



## Biopolímeros e geomicrobiologia de dois testemunhos da enseada de Jurujuba - Baía de Guanabara (RJ)

F.S. Silva<sup>1</sup>, M.A. Barcelos<sup>2</sup>, E. Monteiro<sup>1</sup>, M.A.C. Crapez<sup>2</sup>, J.A. Baptista-Neto<sup>1</sup>, N. Krepsky<sup>1</sup>, L.F. Fontana<sup>1</sup>, F. Savergnini<sup>2</sup>, L.V. Guerra<sup>2</sup> & J.A. Bitencourt<sup>2</sup>

<sup>1</sup> PPG em Geologia e Geofísica Marinha, Instituto de Geociências, Universidade Federal Fluminense. E-mail: fred@igeo.uff.br / jneto@igeo.uff.br

<sup>2</sup> PPG em Biologia Marinha, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense. E-mail: mirian@vm.uff.br

**Abstract** The aim of this work was to quantify biopolymers associated to esterases enzymes and identify the bacterial respiratory activity in two cores of the Jurujuba Inlet, Guanabara Bay, RJ. The concentrations of the biopolymers were 1000 times less than it is presented in the literature, being necessary the creation and the establishment of indicative news eutrophication levels compatible to our coastal systems. The biochemical representative relations in the cores were equivalent to the ones described in the North Hemisphere for environments from coastal marine areas. The enzymes esterases in the sediment were shown efficient in the mineralization of the biopolymers, even with metabolic physiology, preferentially when they were anaerobic. Despite of incipient studies of the geomicrobiology, the results showed a possible application of the microbiology to better understand geological trials.

**Keywords:** Sediment; biochemical composition; esterase enzymes; bacterial respiratory activity; geomicrobiology.

**INTRODUÇÃO** A geomicrobiologia é o estudo dos micróbios e o papel que eles desempenham em inúmeros processos geológicos, tanto na superfície como em sub-superfície. Esses microrganismos incluem procariontes e eucariontes, sendo as bactérias responsáveis pelos processos de mineralização da matéria orgânica e outros elementos vitais inorgânicos (Ehrlich 2002).

Os sedimentos marinhos são intensamente colonizados por microorganismos (cianobactérias e bactérias <150µm). A maioria organizada em biofilmes e complexas associações, imobilizando as superfícies com matriz orgânica extracelular, que consiste em substâncias poliméricas extracelulares (EPS), criando microhabitats com gradientes biológicos, químicos e fisiológicos diferentes. Normalmente presente no sedimento em elevados números (10<sup>10</sup> células/g) (Meyer-Reil 1994, Meyer-Reil & Köster 2000).

Dell'Anno *et al.* (2002) explicam que o sedimento representa a "cópia" dos processos da coluna de água, sendo esse o local de armazenagem e acúmulo de matéria orgânica autóctone e alóctone.

A composição da matéria orgânica sedimentar é importante indicadora do estado trófico dos sedimentos marinhos. Essa matéria orgânica consiste de compostos refratários (detritos orgânicos que se acumulam) e compostos lábeis (aminoácidos e biopolímeros que são rapidamente consumidos pela microbiota). Os biopolímeros são compostos por proteínas, lipídeos e carboidratos que representam de

10 a 70% do carbono nos sedimentos (Pusceddu *et al.* 2004).

A matéria orgânica particulada pode ser decomposta em contato direto com as enzimas hidrolíticas bacterianas. Além do oxigênio, os microrganismos usam vias alternativas de aceptores de elétrons (nitrato, manganês, ferro, sulfato e dióxido de carbono) para oxidação do material orgânico. Essas habilidades combinadas com o crescimento logarítmico e o pequeno tempo de geração fazem com que os microorganismos possuam um alto potencial metabólico (Meyer-Reil 1994, Meyer-Reil & Köster 2000).

O objetivo deste trabalho foi quantificar os biopolímeros associados às enzimas esterases e identificar o metabolismo bacteriano em dois testemunhos da Enseada de Jurujuba, Baía de Guanabara-RJ.

