

CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DE NAFTALENO POR *Pseudomonas fluorescens* HK44

Hugo Monteiro de Magalhães

Bolsista de Iniciação Científica, Química Bacharel e Licenciatura, UFF

Erika Valdman

Orientadora, Eng^o. Química, Dr.^a

RESUMO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) consistem um grupo de compostos que agridem ao meio ambiente e, conseqüentemente, ao ser humano. Um processo eficaz para a degradação desses compostos é a biorremediação. Esta técnica fundamenta-se na oxidação biológica por microrganismos, decompondo a matéria orgânica em substâncias simples como CO₂ e H₂O. Neste trabalho, estudou-se a cinética de

degradação de naftaleno pela bactéria *Pseudomonas fluorescens* HK44.

O experimento de biodegradação contendo inicialmente 10mg/L do poliaromático foi realizado na concentração celular 0,2g/L. Os resultados obtidos comprovaram o potencial de degradação da cepa HK44, uma vez que a remoção real de 54,9% de naftaleno foi obtida em menos de 2horas.

1. INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são uma classe de contaminates bastante conhecidos, originados da combustão incompleta de compostos orgânicos e processos geoquímicos. Estes podem ser encontrados em todos os segmentos ambientais, incluindo solo, água e ar e são passíveis de serem biodegradados (Valdman, 2004).

Dentre os PAHS, o naftaleno foi estudado como modelo por possuir a maior solubilidade em água (31,7mg/L) (Valdman *et al.*, 2004). Este hidrocarboneto, quando ingerido ou inalado pelo homem, pode provocar diversos efeitos, dentre eles: anemia hemolítica, catarata, aumento do baço, danos aos rins e ao cérebro.

Uma das formas de tratar efluentes e locais contaminados por naftaleno é a biorremediação, que consiste no uso de microorganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras, para degradar substâncias nocivas, transformando-as em produtos com pouca ou nenhuma toxicidade (Tiburtius *et al.*, 2004).

Neste trabalho, foi testado o processo de biodegradação de naftaleno utilizando uma bactéria como agente degradador.

2. OBJETIVO

Estudar a cinética de biodegradação do naftaleno, utilizando o microorganismo *Pseudomonas fluorescens* HK44.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo de Estudo

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* HK44 (DMSZ 6700) foi gentilmente cedida pela Prof.^a Dr.^a Selma G. F. Leite do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química – UFRJ. Esta bactéria foi isolada de solo contaminado com PAHs (King *et al.*, 1990).

3.2 Meios e Soluções Estoque

Seguem as composições dos meios e soluções estoque, mantidas em congelador, utilizados nos experimentos:

- ✓ Solução estoque de naftaleno: Naftaleno em etanol (10mg/mL).
- ✓ Solução estoque de tetraciclina: Tetraciclina em etanol:água (1:1) (15mg/mL).
- ✓ Meio de crescimento (YEPG-Tc) - Extrato de lêvedo (2,0g/L); Peptona de caseína (2,0g/L); Glicose (1,0g/L); Nitrato de amônio (0,2g/L) e tetraciclina (15mg/L).
- ✓ Meio de detecção (MD-Tc) - Extrato de lêvedo (0,1 g/L) e tetraciclina (15mg/L).

3.3 Cinética de Crescimento

O cultivo do pré-inóculo foi realizado em um Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de meio YEPG-Tc citado no item 3.2. Após 16 horas de crescimento a 28°C em *shaker* a 150 rpm, mediu-se a densidade ótica da suspensão celular da cepa HK44 em espectrofotômetro UV-visível (Perkin Elmer Lambda 12) no comprimento de onda 546nm (DO_{546nm}) (Valdman *et al.*, 2004)

Para iniciar o acompanhamento da curva de crescimento, calculou-se o volume (mL) necessário do pré-inóculo para se obter uma DO_{546nm} inicial próxima de 0,2 em 200mL do mesmo YEPG-Tc, contidos em um Erlenmeyer de 1000mL. Retirou-se, então, a primeira alíquota para leitura da DO_{546nm} no tempo inicial (0h). O cultivo foi mantido a 28°C em *shaker* a 150 rpm e o crescimento celular foi monitorado pela absorvância medida periodicamente até alcançar um valor máximo estável, representando a fase estacionária.

