

Leveduras Degradadoras de Hidrocarbonetos Pesados

Projecto no âmbito das Bolsas Universidade de Lisboa – Fundação Amadeu Dias 2008/2009

Relatório de Progresso

André Filipe da Costa Faustino

Tutorado pelo Professor Doutor Belarmino A. S. Barata

31 de Julho de 2009

Índice

1. Introdução	2
2. Aspectos Experimentais	3
2.1. <i>Meio Quimicamente Definido</i>	4
2.2. <i>Crescimento em Bioscreen e Nefalómetros – Meios Líquidos</i>	5
2.3. <i>Crescimentos em Placas – Meios Sólidos</i>	6
2.4. <i>Obtenção e Preparação dos Produtos de Refinaria</i>	7
3. Experiências e Resultados	8
3.1. <i>Primeiro Bioscreen</i>	8
3.2. <i>Nefalómetros</i>	11
3.3. <i>Análise aos Produtos da Refinaria – GC-MS</i>	14
3.4. <i>Segundo Bioscreen</i>	18
3.5. <i>Terceiro Bioscreen</i>	22
3.6. <i>Crescimentos em Placas – Meios Sólidos</i>	24
4. Conclusão e Perspectivas Futuras	27
5. Bibliografia	29
6. Agradecimentos	35
Anexos	36

1. Introdução

O potencial biotecnológico das leveduras encontra-se bem documentado na literatura e tem incidido particular interesse sobre um grupo designado de “leveduras não-convencionais” [Spencer 2002]. O desafio de caracterização e exploração destes Eucariotas, quer teórica quer aplicada, alternativamente às Bactérias, levou à procura e selecção de uma espécie/estirpe que facultasse a possibilidade de uma avaliação selectiva da sua capacidade degradadora de hidrocarbonetos pesados. Originalmente este interesse foi despertado pela sua ocorrência e isolamento em ambientes naturais contaminados por tais compostos, devido a acidentes ambientais (“*oil spills*”) em diferentes locais.

Procurou-se então uma levedura que apresentasse algumas das propriedades que a tornassem adequada ao plano de trabalho experimental. De algumas possibilidades, foi escolhida a espécie *Yarrowia lipolytica*, devido às suas características já descritas na literatura, obtendo-se duas estirpes *selvagens*, designadas respectivamente de W29 e IMUFRJ50682 (RJ) – cedidas pela Universidade de Aveiro. Dessas particularidades destacam-se a produção e secreção de um surfactante endógeno (facilitando o seu acesso a substratos hidrófobos), alguns outros metabolitos e enzimas como: citrato, compostos sulfonados, aromas, proteases, lipases, [Amaral 2006, Amaral2 2006, Barth 1997, Madzak 2004, Fickers 2004]; e a versatilidade de utilização de diversas fontes de Azoto [Fickers1 2004]. O facto de, como “levedura não-convencional” apresentar um potencial industrial distinto [Spencer 2002, Finogenova 2002, Kamzolova 2005], ser a espécie mais estudada deste grupo, estar referenciada como desempenhando um papel ecológico importante e, mais relevantemente, como uma levedura que usa n-alcenos e 1-alcenos como fontes de Carbono [Madzak2004], foram também factores muito importantes na sua escolha. Pensou-se que o seu interesse industrial será reforçado quando se conseguir entender o uso de hidrocarbonetos e outros compostos hidrófobos como fontes de Carbono alternativas, e até geradoras de novos produtos. Esta possibilidade e a sua caracterização metabólica ligariam o interesse ecológico a aplicações industriais.

Não só a levedura seleccionada (estritamente aeróbia [Barth1997], mas dimórfica [Ruiz-Herrera2002]) limita a sua utilização dos compostos a um modo de crescimento aeróbio, como a composição dos destilados de petróleo enquadram a escolha dos hidrocarbonetos a utilizar. Neste contexto, tentou-se promover o crescimento leveduriforme em detrimento da forma micelar (hifas), as duas formas referidas na literatura e por nós também observadas ao microscópio.

Para se produzir biomassa em diferentes condições (de quimiostato), a otimizar a partir de diferentes fontes de hidrocarbonetos seleccionadas, é necessário fazer uma exploração (“screening”) dos parâmetros básicos de crescimento em cultura descontínua, quer em nefalómetros, quer através de Bioscreen (crescimentos realizados em microplacas). Nesta fase, pretendeu-se desenvolver um meio de crescimento quimicamente definido. Paralelamente, através da realização de electroforeses bidimensionais (proteomas) da biomassa obtida, poder-se-á averiguar a expressão selectiva (ou não) de diferentes enzimas com a variação da composição do meio de crescimento. Da análise dos dados obtidos será então possível a caracterização os enzimas (que sejam identificados nos proteomas) em termos da massa molecular (MM) e ponto isoeléctrico (PI), e também das adequadas condições de crescimento, tendo em vista otimizar a produção da biomassa, ou de algum metabolito de interesse, em quimiostato.