**MATERIAL E MÉTODOS** Em julho e outubro de 2005, dois testemunhos de 2,45m (TA, em S 22°55'25,6" e W 43°06'34,6") e 2,15m (TB, em S 22°55'11,2" e W 43°06'11,9") foram coletados na enseada de Jurujuba, Baía de Guanabara, RJ (Fig. 1).

Os testemunhos foram coletados e levados ao laboratório para serem abertos e fatiados em seções (TA: 0-10, 30-35, 70-75, 100-105 e 240-245; TB: 0-10, 30-35, 40-45, 50-55, 70-80, 100-110, 140-145, 210-215) e serem feitas as análises a seguir descritas:

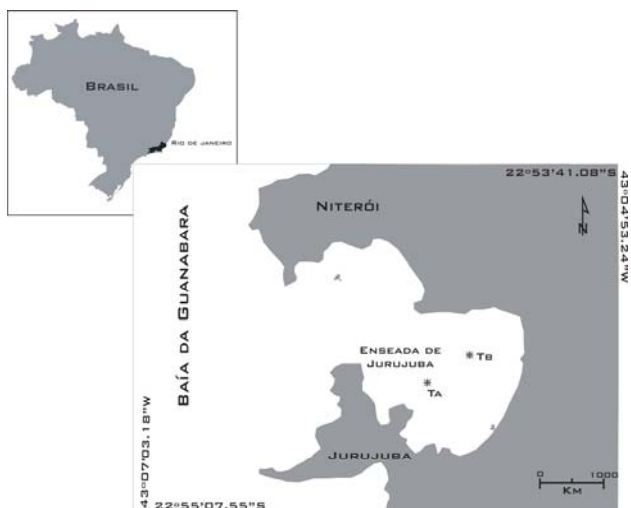


Figura 1: Localização dos testemunhos amostrados na Enseada de Jurujuba (Baía de Guanabara – RJ)

Os lipídeos totais foram extraídos com clorofórmio-metanol segundo Bligh & Dyer (1959) e Marsh & Weinstein (1966). Os resultados foram comparados aos padrões equivalentes ao tripalmitato. As proteínas foram analisadas seguindo a extração descrita em Hartree (1972), modificado por Rice (1982) compensado com Fenol e expresso com o padrão equivalente a da albumina bovina. Carboidratos foram analisados segundo Gerchacov & Hatcher (1972) e expresso com o padrão equivalente a glicose, baseado no princípio do método de Dubois *et al.* (1956), que não é específico para carboidratos em sedimentos. A fração solúvel do carboidrato sedimentar foi determinada segundo Pusceddu *et al.* (1999, 2004). Lipídeos, carboidratos e proteínas são convertidos em equivalentes de carbono usando os fatores de conversão equivalentes de 0,75, 0,40 e 0,49, respectivamente, em  $\mu\text{gC/g}$  (Fabiano & Pusceddu, 1998). A fração do carbono biopolimérico foi definida como o somatório dos carboidratos, proteínas e lipídeo (Fabiano *et al.* 1995).

A atividade das enzimas esterases ocorreu de acordo com Stubberfield & Shaw (1990). Essas enzimas atuam nos biopolímeros transformando em carbono orgânico de baixo peso molecular. O resultado é expresso em  $\mu\text{g fluoresceína/h/g}$  de sedimento.

A atividade respiratória bacteriana foi qualificada pelos processos de aerobiose e de fermentação utilizando meio de cultura contendo 2g/L de bactopectona; 15g/L de Agar; em água do mar à 75%; e 0,5mL de azul de metileno (solução saturada 1g/25mL água). A desnitrificação foi realizada utilizando o meio de cultura contendo 0,687g/L de  $\text{NaNO}_2$ ; 2g/L de bactopectona; em água do mar à 75%. Utilizou-se 5mL de meio por tubo de ensaio rosqueado, com tubo de Durhan. A sulfato-redução foi

feita utilizando-se o meio de cultura contendo 4g/L de lactato de sódio; 0,1g/L de ácido ascórbico; 0,2g/L de sulfato de magnésio; 0,01g/L de fosfato dipotássico; 0,2g/L de sulfato ferroso amoniacal; 10g/L de cloreto de sódio; 0,001g/L de resazurina sódica; 0,4906g/L de cisteína para 1L água deionizada (Alef & Nannipieri 1995).