3.4 Peso Seco

Após crescimento celular conforme descrito no item anterior 3.3, as células em estado estacionário foram centrifugadas por 25min. a 3500rpm e o precipitado obtido foi ressuspenso em um mínimo de água destilada (cerca de 5mL). Após transferência para um só tubo de centrifuga, as células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores e lavadas com água destilada novamente. A biomassa foi ressuspenso em água destilada para se obter uma suspensão concentrada de células.

Dois mL dessa suspensão foram colocadas em um cadinho seco e já pesado (em duplicata), secando-o em estufa a 60°C e pesando o cadinho com as células até atingir peso constante. Calculou-se a concentração (g/L) da suspensão, dividindo a massa celular (mg) obtida pelo volume conhecido (2mL).

Desta mesma suspensão utilizada para o cálculo da concentração celular, várias diluições foram feitas para obter cerca de 8 leituras de absorvância (DO_{546nm}) entre 0,1 e 0,5, correspondendo cada leitura à sua respectiva concentração celular.

3.5 Caracterização do Naftaleno

3.5.1 Definição do Comprimento de Onda Ótimo

Para confirmar o comprimento de onda ótimo para a quantificação do naftaleno em espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda 12), fez-se a varredura no comprimento de onda na região do UV (220-330nm). Tendo em mãos o resultado, identificou-se o pico máximo de absorção de luz do hidrocarboneto policíclico para se obter a curva de calibração.

3.5.2 Curva de Calibração para Naftaleno

Partindo de uma solução estoque de naftaleno (item 3.2), realizaram-se algumas diluições conhecidas e, para cada uma, fez-se a leitura da absorvância correspondente no comprimento de onda ótimo, determinado no item anterior 3.5.1. O solvente utilizado nas diluições foi o meio de detecção cuja composição encontra-se descrita no item 3.2 deste trabalho.

Com os valores obtidos, graficou-se a absorvância medida *versus* a concentração de naftaleno, obtendo-se a curva de calibração do hidrocarboneto poliaromático.

3.6 Experimento de Biodegradação de Naftaleno

Após o crescimento celular ter chegado na fase estacionária, conforme descrito no item 3.3, as células foram centrifugadas por 25 minutos a 3500rpm. Ressuspendeu-se a biomassa em pequeno volume de água destilada e mediu-se a DO_{546nm} da suspensão celular resultante.

Com o auxílio do peso seco (item 3.4), cálculos foram realizados para saber qual o volume (mL) deste concentrado celular deveria ser adicionado nos frascos (250mL) contendo 50mL de meio de detecção para se obter a concentração celular 0,2g/L nos experimentos de biodegradação.

O início do teste de biodegradação foi dado no momento em que se adicionou um certo volume de naftaleno da solução estoque para que a concentração do mesmo no meio já inoculado fosse de 10mg/L. Retirou-se, então, a primeira alíquota (cerca de 5mL) referente ao ponto 0h e os frascos

foram colocados a 28°C sob agitação constante de 150rpm. Alíquotas foram retiradas periodicamente e imediatamente analisadas após filtração em membrana *Millipore* 0,45µm. Cada alíquota isenta de células teve sua absorvância medida no comprimento de onda ótimo pré-determinado para o naftaleno, a fim de quantificar a concentração deste composto através da curva de calibração obtida no item 3.5.2. Este procedimento foi realizado até o final do teste, no qual a biodegradação não era mais observada, que foi atingido em 100 minutos.

Utilizou-se um frasco isento de bactéria HK44 como controle, contendo as mesmas quantidades de meio e naftaleno, para verificar a perda do hidrocarboneto por volatilização. Os experimentos de biodegradação foram realizados em duplicata a fim de se obter uma maior precisão dos resultados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do Comprimento de Onda Ótimo para o Naftaleno

Sabe-se que os compostos com anel aromático absorvem luz na região do ultra-violeta. Para definir o valor do comprimento de onda ótimo do naftaleno, ou seja, no qual a absorção de luz é máxima, fez-se uma varredura do espectro na região UV (220-330nm). Os valores obtidos permitiram construir o seguinte gráfico (Fig.1).

