

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA  
BIORREMOÇÃO DE PIRENO POR *Rhizopus arrhizus*  
UCP 402 E *R. arrhizus* UCP 402X (mutante)**

RICARDO KENJI SHIOSAKI

Recife  
2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA  
BIORREMOÇÃO DE PIRENO POR *Rhizopus arrhizus*  
UCP 402 E *R. arrhizus* UCP 402X (mutante)**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Microbiologia

Autor: RICARDO KENJI SHIOSAKI

Orientadora: Profa. Dra. GALBA MARIA DE CAMPOS-TAKAKI

Co-Orientadora: Profa. Dra. KAORU OKADA

Shiosaki, Ricardo Kenji

Aspectos bioquímicos e fisiológicos da biorremediação de pireno por *Rhizopus arrhizus* UCP 402 e *R. arrhizus* UCP 402X (mutante) / Ricardo Kenji Shiosaki. - Recife : O Autor, 2004.

xiii, 133 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2004.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Fungos filamentosos (*Rhizopus arrhizus*) – Biorremediação do pireno. 2. Ácidos graxos – Composição química – Análise. 3. Ubiquinonas – Composição química – Análise. Esporangiosporos – Germinação. 5. Pireno – Biossorção. I. Título.

582.281.21  
579.53

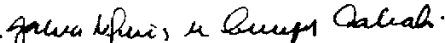
CDU (2.ed.)  
CDD (21.ed.)


UFPE  
BC2004-189

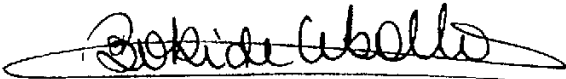
ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA  
BIORREMOÇÃO DE PIRENO POR *Rhizopus arrhizus* UCP  
402 E *R. arrhizus* UCP 402X(mutante)

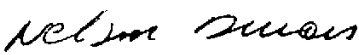
Ricardo Kenji Shiosaki

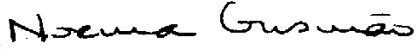
Comissão Examinadora

  
Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)  
Departamento de Química (NPCIAMB/UNICAP), Recife, PE

  
Profa. Dra. Kaoru Okada  
Departamento de Biologia (NPCIAMB/UNICAP), Recife, PE

  
Profa. Dra. Beatriz Susana Ovruski de Ceballos  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campina Grande, PB

  
Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero  
Laboratório de Química Biológica (UNICAMP), Campinas, SP

  
Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE

**Dedico:**

**As pessoas mais importantes da minha vida**

*Meus Pais,  
Kazuo Shiosaki  
Mitsue Fujiwara Shiosaki*

*Minha Irmã,  
Eliza Miwa Shiosaki*

*Renata Inácio*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido concluir esta etapa inicial em minha carreira.

A Profa. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki, pela orientação, pelo incentivo, carinho e valiosos conhecimentos transmitidos.

A Profa. Dra. Kaoru Okada, co-orientadora exemplar, amiga e incentivadora, a quem tanto devo pelos caminhos seguidos até hoje.

A todos os Professores do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, em especial a Profa. Clarissa Daisy Albuquerque, pela grande ajuda nas análises estatísticas e amizade.

Ao Prof. Dr. Benício Barros Neto (Laboratório de Quimiometria/Universidade Federal de Pernambuco), pela contribuição científica e apoio demonstrados em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Kazutaka Fukushima, pela contribuição científica.

A Coordenadora do Doutorado em Ciências Biológicas, Profa. Dra. Luana Cassandra, pela atenção no decorrer do curso.

Aos Técnicos do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais-UNICAP, Severino Humberto de Almeida e Salatiel Joaquim de Santana, pela ajuda na parte experimental deste trabalho.

A minha amiga Sandra Tereza Ambrósio, pela amizade e por estar sempre presente.

Ao meu primo Davi Anabuki pela amizade e grande apoio demonstrado no decorrer do curso.

A todos os amigos do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais-UNICAP, em especial a Petrusk Homero Marinho, Marcos Moraes Filho, Mabel Hanna Vance Harrop, Mabel Calina Paz, Luciana Franco e Taysa Stanford, por estarem presentes nesta etapa importante da minha vida.

A Secretária do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais-UNICAP, Sônia Maria de Souza, pela paciência e atenção.

As Secretárias do curso de Doutorado da UFPE, Adenilda Eugênia, Jaciene Duarte e Liane Salomé, pela presteza no atendimento e pela amizade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado, a FINEP, CNPq/CTPETRO, pelo apoio financeiro e a FACEPE, pela concessão da bolsa de Fixação de Pesquisador.

