

Utilização de glicose por bactérias heterotróficas no ecossistema lacustre da Amazônia Central

Hakumat Rai (*)

Resumo

Estuda-se a utilização da glicose por microrganismos em dois lagos amazônicos (Tupe e Janauari) durante um ano. As populações bacterianas do lago Tupe são aproximadamente 1000 vezes menores, e a do Janauari 100 vezes menores que as populações de bactérias de lagos de região temperada. A capacidade de mineralização por bactérias heterotróficas é muito baixa e o tempo de "turnover" do substrato orgânico é muito prolongado.

INTRODUÇÃO

A substância orgânica, dissolvida na água doce, consiste de centenas de componentes diferentes, cada um presente em quantidades mínimas. É provável que as bactérias, constantemente, removam alguns dos componentes mais simples, que, por sua vez, são formados continuamente pela degradação de moléculas maiores. Por se verificar a importância de determinados componentes orgânicos para os organismos aquáticos é que se determina a taxa de sua formação e ingestão, mais que sua concentração absoluta em um dado tempo,

pois, é potencialmente de maior importância. A substância orgânica solúvel representa uma fonte de energia para os microrganismos heterotróficos em ambiente aquático. Pela "absorção" bacteriana, energia química é introduzida na cadeia alimentar. Os processos de decomposição, em que participam microrganismos, dividem-se, do ponto de vista químico, em 2 categorias:

1. "Desagregação" hidrolítica dos complexos polímeros orgânicos, que constituem a maior parte dos corpos animais e vegetais, em compostos de baixo peso molecular;

2. "Desagregação" não hidrolítica das pequenas moléculas resultantes, geralmente acompanhada de consumo de oxigênio. Através deste último processo (mineralização) as moléculas orgânicas dos ambientes aquáticos são convertidas em compostos inorgânicos utilizados como nutrientes para plantas. Os processos de decomposição e mineralização estão apresentados diagramaticamente na figura 1.

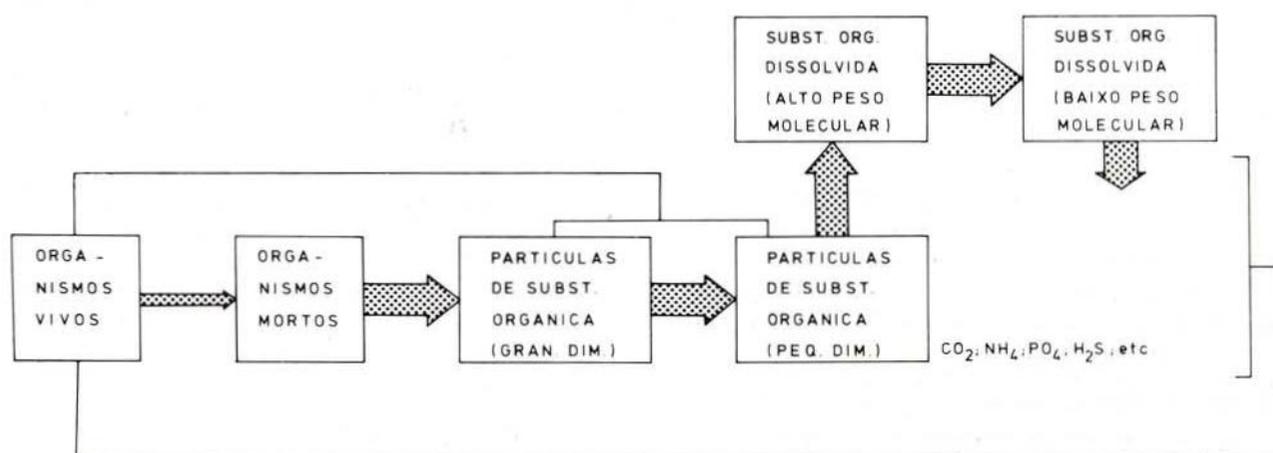


Fig. 1 — Sob a figura: Decomposição da matéria orgânica em ambiente aquático. Nos quadrinhos, da esquerda à direita, fila inferior: organismos vivos; organismos mortos; partículas de substâncias orgânicas; partículas de substância orgânica (partículas menores); fila superior: subst. orgânica dissolvida (peso molecular elevado); subst. org. dissolvida (peso molecular pequeno).