**RESULTADOS** Os carboidratos totais no TA, aparecem variando entre 855-280  $\mu\text{g/g}$  de sedimento se mantendo em 530  $\mu\text{g/g}$  de sedimento nas faixas centrais do sedimento e caindo no final (Fig.2). No TB, na faixa de 0-10 cm há uma diminuição dos carboidratos comparada com o TA, e se mantém numa média de 446  $\mu\text{g/g}$  de sedimento até o final do testemunho (Fig. 3).

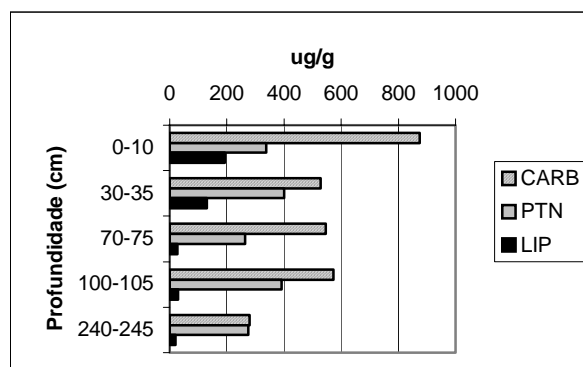


Figura 2. Distribuição de Carboidratos totais (CARB), proteínas totais (PTN) e lipídeos (Lip) ao longo do TA em  $\mu\text{g/g}$  de sedimento

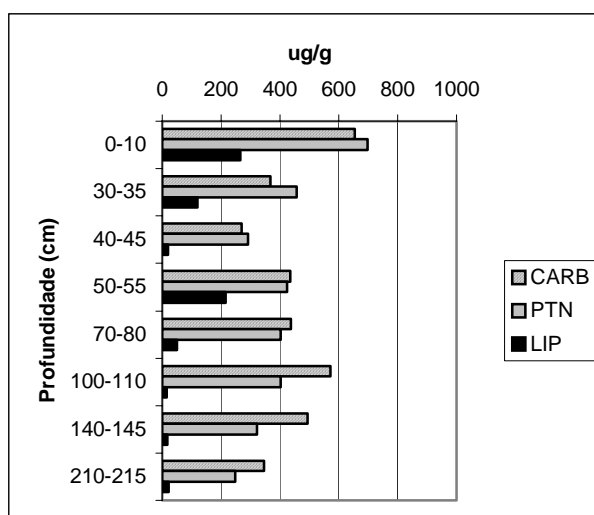


Figura 3. Distribuição de Carboidratos totais (CARB), proteínas totais (PTN) e lipídeos (Lip) ao longo do TB em  $\mu\text{g/g}$  de sedimento

As concentrações de totais de proteína no TA variaram entre 401-264  $\mu\text{g/g}$  de sedimento, mostrando

uma média de 333  $\mu\text{g/g}$  de sedimento e uma característica de queda ao longo do testemunho (Fig. 2). Já no TB, na faixa de 0-10 cm, tem-se um acúmulo de 2X mais proteínas, que oscila variando até 248  $\mu\text{g/g}$  de sedimento na faixa final (210-215 cm) do TB (Fig. 3).

Os lipídeos totais no TA, aparecem altos na faixa de 0-10 cm (192  $\mu\text{g/g}$  de sedimento), decaindo ao longo da profundidade e chegando a 20  $\mu\text{g/g}$  de sedimento na faixa de 240-245 cm. A média dos lipídeos encontrados foi de 80  $\mu\text{g/g}$  de sedimento (Fig. 2). No TB, ocorre o mesmo, em termos de decréscimo, sendo que há dois períodos, o primeiro iniciando em 0-10 cm (265  $\mu\text{g/g}$  de sedimento) e o segundo na faixa 50-55 cm (215  $\mu\text{g/g}$  de sedimento). A média foi de 90  $\mu\text{g/g}$  de sedimento (Fig. 3).