Construiu-se assim um projecto com objectivos ambiciosos, com a pretensão de que os seus resultados pudessem vir a permitir, também, a definição de condições ideais para a purificação de enzimas de interesse bioquímico e biotecnológico. Neste relatório de progresso, apresentam-se os dados já obtidos e a análise das curvas de crescimento nas diversas condições testadas, para as duas estirpes de *Yarrowia lipolytica*, reportando a evolução do projecto consoante os resultados sucessivamente obtidos.

2. Aspectos Experimentais

A recolha e selecção extensiva da informação acerca da levedura em questão, das vias metabólicas associadas à utilização de n-alcanos e dos enzimas caracterizados envolvidos nestes processos, resultaram numa vasta biblioteca de referências, onde se encontram cerca de 80 artigos e teses que serviram de apoio e base no desenvolvimento das propostas deste trabalho. Com estes objectivos em vista, e findo o trabalho de levantamento teórico, foi necessário proceder à elaboração dos protocolos de execução das tarefas propostas (que se encontram em anexo), que foram sendo discutidas e aprovados pelo tutor.

Em particular, o simples desafio da construção de meios de cultura completamente controláveis, com compostos hidrófobos, e o problema da adaptação das células a esses meios, suscitou a possibilidade de se elaborar um meio quimicamente definido.

2.1. Meio Quimicamente Definido

Com base nas informações recolhidas na literatura, começou-se por analisar as fontes Carbono e de Azoto descritas e contemplar a possibilidade de evitar a utilização de Yeast Extract e outros componentes ou factores de crescimento indefinidos. Tentou-se então compensar a ausência deste tipo de factores de crescimento com uma solução de vitaminas e oligoelementos e, de passagem, abrir a possibilidade de detectar padrões de essencialidade/toxicidade, através da variação das suas concentrações de forma independente.

No design final dos meios utilizados, caracterizou-se o balanço entre os diferentes componentes (ver anexo). Houve um particular cuidado com as quantidades de Magnésio e Ferro, reportadas na literatura como indutores de crescimento leveduriforme.

Relativamente às fontes de Carbono alternativas (hidrófobas), tentou-se manter a molaridade nominal total, independentemente do número de átomos de Carbono de cada composto, e estudou-se também a adição de um surfactante exógeno como forma de facilitar o acesso das células aos mesmos. Quanto à fonte de Azoto, optou-se alternativamente entre uma fonte inorgânica (Cloreto ou Sulfato de Amónio) e a Glutamina, particularmente recomendada na literatura como promovendo o crescimento leveduriforme [Ruiz-Herrera 2002], todas substituindo a utilização de Peptona. Finalmente, o facto de uma das estirpes (RJ) ter sido originalmente isolada em meio marinho, sugeriu a possibilidade de testar o efeito da variação da salinidade até ao limite de 10 % (m/v) [Hadler 1981]. O tampão de Fosfatos de potássio a 50 mM, de forma a manter o pH constante a 7,0, garante a presença do fósforo. Apesar de o enxofre aparece no meio maioritariamente como sulfato de amónio, também ocorre na forma de Tiamina (a vitamina adicionada na solução de Oligoelementos). Foram ainda feitas 6 soluções independentes, para uma concentração final maior que na solução geral de Oligoelementos, dos sais de iões de: o ferro (Fe^{2+}), zinco (Zn^{2+}), o tungsténio (W, na forma WO_4^{2-}), o molibdénio (Mo, na forma MoO_4^{2-}), o vanádio (V, na forma VO_3^-) e o alumínio (Al^{3+}). Finalmente, prepararam-se soluções stock de SDS e Tween 80, não só como possíveis fontes de C, mas como surfactante exógeno para o acesso às fontes de C hidrófobas.

Os meios finais, antes da inoculação, resultaram de adições sucessivas de soluções stock mais concentradas de todos estes componentes (anexo), que foram esterilizadas por autoclavagem ou filtração consoante os casos. O processo de construção do meio quimicamente foi aferido por comparação de resultados obtidos dos ensaios de Bioscreen com os crescimentos feitos em meios convencionais de Yeast Extract e Peptona.