(*) — Max-Planck-Institut für Limnologie, Abt. Tropenökologie, Plön/H., Alemanha, e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletaram-se todas as amostras no centro do lago (Tupé ou Januari, próximos de Manaus), a intervalos de um metro, chegando aproximadamente ao fundo do mesmo. Coletaram-se as amostras num aparelho estéril que permite a coleta sem interferir na concentração de oxigênio. Este aparelho, mostrado na figura 2, foi desenhado e construído pelo autor, no Max Planck Institut für Limnologie, Plön, Alemanha Ocidental.

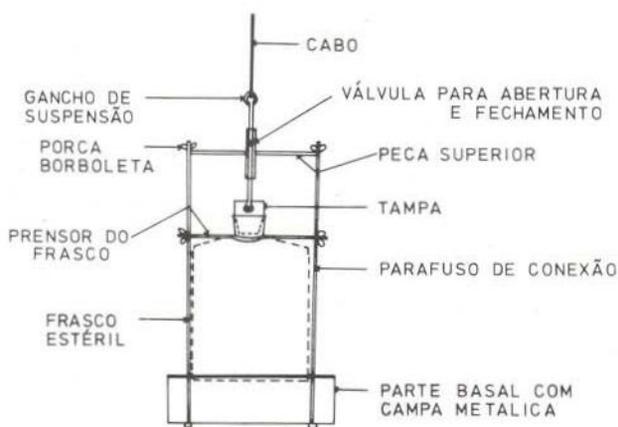


Fig. 2 — Sobre a figura: Desenho do aparelho de amostragem. À esquerda, de cima para baixo: gancho de suspensão, porca borboleta, prensor do frasco, frasco estéril. À direita, de cima para baixo: cabo, válvula para abertura ou fechamento, peça superior, tampa, parafuso de conexão, parte basal com chapa metálica.

Após a coleta, as amostras foram transportadas ao laboratório, e colocadas em incubadoras, com a temperatura equivalente à de cada profundidade do lago. Após um período curto para estabilizar a temperatura, as amostras foram colocadas num agitador magnético e depois filtradas em filtros Mf, de poros de $0,8 \mu\text{m}$. A determinação do oxigênio dissolvido foi feita antes do começo e no término da experiência. O oxigênio permaneceu constante nos valores "in situ" durante todos os experimentos. Acréscimo de substrato (C^{14} glucose) foi feito de acordo com o padrão descrito por Wright & Hobbie (1966). Para os controles, os organismos foram mortos usando-se 0,15 ml de formaldeído (40%). Foram empre-

gados nove frascos de amostras para cada profundidade. Glicose (UL) — C^{14} (Amersham Searle Corp) foi usada como substrato. Esta foi diluída à radioatividade de $1 \mu\text{Ci/ml}$. O acréscimo usual foi de $25 \mu\text{l}$, $50 \mu\text{l}$, $100 \mu\text{l}$ e $200 \mu\text{l}$ em duplicata e $25 \mu\text{l}$ acrescentados ao controle. As amostras e os controles foram incubados na temperatura "in situ", no escuro, durante 60 a 120 minutos, dependendo da atividade das populações. Após a incubação foi susgado o metabolismo por acréscimo de 0,15 ml de formalina por amostra. Foram filtradas todas as amostras em Sartorius MF, de poro de $0,2 \mu\text{m}$, num período de 10 horas. Os filtros foram secados sob lâmpada infravermelha e dessecados. O papel de filtro depois de seco foi dobrado e colocado num frasco de cintilação, acrescentando-se 15 ml de fluido de cintilação contendo 4,0 g de 2,5 difeniloxazole (PPO) e 50 ml de 1,4-2 (5-feniloxazolil)-benzeno (POPOP) por 1000 ml de tolueno. Todas as determinações da radioatividade foram feitas com um espectrômetro de cintilação líquida da Packard Instruments.

A eficiência da contagem foi aferida pela padronização internacional com C^{14} — tolueno padronizado (Packard Instruments). Wolfe & Schelske (1967) demonstraram a possibilidade do emprego deste método, que depois ficou confirmado por J. E. Hobbie (participação verbal).