O carbono biopolimérico, que é o carbono dissolvido disponível para utilização pelos organismos, aparece praticamente 50% mais baixo para os carboidratos em todas as faixas, variando entre 350-112  $\mu\text{gC/g}$  de sedimento no TA (Fig. 4). E no TB, o mesmo fenômeno ocorre, variando entre 260-107  $\mu\text{g/g}$  de sedimento (Fig. 5).

As proteínas biopoliméricas aparecem na média de 163 e 198  $\mu\text{gC/g}$  de sedimento nos TA e TB, respectivamente (Figs. 4 e 5). E também mostraram que 50% da proteína total está disponível para a biota.

Os lipídeos biopoliméricos encontram-se em média de 60 e 67  $\mu\text{gC/g}$  de sedimento nos TA e o TB, respectivamente (Figs. 4 e 5). Porém, também ocorreram dois eventos de decréscimo, na faixa de 0-10 cm e em 50-55 cm.

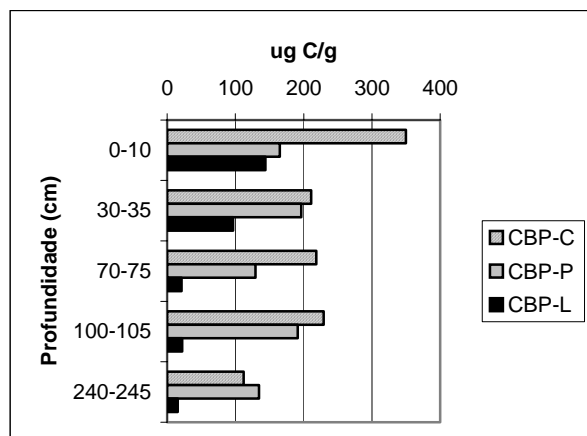


Figura 4. Distribuição de carbono biopolimérico dos carboidratos (CBP-C), proteínas (CBP-P) e lipídeos (CBP-L) ao longo do TA em  $\mu\text{gC/g}$  de sedimento

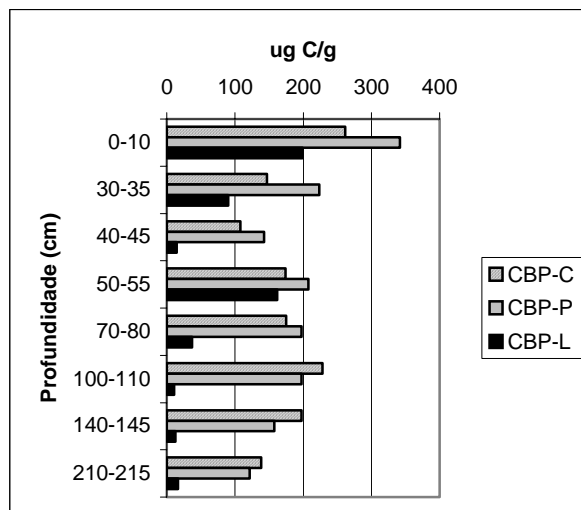


Figura 5. Distribuição de carbono biopolimérico dos carboidratos (CBP-C), proteínas (CBP-P) e lipídeos (CBP-L) ao longo do TB em  $\mu\text{gC/g}$  de sedimento

Os maiores valores de carbono biopolimérico foram observados na faixa de 0-10 cm em ambos os testemunhos (660 e 802  $\mu\text{gC/g}$  de sedimento, nos TA e TB, respectivamente) (Figs. 6 e 7) e que se mantiveram oscilando até o final do testemunho, com média de 447 e 445  $\mu\text{gC/g}$  de sedimento nos TA e TB, respectivamente.