A Universidade Católica de Pernambuco, na pessoa do Magnífico Reitor Pe. Theodoro Paulo Severino Peters, S.J., pelo apoio e acesso aos laboratórios do NPCIAMB.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS  | viii |
| LISTA DE TABELAS  | x    |
| LISTA DE ABREVIATURAS   | xi   |
| RESUMO  | xii  |
| ABSTRACT  | xiii |
| <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....   | 1    |
| <b>1 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....  | 5    |
| 1.1 <i>HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS</i> .....  | 5    |
| 1.1.1 <b>Histórico</b> .....  | 5    |
| 1.1.2 <b>Estrutura e Classificação</b> .....  | 6    |
| 1.1.3 <b>Dispersão Ambiental</b> .....  | 8    |
| 1.1.4 <b>Processos de Remoção</b> .....   | 10   |
| 1.2 <i>MARCADORES BIOQUÍMICOS: SISTEMA DE UBIQUINONAS E ÁCIDOS GRAXOS</i> .....   | 13   |
| 1.2.1 <b>Sistema de ubiquinonas</b> .....   | 13   |
| 1.2.2 <b>Ácidos graxos</b> .....  | 14   |
| 1.3 <i>FUNGOS FILAMENTOSOS</i> .....  | 15   |
| 1.3.1 <b>Aspectos Biológicos de Esporos de <i>Rhizopus arrhizus</i></b> .....   | 16   |
| <b>2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 18   |
| <br>  |      |
| <b>CAPÍTULO I</b>   |      |
| Efeito do pireno na germinação e no crescimento radial de linhagens selvagem e mutante de <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP402 .....   | 37   |
| <br>  |      |
| <b>CAPÍTULO II</b>  |      |
| Alterações da composição bioquímica de ubiquinonas e de ácidos graxos em <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 402 e <i>R. arrhizus</i> UCP 402x (mutante) mediadas por pireno ..... | 60   |

### **CAPÍTULO III**

|  |    |
|--|----|
| Avaliação da biorremediação de pireno por <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP402 e <i>R. arrhizus</i> UCP402x (mutante) em cultura contínua ..... | 80 |
|--|----|

### **CAPÍTULO IV**

|   |    |
|---|----|
| Remotion of pyrene by <i>Rhizopus arrhizus</i> using factorial design ..... | 98 |
|---|----|

### **CAPÍTULO V**

|   |     |
|---|-----|
| Planejamento fracionário aplicado ao processo de biossorção do pireno por <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 402 e <i>R. arrhizus</i> UCP 402x (mutante)..... | 103 |
|---|-----|

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| <b>CONCLUSÕES GERAIS</b> ..... | 119 |
|--------------------------------|-----|

|                     |     |
|---------------------|-----|
| <b>ANEXOS</b> ..... | 122 |
|---------------------|-----|



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Arranjo estrutural dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos- HAP's (BARBIERI, 1997) ..... 7

### CAPÍTULO I

Figura 1. Germinação de *Rhizopus arrhizus* UCP 402 (A) e *R. arrhizus* UCP 402x (B) no meio Yeast Malt Broth-YMB Controle e tratado com pireno (10 mg/L), cultivados à temperatura de 28°C..... 55

Figura 2. Germinação de *Rhizopus arrhizus* UCP 402 (A) e *R. arrhizus* UCP 402x (B) no meio Sabouraud Sacarose-SAC Controle e tratado com pireno (10 mg/L), cultivados à temperatura de 28°C..... 56

Figura 3. Crescimento radial de *Rhizopus arrhizus* UCP 402 (A) e *R. arrhizus* UCP 402x (B) no meio Batata Dextrose Ágar-BDA Controle e tratado com pireno (10 mg/L), cultivados à temperatura de 28°C..... 57

Figura 4. Crescimento radial de *Rhizopus arrhizus* UCP 402 (A) e *R. arrhizus* UCP 402x (B) no meio Sabouraud Sacarose-SAC Controle e tratado com pireno (10 mg/L), cultivados à temperatura de 28°C..... 58

Figura 5. Crescimento radial de *Rhizopus arrhizus* UCP 402 (A) e *R. arrhizus* UCP 402x (B) no meio Yeast Malt Broth-YMB Controle e tratado com pireno (10 mg/L), cultivados à temperatura de 28°C..... 59