O parâmetro cinético, associado com a remoção heterotrófica da glicose pelas bactérias aquáticas consiste no seguinte: V_{max} , a velocidade teórica máxima de "uptake" em μg removida por litro por hora; $Kt + S_n$, um valor aproximado à concentração do substrato natural, em μg de glicose por litro; e Tt , o tempo de transformação em horas, necessário para que o substrato seja removido completamente da solução pela população natural presente na amostra. A fórmula proposta para a velocidade de "uptake" é a seguinte:

$$V = (cf (S_n + A) / C\mu t) \quad (1)$$

onde V é a velocidade de incorporação (mg/l/hr), c é a radioatividade dos organismos filtrados (CPM), f é o fator isotópico de discriminação, S_n é a concentração natural do substrato (mg/l), A é a concentração (mg/l)

do substrato adicionado, C é a atividade (CPM) de $1.0 \mu\text{Ci}$ do substrato no contador usado, μ é o número de μCi adicionado e t é o tempo de incubação em horas. O fator f não foi considerado na maior parte do trabalho que se seguiu, por ser o seu valor desconhecido, embora considere-se que seja aproximadamente equivalente a uma unidade. Parsons & Strickland (1962) desenvolveram uma equação semelhante à equação de Lineweaver-Burk, que poderia ser usada para determinar o valor de $(K_t + S_n)$ onde K_t é uma constante de "uptake" análoga à constante de Michaelis, depois de determinar se o "uptake" relativo em várias concentrações de substrato adicionado. S_n , em geral não foi possível medir em águas naturais, devido às limitações dos métodos analíticos atuais. Os valores de $(K_t + S_n)$, no entanto, foram sempre inferiores a $20 \mu\text{g}$ de C/l .

Daí acredita-se que, ao adicionar-se rotineiramente $250 \mu\text{g}$ C/l , qualquer efeito de S_n na equação (1) poderia ser desprezado, e esta equação poderia ser usada para fazer-se comparações entre o potencial heterotrófico de diferentes águas.

Wright & Hobbie (1965 e 1966) verificaram que o "uptake" de glicose e acetato, pelas populações naturais do lago Erkin, seguiu a equação cinética de Michaelis-Menten somente em concentrações baixas. O "uptake" na amplitude de $0,5$ a 5 mg substrato/litro seguiu a cinética de primeira ordem. Por isso, Wright & Hobbie duvidaram da validade das medidas de potencial heterotrófico relativo de Parsons & Strickland (1962). Desenvolveram então uma equação para descrever a utilização do substrato, com base numa modificação da equação de Lineweaver-Burk:

$$S/V = K_t/V_{\text{max}} + S/V_{\text{max}} \quad (2)$$

onde S é a concentração do substrato, V_{max} a velocidade máxima de incorporação e v a velocidade de "uptake" ($\text{mg}/l/\text{hr}$) numa dada concentração de substrato. Em águas naturais, S_n é desconhecido e, usando-se o conceito de Parsons & Strickland (1962), o S da equação (2) torna-se $(S_n + A)$ como se segue:

$$(S_n + A) / V = K_t/V_{\text{max}} + (S_n + A) / V_{\text{max}} \quad (3)$$

Utilização de glicose...

A equação (1) é reestruturada de forma que:

$$(S_n + A) / v = (C\mu t) / c \quad (4)$$

Substituindo-se a equação (4) na equação (3) e fazendo um rearranjo temos:

$$(C\mu t) / c = (K_t + S_n) / V_{\text{max}} + A/V_{\text{max}} \quad (5)$$

A partir desta equação, plotaram-se as medidas de incorporação em diferentes concentrações baixas de substrato adicionado, tendo $C\mu t/c$ na ordenada e A (substrato adicionado) na abcissa. Portanto, o declive é $1/V_{\text{max}}$ e a interseção sobre a abcissa é $-(K_t + S_n)$. A interseção na ordenada é S_n/v que é igual a duração do "turnover", T_t assumindo-se uma produção e remoção constante do substrato. (V_{max}) é a velocidade de "uptake" acima da qual um aumento nas concentrações do substrato deixam de ter efeito. No que se refere ao sistema microbial de transporte, V_{max} é a velocidade de "uptake" atingida quando o mecanismo portador está saturado com substrato.