A representatividade bioquímica no TA aparecem os carboidratos com 57%, seguidos pelas proteínas com 36% e por último os lipídeos com 9%. Em TB, os carboidratos aparecem com 49%, proteínas com 43% e lipídeos com 8%, mostrando um padrão de sedimentação similar em pontos diferentes da enseada.

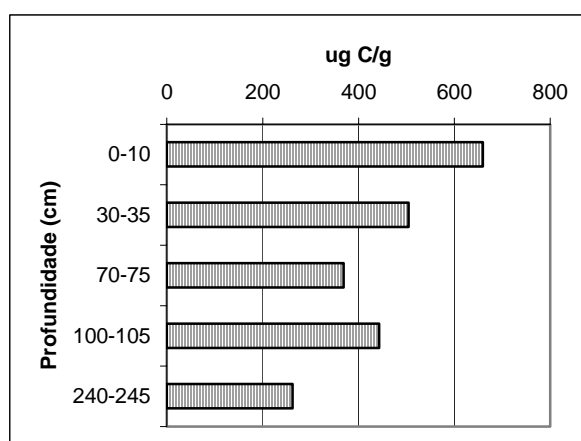


Figura 6. Distribuição de carbono biopolimérico total ao longo do TA em  $\mu\text{gC/g}$  de sedimento

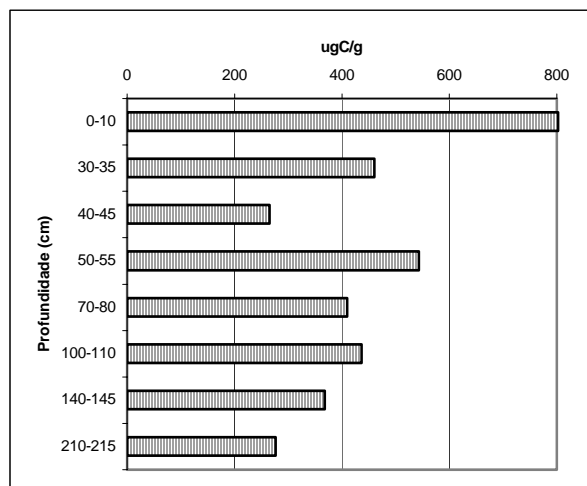


Figura 7. Distribuição de carbono biopolimérico total ao longo do TB em  $\mu\text{g C/g}$  de sedimento

As enzimas esterases são responsáveis pela quebra de biopolímeros e os resultados no TA, mostraram uma atividade enzimática muito alta na faixa de 0-10 cm (4316  $\mu\text{g}$  fluoresceína/g de sedimento) e um decréscimo ao longo da profundidade, com média de 1,74  $\mu\text{g}$  fluoresceína/g de sedimento (Fig.8). No TB, a atividade não foi tão alta como no TA, mas as enzimas acompanham os dois picos de lipídeos existentes e a atividade volta a ficar alta na faixa de 50-55 cm (3,40  $\mu\text{g}$  fluoresceína/g de sedimento)(Fig. 9).

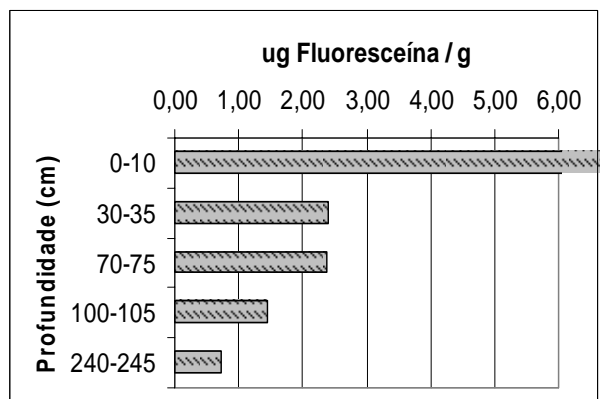


Figura 8. Atividade das enzimas esterases ao longo da profundidade do TA em  $\mu\text{g}$  fluoresceína/g de sedimento

A atividade respiratória bacteriana apresenta o metabolismo que está ocorrendo em cada faixa sedimentar que foi retirada dos testemunhos, indicativo da fisiologia bacteriana. No TA, ocorre a presença de processos anaeróbios (sulfato-redução e desnitrificação) na profundidade de 0-35 cm. De 70 cm até a base do testemunho foi caracterizado o metabolismo de bactérias facultativas e aeróbias (Tab. 1).