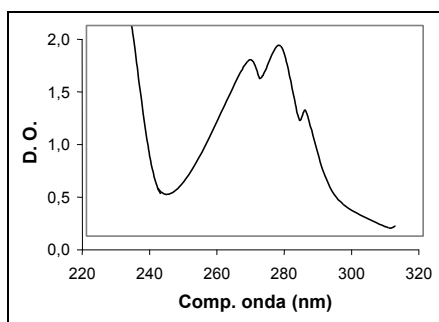


Figura 1. Espectro de varredura para naftaleno na região UV

Pelo gráfico, pode-se observar que em 274nm tem-se a maior absorvância, definindo, assim, o comprimento de onda ótimo para o naftaleno.

4.2 Curva de Calibração para Naftaleno.

Algumas diluições e suas respectivas absorvâncias a 274nm foram realizadas para confecção da Figura 2, no qual observa-se uma boa correlação linear ($R^2 = 0,963$) e uma relação direta entre a concentração de naftaleno (mg/L) e a densidade ótica lida.

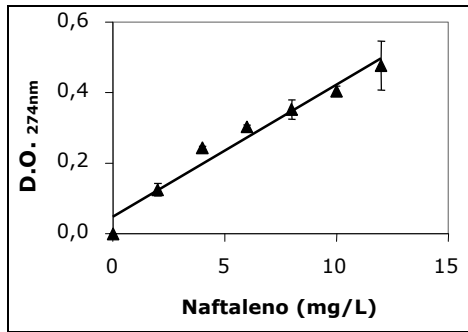


Figura 2. Curva de calibração para naftaleno no meio de detecção.

Com a equação da reta obtida:

$$D.O._{274nm} = (0,0374 \times [Naft.] + 0,0474)$$

foi possível determinar a concentração de naftaleno (mg/L) no meio de detecção, medindo a absorvância da amostra filtrada no comprimento de onda ótimo.

4.3 Correlação entre Absorvância e Concentração Celular

Algumas diluições foram realizadas com a finalidade de se correlacionar a concentração celular com a absorvância a 546nm, conforme mostrado na Figura 3.

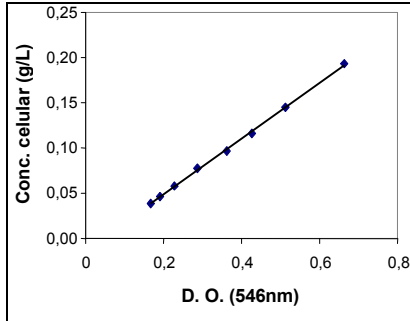


Figura 3. Correlação entre absorvância medida a 546nm e concentração celular de *Ps. fluorescens* HK44.

Com os dados obtidos, obteve-se a seguinte equação de reta com uma boa correlação linear ($R^2 = 0,999$):

$$[\text{Celular}] = (0,309 \times D.O_{546nm} - 0,013)$$

Essa correlação permitiu calcular a concentração celular (g/L) utilizada em todos experimentos subsequentes.

4.4 Determinação da Curva de Crescimento

Tendo a correlação entre concentração celular e densidade ótica (item 4.3), partiu-se para a caracterização do perfil de crescimento da cepa HK44. Na Figura 4, nota-se o início da fase exponencial em aproximadamente 2h, enquanto que, para atingir a fase que caracteriza a estabilização do crescimento (fase estacionária), foram necessárias mais de 20h.

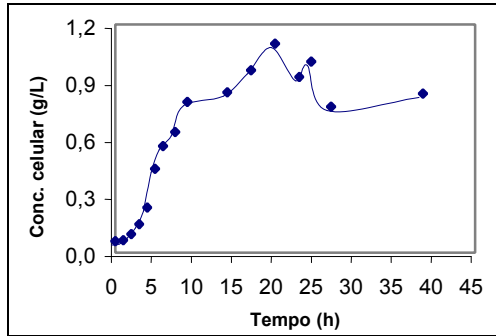


Figura 4. Curva de crescimento da bactéria HK44 em meio YEPG-Tc a 28°C e 150 rpm

Através desta curva, sabe-se quanto tempo as células necessitam para entrar nas fases exponencial e estacionária, informação essa de extrema importância para realização de outros testes.

No experimento de biodegradação de naftaleno, por exemplo, as células utilizadas se encontravam na fase estacionária de crescimento.