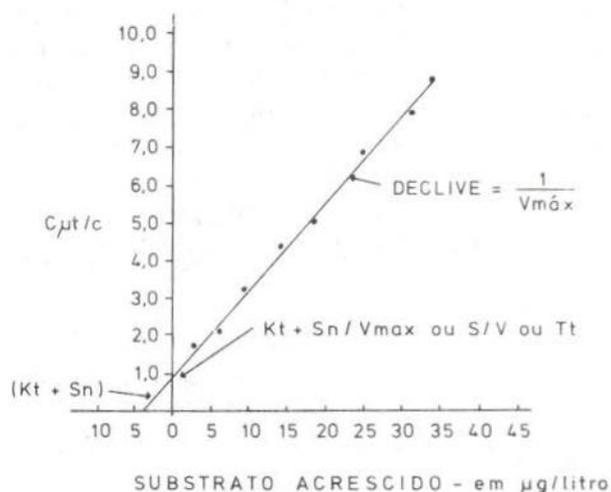


Fig. 3 — Sobre a figura: Substrato acrescido em $\mu\text{g}/\text{litro}$. Absorção de glicose em populações naturais, plotada de acordo com a equação $C\mu t/c = (K_t + S_n)/V_{\text{max}} + A/V_{\text{max}}$. À direita da figura: declive.

Correção para respiração foi similar àquela descrita por Hobbie & Crawford (1969), exceto que, após a incubação, porções de amostras de $5,0 \text{ ml}$ (acréscimos de $25, 50, 100$ e $200 \mu\text{l}$) foram adicionados com seringa aos frascos vedados de respiração (Kondes Glass

Co.) que continham 0,5 ml de 2.0 N H₂SO₄. O CO₂ desprendido foi capturado num pedaço de papel (25 x 51 mm) cromatográfico Watman 40 dobrado e saturado de fenetilamina (Packard Instruments), na taça do frasco de respiração. Após 90 minutos, para assegurar a total captura do CO-14, o papel foi colocado num tubo de cintilação contendo 1.0 ml de metanol. Foi adicionado então 15 ml de fluido de cintilação contendo 4.0 g 2,5 de difeniloxazole (PPO) e 50 mg 1,4-2-(5-feniloxazolil)-benzene (POPOP) por 1000 ml de toluene. O metanol foi armazenado a seco sobre Na₂SO₄ para evitar que ocorresse "quenching". Foi constatado que 80% da atividade de Na₂ 14-CO₃, acrescida à câmara de respiração, foi recuperada pelo papel de filtro saturado de fenetilamina. Isto é comparável aos resultados obtidos por Hobbie & Crawford (1969). Daí, a atividade do 14-CO₂ respirado (decarboxilado) foi calculado como se segue:

$$r = r' 1,25 (36,08 \text{ ml}/5,0 \text{ ml}) \quad (6)$$

onde r' é a radioatividade (cpm) na porção 1,25 é o fator de correção para recuperação de 80% de CO₂ e (36,08 ml/5,0 ml) corrigem o valor, digo, volume original da amostra de 36,08 ml.

A porcentagem de substrato adicionado respirado foi calculado pela seguinte equação:

$$R = (r/c) 100 \quad (7)$$

onde R representa a porcentagem de substrato respirado (decarboxilado), r é a radioatividade (cpm) em CO₂-14 e c é a soma da radioatividade (cpm) nas células e CO₂.

Experiências preliminares demonstraram que isto era relativamente constante em qualquer experimento; por esta razão, calculou-se a média para os quatro valores de R. Esta média foi empregada para corrigir c na equação (5) para a respiração, como segue:

$$c = (100 / (100 - R)) X$$

onde R é o porcentual médio respirado (decarboxilado) e X é a atividade das células.

RESULTADOS DE EXPERIÊNCIAS DE "UPTAKE" DE GLICOSE

Os resultados, apresentados nas figuras 4, 5 e 6, são derivados da regressão linear da equação:

$$(C_{\mu t})/c = (K_t + S_n) / V_{\max} + A/V_{\max}$$

Mais que 95% das experiências resultaram em regressões lineares de quadrados mínimos com coeficientes de determinação de 0,95, ou mais.