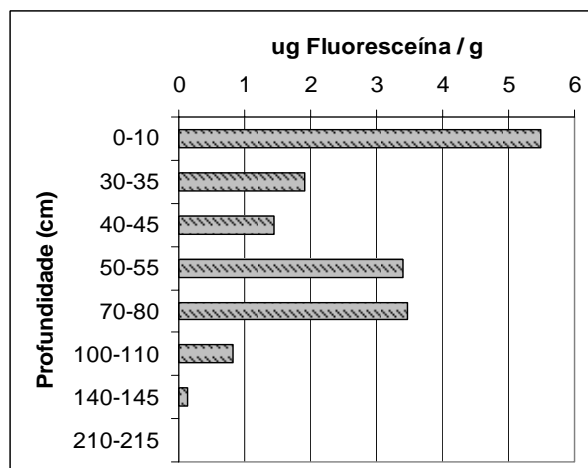


Figura 9. Atividade das enzimas esterases ao longo da profundidade do TB em  $\mu\text{g}$  fluoresceína/g de sedimento

PROF.(cm)	AERO	FERM	DN	SR
0-10	P	P	P	P
30-35	P	P	N	P
70-75	P	P	N	N
100-105	P	P	N	N
240-245	P	N	N	N

PROF.: profundidade; AERO: aerobiose; FERM: fermentação; DN: desnitrificação; SR: sulfato-redução; P: presença de crescimento; N: ausência de crescimento e V: crescimento variável.

Tabela 1: Atividade respiratória bacteriana ao longo de TA

Já em TB, de 0-10 cm, não há processos aeróbios e fermentativos, apenas anaeróbios (sulfato-redução e desnitrificação). Na faixa de 30-45 cm, ocorre transição dos processos, que são variáveis, podendo ou não ocorrer. Na faixa de 70-80 cm, a sulfato-redução começa a ser variável e daí em diante não aparece até a base do testemunho; apenas estão presentes processos fermentativos e aeróbios (Tab. 2).

PROF.(cm)	AERO	FERM	DN	SR
0-10	N	N	P	P
30-35	V	V	P	P
40-45	V	V	P	N
50-55	P	P	P	V
70-80	P	P	P	V
100-105	P	P	P	N
140-145	P	P	V	N
210-215	P	P	N	N

PROF.: profundidade; AERO: aerobiose; FERM: fermentação; DN: desnitrificação; SR: sulfato-redução; P: presença de crescimento; N: ausência de crescimento e V: crescimento variável.

Tabela 2: Atividade respiratória bacteriana ao longo de TB





**DISCUSSÃO** Os valores totais encontrados neste trabalho para carboidratos, proteínas e lipídeos, foram 1000 vezes menores que os encontrados na literatura. Pusceddu *et al.* (1999), na Itália a oeste do Mar Mediterrâneo encontraram 0,76-70,53 mg de carboidratos /g de sedimento, 2,16-12,1 mg de proteína /g de sedimento e 0,26-4,47 mg de lipídeos /g de sedimento. Dell'Anno *et al.* (2002) na Costa Apulian (Itália), encontraram os seguintes valores para carboidratos (4,6 mg/g), proteínas (0,37-2,1 mg/g) e lipídios (>1 mg/g).

O carbono biopolimérico total neste trabalho foi também 1000 vezes menor do que o citado na literatura. Pusceddu *et al.* (1999), encontraram valores variando entre 2,5-36,1 mg C /g de sedimento. Contudo, Dell'Anno *et al.* (2002), já encontraram uma variação de 0,9-6,9 mg C /g de sedimento.