### CAPÍTULO II

Figura 1. Percentual da ubiquinona Q9 em *Rhizopus arrhizus* UCP 402 e *R. arrhizus* UCP 402x (mutante) cultivados no meio de cultura Yeast Malt Broth-YMB controle e tratado com pireno (10 mg/L), à 28°C na ausência de luz. A- Linhagem de *R. arrhizus* UCP402 cultivada em meio controle, B- Linhagem de *R. arrhizus* UCP402 cultivada em meio tratado com pireno (10 mg/L), C- Linhagem de *R. arrhizus* UCP 402x (mutante) cultivada em meio controle, D- Linhagem de *R. arrhizus* UCP 402x (mutante) cultivada em meio tratado com pireno (10 mg/L)..... 77

Figura 2. Composição bioquímica de ácidos graxos de *Rhizopus arrhizus* UCP 402 e *R. arrhizus* UCP 402x (mutante) cultivados no meio de cultura Yeast Malt Broth-YMB à 28°C na ausência de luz. A- Linhagem de *R. arrhizus* UCP402 cultivada em meio controle, B- Linhagem de *R. arrhizus* UCP402 cultivada em meio tratado com pireno (10 mg/L), C- Linhagem de *R. arrhizus* UCP 402x(mutante) cultivada em meio controle, D- Linhagem de *R. arrhizus* UCP 402x (mutante) cultivada em meio tratado com pireno (10 mg/L)..... 78

## CAPÍTULO V

Figura 1. Diagrama de Pareto demonstrando os efeitos sobre a remoção de  
pireno pela linhagem *Rhizopus arrhizus* UCP402x (mutante) ..... 117

Figura 2. Diagrama de Pareto demonstrando os efeitos sobre a remoção de  
pireno pela linhagem *Rhizopus arrhizus* UCP402 (selvagem)..... 117

Figura 3. Linha das respostas do planejamento fracionário da linhagem de  
*Rhizopus arrhizus* UCP402x (mutante)..... 118

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1. Percentual de Ubiquinonas das linhagens de <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 402 e <i>R. arrhizus</i> UCP 402x (mutante), nos meios de cultura controle e tratado com pireno (10 mg/L). ..... | 79 |
|--|----|

### CAPÍTULO III

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1. Biorremocão de pireno por <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 402 e <i>R. arrhizus</i> UCP 402x (mutante) em cultivo contínuo nos meios Yeast Malt Broth-YMB e Sabouraud Sacarose-SAC, à temperatura de 28°C e 140rpm ..... | 97 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| TABELA 2. Cinética de remoção através do micélio vivo de <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 402 e <i>R. arrhizus</i> UCP 402x (mutante) em cultivo contínuo no meio YMB, à temperatura de 28°C e 140rpm. .... | 97 |
|---|----|

### CAPÍTULO V

|   |     |
|---|-----|
| TABELA 1. Variáveis e níveis do planejamento fracionário..... | 115 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| TABELA 2. Resultados do planejamento fatorial para <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP402 (selvagem)..... | 115 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| TABELA 3. Resultados do planejamento fatorial para <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP402x (mutante)..... | 116 |
|--|-----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