O tempo de "turnover" da glicose (fig. 4) foi diretamente proporcional às flutuações do nível da água. Este parâmetro flutuou grandemente durante o período do estudo. O tempo de "turnover" foi muito alto durante o período de estudo. As variações médias mensais de "turnover" de toda a coluna de água estiveram entre 120 e 36.48 horas para o lago

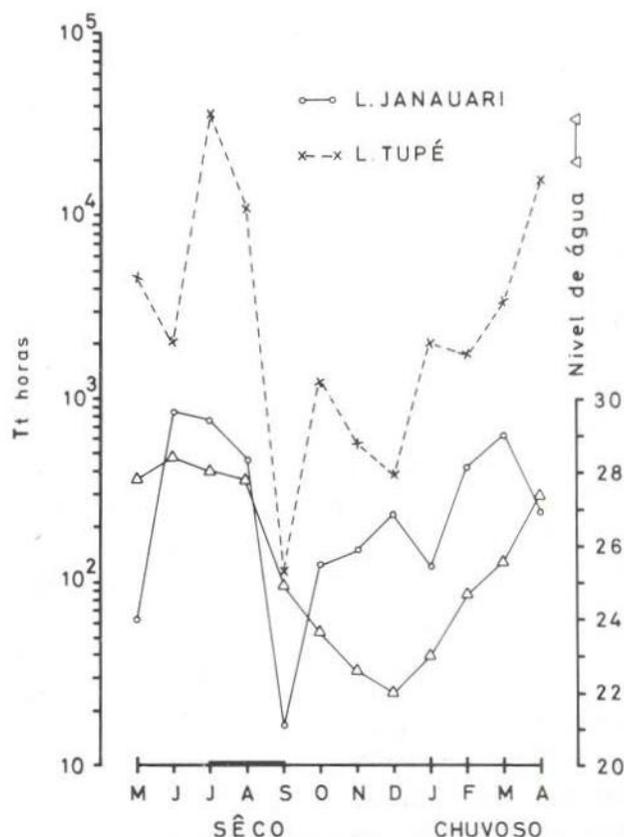


Fig. 4 — Sob a figura : Mudanças sazonais no "turnover", formação da glicose, nos lagos Tupé e Janauari, Amazônia. Ao lado da figura : tempo de "turnover" em horas.

Tupé e oscilaram entre 17 e 1.350 horas para o lago Janauari. Ocorreu um grande acréscimo ao tempo de transformação concomitante do aumento do nível de água em ambos os lagos.

A velocidade máxima (V_{max}) de "uptake" tendeu a aumentar nas fases de baixo nível da água e diminuir a um mínimo nas fases do nível mais alto (figura 5). No caso do lago Tupé, revelaram-se dois picos. O primeiro ocorreu em setembro e o segundo, através da maior parte de novembro e de dezembro e, para o lago Janauari, igualmente foram verificados dois picos, mas, o primeiro estendeu-se de outubro a novembro e o segundo, o pico muito alto, no mês de janeiro, quando a velocidade máxima foi de 51,9 $\mu\text{g}/1/\text{h}$.