A relação representativa da bioquímica nos testemunhos (CARBOIDRATOS > PROTÉINAS > LIPÍDEOS) apresentou-se igual aos equivalentes da literatura em sedimentos superficiais (Pusceddu *et al.* 1999, Dell'Anno *et al.* 2002). Esses autores ainda estabelecem uma relação proteína carboidrato, que pode servir como indicador dos níveis de eutrofização dos sistemas costeiros, que seriam ambientes: meso-oligotrófico (proteínas <1,5 mg/g; carboidratos <5 mg/g), eutrófico (proteínas <1,5-4 mg/g; carboidratos 5-7 mg/g) e hipertrófico (proteínas >4 mg/g; carboidratos >7 mg/g).

Com relação ao papel funcional das proteínas, Dell'Anno *et al.* (2002) relacionam suas altas taxas a produtividade primária, enquanto Pusceddu *et al.* (1999) associam ao fator limitante para os organismos bênticos.

Atualmente, a hidrólise de biopolímeros da matéria orgânica é feita por bactérias anaeróbias no topo, e fermentativas facultativas e aeróbias na base do testemunho. Após a quebra, os monômeros e oligômeros são transportados para dentro da célula, estando disponíveis para as reações de oxido-redução, que culminarão com a produção de energia (Fenchel *et al.* 1988).

As esterases no topo do testemunho apareceram mais altas, mostrando atividades microbiológicas

intensas, que foram verificadas por Mendonça-Filho *et al.* (2003) em sedimentos da Baía de Guanabara, com as quantidades de matéria orgânica amorfa, que estavam diretamente ligadas à intensa atividade microbiológica.

Os resultados da esterases e suas médias nos testemunhos foram dentro do encontrado na literatura para sedimentos superficiais de ambientes eutrofizados. Crapez *et al.* (2001) encontraram 0,54 µg fluoresceína/h/g de atividade das esterases nos sedimentos da praia da Boa Viagem (Baía de Guanabara). Crapez *et al.* (2003), mostram que as esterases aparecem em diferentes concentrações. Um máximo de 0,17 µg fluoresceína/h/g no inverno nos sedimentos da praia da Boa Viagem (Baía de Guanabara). As esterases também apareceram bem altas nas amostras de sedimento superficial do Porto de Niterói (Baía de Guanabara/S.E.) (63 µg fluoresceína/h/g) (Baptista-Neto *et al.* 2004). Em 30 amostras de sedimento superficial da Baía de Guanabara foram encontradas as esterases variando entre 1,25-4,69 µg fluoresceína/h/g. A média da atividade dessas enzimas responsáveis pela quebra de biopolímeros foi de 3,20 µg fluoresceína/h/g (Silva *et al.* 2006).

**CONCLUSÃO** As concentrações dos biopolímeros foram 1000 vezes menores que a apresentada na literatura, sendo necessária a criação e o estabelecimento de novos indicadores dos níveis de eutrofização dos sistemas costeiros, compatíveis com nossa realidade.

As relações representativas bioquímicas no testemunho foram equivalentes aos descritos no Hemisfério Norte para ambientes marinhos costeiros.

As enzimas esterases no sedimento se mostraram eficientes na mineralização dos biopolímeros, mesmo com fisiologia metabólica preferencialmente anaeróbia.

Apesar de incipientes os estudos da geomicrobiologia, os resultados apontam para uma possível aplicação da microbiologia para compreender melhor os processos geológicos.