2.2 Crescimento em Bioscreen e Nefalómetros – Meios Líquidos

Com vista à caracterização das condições mínimas de crescimento (OD máxima, taxa específica de crescimento e forma das curvas), realizaram-se ensaios em meio YP através de um método de medição de replicas em tempos sobrepostos. Para tal, fizeram-se medições, no tempo, do crescimento pontual a partir de inoculações desfasadas (duplicados) para cada uma das estirpes em diferentes fontes de C: Glucose, Ácido Oleico e Hexadecano. Estes resultados são comparáveis com os do Primeiro Bioscreen, e alertaram logo para a perturbação que a presença de Tween 80 induzia na medição da OD/mL, por formação de micelas.

O Bioscreen é um espectrofotómetro de microplacas que permite a obtenção em condições fisicamente homogéneas de 200 curvas de crescimento simultaneamente. De notar que realizar todos estes crescimentos em nefalómetros tornar-se-ia impraticável, não só pelo gasto de reagentes e tempo de execução, como também não garantiria a mesma coerência em termos das condições experimentais entre todos os ensaios, com parâmetros definidos de temperatura, agitação, intervalos de medição, como é possível num Biopscreen. No entanto, o Bioscreen é um aparelho muito requisitado, pelo que o acesso ao mesmo é espaçado, o que induz um atraso no ritmo de obtenção dos resultados necessários para a prossecução do projecto. A complementaridade com o trabalho em nefalómetros permitiu não só avançar alguns ensaios, como intercalibrar os dois métodos.

O primeiro Bioscreen contemplou:

- O objectivo de se obter um meio quimicamente definido, comparando-se essencialmente os efeitos da substituição do Yeast Extract (YE) pela solução de Oligoelementos (OE) elaborada, e da substituição de Peptona (Pep, hidrolizado proteico através de pepsina) por Glutamina (Gln), através da análise das curvas de crescimento obtidas.
- Testes de aumento de concentração de alguns elementos metálicos (descritos acima) no meio de OE com Gln, para refazer ou afinar a solução de OE. Todas estas condições foram ensaiadas para cada uma das fontes de Carbono (C) escolhidas (0,1 M final): Glucose (Gluc), Hexadecano (Hxd), Glucose e Hexadecano (0,05 M de cada), Ácido Oleico (AO) e dodecilo sulfato de sódio (SDS).
- Paralelamente, o efeito do aumento da concentração de cloreto de sódio (NaCl), de +1% (m/v) e +10% (m/v), no meio YPD.

- Ainda dois ensaios, em YE com Pep, nos quais as fontes de C são Glucose e Hexadecano à concentração de 25% + 75% num, e 75% + 25% no outro, respectivamente, para 0,1 M total destas fontes de C no meio.

Todos os ensaios continham sulfato (SO_4^{2-}) a ≈ 11 mM, Fosfatos a 50 mM ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, tamponado a pH 7,0), e Tween 80 à concentração de 0,03% (v/v), um surfactante que se pressupõe não ser consumido. Com duplicados, dois controlos sem inóculo, e para as duas estirpes, obtiveram-se um total de 200 curvas distintas.

Como seria de esperar, alguns destes resultados revelaram-se inconclusivos nesta fase, levando a que se começasse a concretizar a ideia de um segundo Bioscreen. Testaram-se assim:

- O efeito do uso de surfactantes exógenos na utilização de Hexadecano.
- Meios com Glucose (com e sem Hexadecano), Hexadecano, Ácido Oleico, Dodecano, 1-alcoois lineares de C9 a C12, Glutamina, Peptona, quatro compostos de refinaria (Gasolina, Gasóleo, Jet e Isoctano) e Tween 80 como possíveis fontes de Carbono, mas todos sem Tween 80 como surfactante (servindo de controlo para algumas condições do primeiro Bioscreen).
- A influência de diferentes concentrações de Tungstato em meio contendo Hexadecano e Gln.
- Controlos negativos (sem inóculo) para determinação da contribuição de certos compostos (Hexadecano, Tween 80, Ácido Oleico com e sem Tween 80, 1-nonanol, e os 4 compostos da refinaria) na OD/mL.

Tornou-se imprescindível a realização do um terceiro Bioscreen para o esclarecimento de algumas dúvidas que advieram dos resultados do Bioscreen anterior. A diferença fundamental foi a alteração da fonte de Azoto de orgânica para inorgânica, devido ao reconhecimento experimental da forma como a Glutamina influenciava muito significativamente o crescimento de ambas as estirpes. Este terceiro Bioscreen caracterizou-se por ser muito análogo ao anterior, igualmente sem Tween 80, com a substituição da Gln por uma fonte inorgânica de Azoto – Cloreto de Amónio. Incluiu ainda a comparação entre com o Sulfato de Amónio para algumas fontes de Carbono (Glucose, Ácido Oleico, Dodecano e Hexadecano).

