40,7
19	42,5	48,4	40,3	43,3	42,5
21	29,3	30,4	34,8	37,2	41,0
26	31,0	33,8	40,6	32,1	32,7
28	30,4	33,8	37,2	30,4	30,4
31	37,2	30,4	30,4	27,0	30,4

CONCLUSÃO

O método de Lowry foi eficaz para quantificar a biomassa microbiana em microcosmos de sedimento marinho, contendo aromáticos como fontes de carbono e de energia. Ao contrário de métodos clássicos de crescimento *in vitro*, o aumento de biomassa já foi determinado desde as primeiras 48 horas de incubação. Este resultado está em acordo com o observado por Spain & Van Veld (1983), que estudaram o tempo de aclimação de comunidades microbianas ao

p-nitrofenol, medindo a respiração celular através de precursor radioativo.

A microbiota aclimatada, estimulada pela presença de aromáticos em concentrações xenobióticas, tem potencial de biodegradação para ácido benzóico e tolueno nas concentrações de 1, 5, 10 e 15mM (Spain et al., 1980; Crapez, 1982; Crapez et al., 1989; Crapez et al., 1993). Sendo assim, o aumento de biomassa, aferido pelo método de Lowry e na presença de substâncias letais aos organismos, indica que populações microbianas

autóctones especializadas já ocorrem em número significativo no ambiente e que, contaminado, tem capacidade de se autodepurar.

O método também evidenciou que os sedimentos não continham microbiota aclimatada para degradar benzeno nas concentrações testadas. A aclimação simultânea da microbiota para moléculas estruturalmente correlatas, como descrito por Wiggins & Alexander (1988) e Alexander (1994), ainda não foi estabelecida no ambiente estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. (1981) Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, **211**:132-138.
- ALEXANDER, M. (1994) Biodegradation and bioremediation. Academic Press, Inc., p.16-40.
- BARKAY, T. & PRITCHARD, H. (1988) Adaptation of aquatic microbial communities to pollutant stress. *Microbiol. Sci.*, **5**:165-169.
- CRAPEZ, M.A.C. (1982) Isolement à partir du sol et étude de bactéries aérobies sporullées dégradant composés aromatiques. Tese de doutorado em Bioquímica e Biologia Celular, Université D'Aix-Marseille II, França, p.1-76.
- CRAPEZ, M.A.C.; TOSTA, Z.T.; BISPO, M.G.S. (1989) Filtros biológicos. *Ciência Hoje*, **10**:10-11.
- CRAPEZ, M.A.C.; MESQUITA, A.C.; OLIVEIRA, C.J.L. (1993) Distribution of microbial population and biodegradation of aromatic compounds in Ilha Grande Bay, Rio de Janeiro, Brazil. Third Latin American Cong. Org. Geochem., p.35-36.
- DORIA, E.V. & BIANCHI, A. (1982) Comparaison de deux méthodes d'extraction des bactéries des sédiments marins. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **294**:467-470.
- KAJAN, M.; LIVANSKY, K.; BINOVA, J.; FISER, L.; NOVOTNY, P. (1992) Productivity, heavy metal content and comensalic bacteria of the alga *Scenedesmus obliquus* in outdoor mass cultures grown with various nitrogen sources. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, **93**:93-104.
- KLINKENBERG, G. & SCHIEWER, U. (1991) Influence of nutrients on bacterial production in enclosure experiments. *Kiel-Meeresforsch Sonderh.*, **8**:274-277.
- van LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; ZEHNDER, A.J.B. (1990) Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.*, **54**:75-87.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275.
- MADSEN, E.L.; SINCLAIR, J.L.; GHIORSE, W.C. (1991) In situ biodegradation: microbiological patterns in a contaminated aquifer. *Science*, **252**:830-833.
- MELCHIORRI-SANTOLINI, U.; CONTESINI, M.; DE-MARGARITIS, B.; PINOLINI, M.L.; TOZZI, S.; ZANETTA, A. (1991) Particulate organic matter as agent in transport of inorganic nutrients to the food chain. *Doc. Ist. Ital. Idrobiol.*, **30**:25-32.
- RIJNAARTS, H.H.M.; BACHMANN, A.; JUMELET, J.C.; ZEHNDER, A.J.B. (1990) Effect of the desorption and intraparticle mass transfer on the aerobic biomineralization of hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil. *Environ. Sci. Technol.*, **24**: 1348-1354.
- ROSZAK, D.B. & COLWELL, R.R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, **51**: 365-379.

- SIEBURTH, J.M. (1967) Seasonal selection of estuarine bacteria by water temperature. *Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **1**:98-121.
- SPAIN, J.C. & VAN VELD, P.A. (1983) Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure, time, inoculum and chemical structures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**:428-435.
- SPAIN, J.C.; PRITCHARD, P.H.; BOURGUIN, A.W. (1980) Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment water cores from estuarine and freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**:726-734.
- SWINDOLL, C.M.; AELION, C.M.; PFAENDER, F.K. (1988) Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:212-217.
- WIGGINS, B.A. & ALEXANDER, M. (1988) Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:2803-2807.