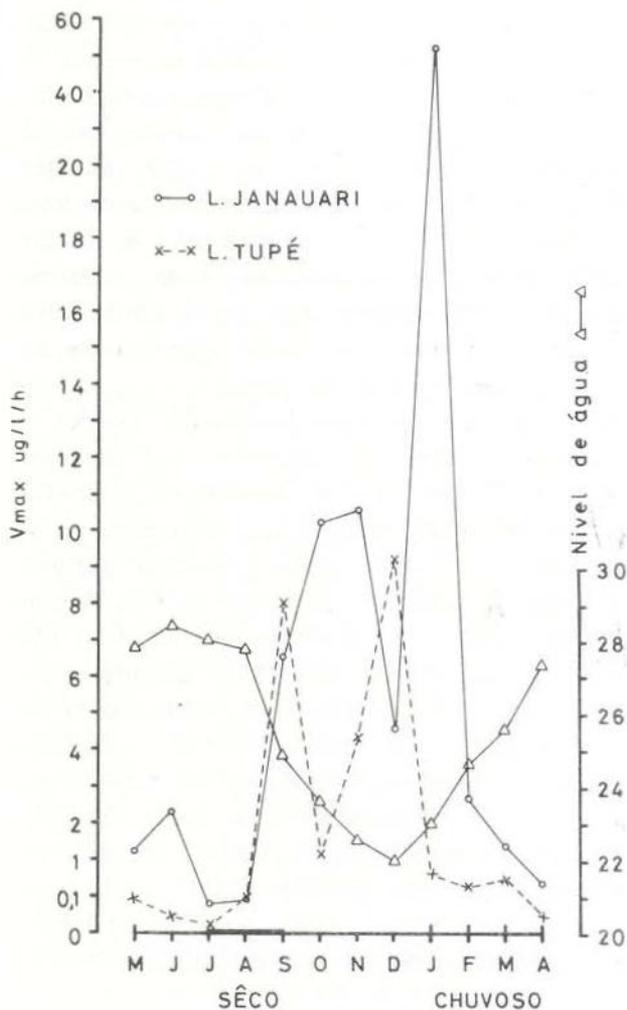


Fig. 5 — Sob a figura: Mudanças sazonais da velocidade máxima de "uptake" de glicose nos lagos Tupé e Janauari, Manaus (Amazônia).

Os valores de $(K_t + S_n)$ variaram amplamente, durante o período do estudo, em ambos os lagos (figura 6). Os valores tenderam a ser mais baixos durante o período de alto nível da água, e mais altos no período de baixo nível da água. Em média, os valores para $(K_t + S_n)$ no lago Tupé variaram entre 270 e 1560 $\mu\text{g}/1$ durante o período de estudo e, no lago Janauari, entre 135 e 1673 $\mu\text{g}/1$.

APROVEITAMENTO DA GLICOSE

Os resultados da absorção de glicose revelaram que V_{max} (fig. 5) foi mantida pelas populações naturais num mínimo praticamente constante durante a elevação do nível da água. A velocidade máxima e $(K_t + S_n)$ foram diretamente proporcionais, pois, ambos aumentam e diminuem na mesma maneira, a fim de que o tempo de "turnover" permaneça constante. O sistema, por esta razão, pareceu operar de tal maneira a impedir a acumulação de glicose. Os resultados deste estudo demonstraram que T_t não permaneceu constante. Os resultados, apresentados por Wetzel (1969), mostram a mesma tendência.

Porém, Allen (1969) e Hobbie (1969) não observaram esta tendência. A atividade da população heterotrófica pode ser indicada pela magnitude de V_{max} (Hobbie, 1967 e Wright & Hobbie, 1966). Se isto for admitido, então a atividade medida da glicose foi mais alta durante o decréscimo do nível da água, ou quando este está baixo.

Os grandes aumentos na duração da transformação da glicose durante a fase de nível alto da água foram significativamente diferentes dos valores da fase de baixo nível da água, embora o V_{max} permanecesse quase inalterado e $(K_t + S_n)$ não aumentasse em grau apreciável durante o período de alto nível da água. O aumento do tempo da transformação ocorreu durante o aumento do nível da água. Esta mudança provavelmente deveu-se às populações trazidas ao lago a partir de seus locais de origem, que talvez não fosse de origem aquática. V_{max} parece ser alta, quando a população de bactérias vivas for numerosa e vi-

ce-versa. Isto indica que a concentração da comunidade de bactérias vivas é responsável pelo "uptake" da glicose.

Durante o alto nível da água, os valores de $(K_t + S_n)$ e V_{max} são baixos, enquanto os valores de T_t e número de bactérias são altos (trabalho não publicado, Rai 1976). Enquanto que, em baixo nível de água, os valores de $(K_t + S_n)$ e V_{max} são altos e os valores T_t e o número de bactérias são baixos.

Os resultados desta pesquisa mostram que comunidades químio-organotróficas respondem com muita rapidez às mudanças do nível da água e da concentração do substrato. Durante a fase de aumento do nível da água, V_{max} foi muito baixa em ambos os lagos. Isto significa que a afinidade com o substrato foi o mais baixo neste período do ano. No período da diminuição do nível da água, V_{max} foi mais alto em ambos os lagos, indicando, que, neste período, a afinidade com o substrato foi mais alta. Comparando-se medições em meios aquáticos de natureza trófica muito diferente, as taxas de "uptake" de glicose parecem ser