## Referências

- ALEF K. & NANNIPIERI P. 1995. Enrichment, isolation and counting of soil microorganism. In: Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press, 123-186.
- BAPTISTA NETO J.A., CRAPEZ M.A.C., MCALISTER J.J. & VILELA C.G. 2004. Concentration and bioavailability of heavy metals in sediments from Niterói harbour (Guanabara Bay/S.E. Brazil). *Journal of Coastal Research*, 20:1-7.
- BLIGH E.G. & DYER W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- CRAPEZ M.A.C., CAVALCANTE A.C., BISPO M.G.S & ALVES P.H. 2001. Distribuição e atividade enzimática de bactérias nos limites inferior e superior entre-marés na Praia de Boa Viagem, Niterói, R.J., Brasil. In: MORAES R. *et al.* (Eds) *Efeito de poluentes em*



- organismos marinhos*, São Paulo, Arte e Ciência, Villipress, 129-138.
- CRAPEZ M.A.C., BAPTISTA NETO J.A. & BISPO M. G. S. 2003. Bacterial Enzymatic Activity and Bioavailability of Heavy Metals in Sediments From Boa Viagem Beach (Guanabara Bay). *Anuário do Instituto de Geociências – UFRJ*, **26**:58-64.
- DELL'ANNO A., MEI M.L., PUSCEDDU A., & DANOVARO R. 2002. Assessing the trophic state and eutrophication of coastal biochemical composition of sediment organic matter. *Marine Pollution Bulletin* **44**:611-622.
- DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., REBERS P.A. & SMITH F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**:350–356.
- EHRLICH H.L. 2002. *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, Inc. New York. Fourth Edition. 786 p.
- FABIANO M., DANOVARO R. & FRASCHETTI S. 1995. A three-year time series of elemental and biochemical composition of organic matter in subtidal sediments of the Ligurian Sea (northwestern Mediterranean). *Cont. Shelf Res.* **15**:1453–1469
- FABIANO M. & PUSCEDDU A. 1998. Total and hydrolizable particulate organic matter (carbohydrates, proteins and lipids) at a coastal station in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Polar Biol.* **19**:125–132.
- FENCHEL T., KING G. M. & BLACKBURN T. H. 1988. *Bacterial biogeochemistry: the ecophysiology of mineral cycling*. 2nd Edition, Academic Press, 307 p.
- GERCHACOV S.M. & HATCHER P.G. 1972. Improved technique for analysis of carbohydrates in sediment. *Limnol. Oceanogr.* **17**:938–943.
- HARTREE E.F. 1972. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**: 422–427.
- MARSH J.B. & WENSTEIN D.B. 1966. A simple charring method for determination of lipids, *J. Lipid. Res.* **7**:574–576.
- MENDONÇA FILHO J.G., MENEZES T.R., OLIVEIRA A. & IEMMA M.B. 2003. Caracterização da contaminação por petróleo e seus derivados na Baía de Guanabara: aplicação de técnicas organogeoquímicas e organopetrográficas. *Anuário do Instituto de Geociências-UFRJ*, **26**:69-78.
- MEYER-REIL L.-A. 1994. Microbial life in sedimentary biofilms - the challenge to microbial ecologists. *Marine Ecology Progress Series*, **112**:303-311.
- MEYER-REIL L.-A. & KÖSTER M. 2000. Eutrophication of Marine Waters: Effects on Benthic Microbial Communities. *Marine Pollution Bulletin*, **41**(1-6):255-263.
- PUSCEDDU A., SARA G., ARMENI M., FABIANO M. & MAZZOLA A. 1999. Seasonal and spatial changes in the sediment organic matter of a semi-enclosed marine system (W-Mediterranean Sea). *Hydrobiologia*, **397**:59-70.
- PUSCEDDU A., DELL'ANNO A., FABIANO M. & DANOVARO R. 2004. Quantity and biochemical composition of organic matter in marine sediments. *Biologia Marina Mediterranea*, **11**(1):39-53.
- RICE D. L. 1982. The detritus nitrogen problem: new observations and perspectives from organic geochemistry. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **9**:153–162.
- SILVA F.S., PEREIRA D.C., SANCHEZ-NUNEZ L., KREPSKY N., FONTANA L.F., BAPTISTA-NETO J.A. & CRAPEZ M.A.C. 2006. Bacteriological study in the superficial sediments of the Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*. (in press).
- STUBBERFIELD L.C.F. & SHAW P.J.A. 1990. A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measures of microbial activity. *Journal of Microbiology Methods*, **12**:151-162.