4.5 Ensaio de Biodegradação

O experimento de biodegradação de naftaleno ($C_i=10\text{mg/L}$), na concentração celular $0,2\text{g/L}$, foi feito em duplicata e comparado a um controle ausente de células. O poliaromático foi quantificado periodicamente por espectrofotometria a 274nm e sua concentração foi calculada a partir da curva de calibração realizada anteriormente (item 4.2).

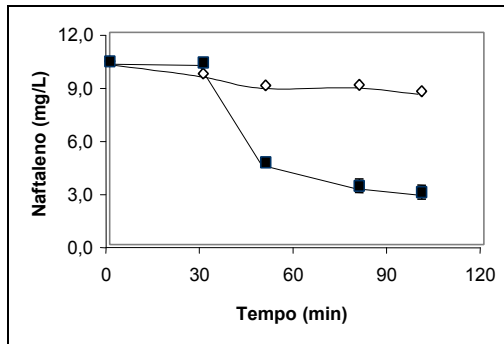


Figura 5. Cinética de biodegradação de naftaleno por *Ps. fluorescens* HK44 a 28°C e 150 rpm: (■) ensaio; (◊) controle

Observa-se, pela Figura 5, que 30 minutos são necessários para iniciar o processo de biodegradação nas condições testadas. Este intervalo pode ser explicado pelo tempo requerido para a produção das enzimas responsáveis pela degradação e/ou para a difusão do contaminante através da membrana celular. Após este tempo, é notável uma diminuição da concentração de naftaleno e uma estabilização desta em 3,0mg/L após 100 minutos de teste. Tal valor de concentração foi menor que o obtido para *Ps. putida* RB1353 (6,0 mg/L) em um mesmo período de ensaio e com a mesma concentração inicial de naftaleno (Dorn *et al.*, 2003).

Os resultados finais do experimento e o percentual de remoção do hidrocarboneto estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados de biodegradação após 100 minutos de teste

	Naftaleno (mg/L)	% Remoção
Ensaio	3,0	71,2
Controle	8,7	16,3

A diminuição da concentração do contaminante, em percentual, observada no controle (16,3%) deve-se à volatilização parcial do contaminante, uma vez que os frascos permaneceram em agitação constante durante todo o período de teste. Descontando-se tal parcela do percentual de remoção do ensaio (71,2%), obtém-se uma remoção real de 54,9% de naftaleno em menos de 2h, demonstrando, assim, um potencial da cepa HK44 em degradar naftaleno.

5. CONCLUSÕES

- ✓ Comprovou-se a absorção máxima do naftaleno em 274nm. Neste comprimento de onda, obteve-se a curva de calibração de naftaleno $D.O._{274nm}=(0,0374 \times [Naft.] + 0,0474)$ ($R^2=0,963$), na faixa de concentração de 0 a 12mg/L .
- ✓ O perfil de crescimento da cepa HK44 foi caracterizado pelo início da fase exponencial em aproximadamente 2h e pela estabilização do mesmo (fase estacionária) em mais de 20h.
- ✓ O experimento de biodegradação de naftaleno, na concentração celular 0,2g/L, comprovou o potencial de degradação da bactéria *Ps. fluorescens* HK44, uma vez que 54,9% de naftaleno foi removido em apenas 100 minutos de teste.

BIBLIOGRAFIA

- Dorn, J. G.; Frye, R. J. e Maier, R. M. Effect of Temperature, pH, and Initial Cell Number on luxCDABE and nah Gene Expression during Naphthalene and Salicylate Catabolism in the Bioreporter Organism *Pseudomonas putida* RB1353. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2209-2216 (2003).
- King, J.M.H.; Digrazia, P.M.; Applegate, B.; Burlage, R.; Sanseverino, J.; Dunbar, P.; Larimer, F. E Saylor, G.S. Rapid Sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science.* 249, 778-781 (1990).
- Tiburtius, E. R. L.; Zamora, P. P.; Leal, E. S. Contaminação de águas por BTXS e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Quím. Nova* 27(3):441-446 (2004).
- Valdman, E.; Valdman, B.; Battaglini, F. e Leite, S. G. F. On line detection of low naphthalene concentrations by a bioluminescent sensor. *Proc. Biochem.* 39 (10):1217-1222 (2004).
- Valdman, E. "Desenvolvimento e aplicação de um biossensor luminescente para detecção de naftaleno", Tese D.Sc., Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro (2004).