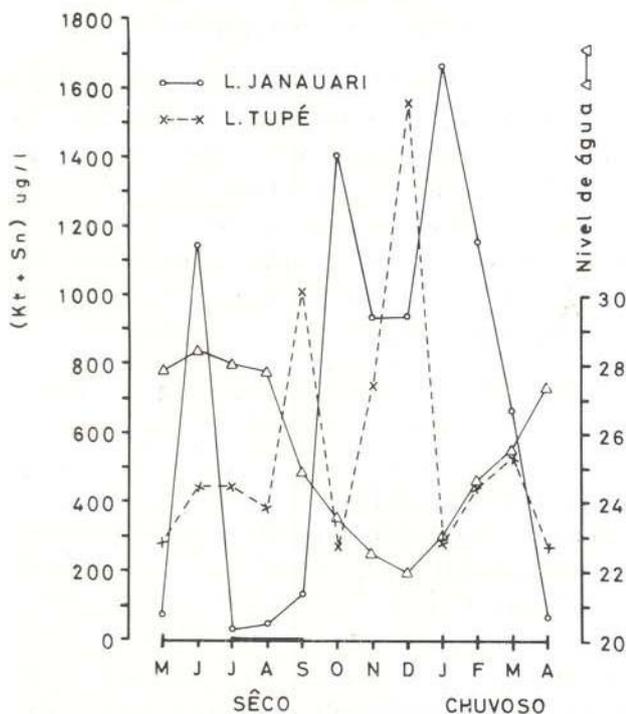


Fig. 6 — Mudanças sazonais na concentração do substrato natural e nível de água, nos lagos Tupé e Januári, Manaus (Amazônia). Ao lado da figura: nível da água em m.

relacionadas com o estado trófico. Quanto maior a produtividade da água, tanto mais alto será o V_{max} . Assim, isto indica que os lagos de água branca e mista (dados não publicados) são mais produtivos do que lagos de água negra da região amazônica.

O aumento no número total de bactérias durante o nível alto das águas não foi relacionado ao aumento de V_{max} para o substrato estudado. Isto talvez se deva ao fato de que as bactérias vivas eram transportadas para os lagos durante as enchentes, a partir da área de recebimento dos lagos. Evidentemente, estas bactérias não têm um papel muito importante para o "uptake" da glicose. Isto significa que as modificações quantitativas e qualitativas nas populações bacterianas podem alterar o V_{max} . Foi registrada a exceção desta regra, na estação seca, durante os meses de setembro, novembro e dezembro, quando o aumento de bactérias vivas podia estar relacionado aos aumentos de V_{max} para glicose. As suposições de pesquisadores anteriores (Hobbie, 1967, Allen, 1969, Wright & Hobbie, 1966) parecem confirmar-se pelo presente trabalho. No entanto, Morgan & Kalff (1972) encontraram uma correlação significativa entre o número total de bactérias e o V_{max} . Ademais, com um grau aumentado de "uptake" e elevado número de bactérias, um processo ativo de degradação foi, geralmente, encontrado em setembro, novembro e dezembro no lago Tupé e, durante quase o mesmo período, no lago Januári. O aumento no fitoplâncton (como indicado pelos dados de clorofila) (dados não publicados, Rai, 1976) durante o período de estudo, foi associado ao aumento em V_{max} e $(K_t + S_n)$ para o substrato estudado. Portanto, o aumento de $(K_t + S_n)$ sugere que as algas, no período de nível baixo da água, estavam acompanhadas por uma liberação de glicose, pois, não há razão para supor-se ter havido aumento de K_t . Este padrão foi também descrito para o lago Erken, por Hobbie (1967).

CONCLUSÕES

1. Populações naturais tendem a impedir a acumulação de glicose durante o período de janeiro a agosto, isto é, o tempo de "tur-

nover" do substrato (T_t) não permanece constante ao redor de um mínimo, enquanto que a velocidade máxima (V_{max}), a soma da constante de transporte ($K_t + S_n$) e a concentração do substrato variam notavelmente em ambos os lagos.

2. Durante o período de nível elevado de água, os valores de V_{max} não tenderam a aumentar com o número total de bactérias. Isto sugere que tenham havido mudanças qualitativas, assim como quantitativas na população de bactérias.

3. A concentração de bactérias vivas (contagem em placas) foi inversamente relacionada ao V_{max} .

4. V_{max} para o lago Tupé foi geralmente inferior do que para o lago Janauari.

5. T_t aumentou, enquanto V_{max} e ($K_t + S_n$) diminuíram durante o período de nível elevado da água. Isto provavelmente refletiu a diminuição geral na atividade de toda comunidade biológica durante o período de alto nível da água. Estes achados são semelhantes àqueles para os lagos temperados durante o inverno.