BaP – Benzo(a)pireno

BDA- Batata dextrose Agar

CCD- Cromatografia em camada delgada

CG – Cromatografia em fase gasosa

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

HAP- Hidrocarboneto aromático policíclico

Q- Coenzima Q, CoQ ou Ubiquinona

SAC- Peptona e sacarose

UCP – Banco de culturas da Universidade Católica de Pernambuco

YMA – Extrato de levedura e malte Agar

YMB – Caldo de extrato de levedura e malte

## RESUMO

Os fungos da ordem Mucorales têm se destacado pelo seu excelente potencial biológico na eliminação de contaminantes tóxicos do ambiente. Investigações foram realizadas no sentido de utilizar processos de biorremediação para a remoção de pireno por *Rhizopus arrhizus*. Estudos iniciais foram realizados para obtenção de um mutante fisiológico utilizando o teste de resistência ao pireno. O processo de germinação de esporos de *R. arrhizus* demonstrou que a presença de pireno (10 mg/L) nos meios de cultura testados BDA (Batata Dextrose e Ágar) e SAC (Peptona e Sacarose), acelerou o processo de germinação dos esporos das linhagens selvagem e mutante. O crescimento radial das linhagens de *R. arrhizus* foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de pireno no meio de cultura. A linhagem mutante demonstrou melhor adaptação no meio de cultura contendo 50 mg/L de pireno, quando comparada à linhagem selvagem. Estudos subseqüentes foram realizados com os perfis de ácidos graxos e do sistema de ubiquinonas nas linhagens selvagem e mutante, mantidos no meio de cultura YMB contendo pireno (10 mg/L) e o controle (sem pireno). Os resultados com marcadores bioquímicos demonstraram alterações do percentual de ubiquinonas e do perfil de ácidos graxos. As duas linhagens apresentaram as Coenzimas Q7, Q9 e Q10. A linhagem selvagem demonstrou diferença no percentual da Coenzima principal Q9 (32%) em comparação com a linhagem mutante (8,4%). Uma redução discreta nos percentuais dos ácidos graxos também foi observada em ambas linhagens. A análise por cromatografia em fase gasosa (CG), evidenciou a presença dos ácidos graxos: oléico (18:1), palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), esteárico (C18:0), linoléico (C18:2) e  $\gamma$ -linolênico (C18:3). Contudo, observou-se um aumento significativo dos percentuais de ácidos graxos saturados (C16:0) e (C18:0) e insaturados (C18:1) e (C18:2) na linhagem mutante, quando cultivada na presença de pireno (10mg/L). A análise através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também demonstrou um aumento significativo no percentual da Coenzima Q9 na linhagem mutante, quando cultivada na presença de pireno (10 mg/L). Os processos de biorremoção/biossorção do pireno utilizando micélio inativado de *R. arrhizus* UCP402 e UCP402x, em ensaios a partir de um planejamento fatorial de dois níveis, demonstraram taxas elevadas de biossorção, 99,7% (linhagem selvagem) e 99,4% (linhagem mutante). No entanto, a cinética de remoção do pireno com o micélio vivo das linhagens selvagem e mutante, analisados através de CLAE confirmaram o excelente desempenho da biorremoção do pireno, correspondendo a 99,2% e 99,6% no meio YMB e 97,30% e 98,95% no meio SAC, respectivamente, para as linhagens selvagem e mutante. Os resultados obtidos com os processos de biorremoção/biossorção do pireno indicaram o grande potencial biotecnológico de *R. arrhizus* UCP 402x .

## ABSTRACT

The mucoralean fungi order have been distinguished by their excellent biological potential for removal of toxically contaminants from the environment. Investigations have been made in the sense of using bioremediation processes for the removal of pyrene by *Rhizopus arrhizus*. Initial studies have been made for the obtention of a physiological mutant using the pyrene resistance test. The *R. arrhizus* spore germination procedure has shown that the pyrene presence (10 mg/L) in the tested culture medium, Potato dextrose agar and peptone sucrose accelerated the spore germination process of the wild and mutant strains. The radial growth of *R. arrhizus* strains has been inversely proportional to the pyrene concentration increase in the culture medium. The mutant strain has shown better adaptation in the culture medium containing 50 mg/L pyrene, when compared to the wild strain. Subsequent studies have been made with the fatty acids profiles and ubiquinone systems from the wild and mutant strains, maintained in the culture medium Yeast malt broth containing pyrene 10 mg/L and control (without pyrene). Results using Biochemical marker have shown alterations in the ubiquinone percentages and in the fatty acids profiles. Both strains have demonstrated the Q7, Q9 and Q10 coenzymes. The wild strain showed a difference in the percentages of the main coenzyme, Q9 (32%), when compared with the mutant strain (8,4%). A slight reduction in the fatty acids percentages have also been observed in both strains. The gas chromatography (GC) analysis has shown the presence of the fatty acids: oleic (C18:1), palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1), stearic (C18:0), linoleic (C18:2) and  $\gamma$ -linolenic (C18:3). However a significant increase in the fatty acids saturated (C16:0) and (C18:0) and insaturated (C18:1) and (C18:2) in the mutant strain has been observed, when cultivated in the presence of pyrene (10 mg/L). The High performance liquid chromatography (HPLC) results have also shown a significant increase in the coenzyme Q9 in the mutant strain, when cultivated in the presence of pyrene (10 mg/L). The bioremotion / biosorption process of pyrene using inactive mycelia of *R. arrhizus* UCP402 and *R. arrhizus* UCP402x, in tests through a two levels factorial planning have shown high rates of biosorption, 99,7% (wild strain) and 99,4% (mutant strain). However the removal kinetics with live mycelia from the mutant strain, analyzed through HPLC confirmed the excellent performance in the pyrene bioremotion, corresponding to 99.2% and 99.6% in the YMB medium and 97,30% and 98,95% in the SAC medium, respectively to the wild and mutant strains. The results obtained from the bioremotion / biosorption of pyrene suggest the great biotechnologic potential of *R. arrhizus* UCP 402x.