6. Como já assinalado anteriormente, por pesquisadores da água da região amazônica, as bactérias estavam procedendo à mineralização da matéria orgânica tão rapidamente quanto a substância orgânica era produzida. Isto significa que, na verdade, deveria haver deficiências. Ou alternativamente, uma situação em que o "input" no acervo orgânico (bactérias) é igual ao "output"; mostraria também mudanças de zero (T_t) tempo de "turnover". Este fenômeno peculiar foi observado por Allen (1969) em duas amostras em que foram detectados valores positivos de ($K_t + S_n$). A taxa mais elevada de "turnover" para glicose, como demonstrado nos casos de lago Janauari e lago Tupé especialmente durante o período de nível alto da água e, em geral, durante todo ano, pareceria ocorrer devido à presença de populações bacterianas muito pequenas. O trabalho de Allen (1969) mostrou em suas experiências a mesma tendência. Populações bacterianas do lago Tupé

são aproximadamente 1000 vezes menores, e as do lago Janauari, aproximadamente 100 vezes menores do que as populações habituais de bactérias de lagos de região temperada.

7. Este trabalho, como um todo, indica que em águas da região amazônica, em geral, a capacidade de mineralização por bactérias heterotróficas é muito baixa e o tempo de "turnover" do substrato orgânico é muito prolongado.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi patrocinado pelo Prof. H. Sioli, Diretor do Max-Planck-Institut für Limnologie, Abteilung Tropenökologie, Plön, Alemanha Ocidental e Prof. W. E. Kerr, Diretor do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil. O trabalho foi idealizado e executado num espírito de cooperação entre o Max-Planck Institut für Limnologie e o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Agradeço à Profa. Miriam Becker e D. Luise Korner pela tradução desta publicação.

SUMMARY

A year long study on the utilization of glucose by the microorganisms of two Amazonian lakes (Tupé and Janauari) were studied. The bacterial populations of lake Tupé is approximately 1000 times smaller, and that of lake Janauari 100 times smaller than those of lakes from temperate regions. The mineralization capacity by heterotrophic bacteria is very low, and the organic substrate turnover time is very long.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALLEN, H. L.
1969 — Chemo-Organotrophic utilization of dissolved organic compounds by Planktic Algae and Bacteria in a Pond. *International Revue Gesamt Hydrobiologie*, 54: 1-33.
- HOBBIE, J. E.
1967 — Glucose and acetate in Freshwater: Concentrations and Turnover Rates. In: Golterman & Clymo eds. — *Chemical environment in the Aquatic Habitat. Proceedings of an 1; B. P. Symposium held in Amsterdam and Nieuversluis*, October 10-16, 1966.
- HOBBIE, J. E. & CRAWFORD, C. C.
1969 — Respiration corections for Bacterial Uptake of Dissolved Organic compounds in Natural Waters. *Limnology and Oceanog.*, 14: 528-532.

MORGAN, K. E. & KALFF, J.

- 1972 — Bacterial dynamics in two higharctic lakes
Freshwat. **Biol.**, 2: 217-228.

PARSONS, T. R. & STRICKLAND, J. D. H.

- 1962 — On the production of particulate organic
Carbon by Heterotrophic Processes in sea
water. **Deep Sea Research**, 8: 211-222.

WETZEL, R. G.

- 1969 — Dissolved organic compounds and their
Utilization in two Marl Lakes. **Hidrological
Kozlony**, 47: 298-303.

WOLFE, D. A. & SCHELSKE, C. L.

- 1967 — Liquid scintillation and Geiger counting
efficiencies for Carbon-14 Incorporated by
Marine Phytoplankton in Productivity
measurements. **Journal du Consiel Inter-
national Pour L'Exploration de la mer**,
31: 31-37.

WRIGHT, R. T. & HOBIE, J. E.

- 1965 — The Uptake of Organic solutes in Lake
Water. **Limnology and Oceanography**, 10:
22-28.

- 1966 — Use of glucose and acetate by Bacteria and
Algae in Aquatic ecosystems. **Ecology**, 47:
447-464.

(Aceito para publicação em 06/01/78)