2.3 *Crescimentos em Placas – Meios Sólidos*

Este tipo de crescimento (genericamente em YPD, mas depois em meio quimicamente definido), precede todos os crescimentos anteriormente referidos, na medida em que se utilizaram colónias frescas isoladas de repicados de sucessivas placas, de forma a finalmente se ter uma cultura

líquida homogénea na mesma fase de crescimento, que não só foi observada ao microscópio, como também usada na inoculação dos poços dos Bioscreens e Nefalómetros.

Mas, tornou-se necessário utilizar o plaqueamento como técnica alternativa de fornecimento de fontes de C às leveduras a partir das observações anteriores que mostraram como a imiscibilidade/hidrofobicidade dos compostos, e/ou a falta de adaptação metabólica das células a eles expostas, influenciava negativamente a sua utilização e consequentemente o crescimento. Neste segundo sentido, utilizou-se um método descrito na literatura [Endoh-Yamagami 2007] e [Hirakawa 2009], proposto pelos autores para ultrapassar as dificuldades de adaptação em cultura líquida com este tipo de compostos. Consisti genericamente em humedecer um papel de filtro, previamente esterilizado, com a fonte de C pretendida, e deixar solidificar sobre ele o meio quimicamente definido, com agar a 2% e Cloreto de Amónio como fonte de N. Este método foi utilizado quer para os compostos puros, quer para os da refinaria, e tem a vantagem de não impedir a necessária oxigenação do meio que a natureza bifásica dos meios líquidos também poderá ter bloqueado.

2.4 *Obtenção e Preparação dos Produtos de Refinaria*

A CLC forneceu 6 fracções de produtos de refinaria que habitualmente processam e formulam nas suas instalações em Aveiras de Cima e provenientes, por pipeline comum, da refinaria de Sines. Decidiu-se analisar por cromatografia Gasosa o conteúdo em cadeias carbonadas dos diferentes compostos. Nos cromatogramas resultantes e da análise da sua distribuição, decidiu-se utilizar 4 das fracções a testar no crescimento da levedura. Como o objectivo foi privilegiar a degradação das cadeias mais pesadas, e qualquer das fracções contém produtos voláteis das cadeias mais leves, fizeram-se cromatogramas não só do produto original, como também dos mesmos após evaporação durante uma semana a 30°C em banho-maria. Constatou-se cromatograficamente que efectivamente, em cada fracção eram retidas sensivelmente a mesma quantidade de cadeias pesadas e libertaram-se significativamente as cadeias mais leves.

3. Experiências e Resultados

3.1 Primeiro Bioscreen

Como resultado deste ensaio, concluem-se os seguintes pontos por observação e comparação das curvas obtidas. É de referir que, sempre que há crescimento, atingem-se valores de OD/mL acima de 1 U. A., embora os tempos sejam diferentes. É importante, independentemente dos valores concretos dos parâmetros de crescimento que as curvas revelam, atender e comparar a sua forma.

Nos meios contendo SDS, enquanto possível (mas muito improvável) fonte de C, não se observou qualquer crescimento. Isso deve-se às suas propriedades de poderoso detergente, mesmo em baixas concentrações, desintegrando as membranas celulares e rebentando assim com as células. Observou-se também facilmente que nos ensaios com Ácido Oleico, o aumento de OD/mL foi demasiado brusco em todas as variantes dos meios testados, de tal forma que não pôde ser correlacionado com um crescimento muito rápido, mas antes com um qualquer problema no meio de cultura. Nesta fase, esse problema não foi identificado, embora se suspeitasse da acção do Tween 80 como surfactante desta substância hidrófoba em meios aquosos. Estes resultados são apresentados em anexo e, apesar de não se ter efectuado qualquer tratamento dos mesmo, condicionaram o design e a interpretação dos Bioscreens seguintes.

Comparando agora as restantes fontes de C nos diferentes meios (Figura 1), nomeadamente, Gluc (a referência), Hxd, e Gluc + Hxd nas diferentes concentrações, observa-se um comportamento distinto do crescimento em Gluc sempre que há Hxd no meio, mesmo em pequena quantidade. As curvas dos meios com Gluc e Hxd são mais semelhantes às de 100% Hxd, o que sugeriu que as estirpes de *Yarrowia lipolytica* usadas preferissem o Hxd à Gluc apesar de apresentarem um crescimento mais lento (1a e 1b).

Nos meios com mais alguns metais, pode afirmar-se que estes não afectam o crescimento em Gluc nas condições usadas (Anexo). Em todos os casos, à excepção do tungsténio, apresentaram crescimento igual ou inferior ao do meio com Hxd comparativamente com o meio de Gluc + Hxd (1c). O tungsténio é o único, nas duas estirpes, que parece promover um melhor crescimento em Hxd, relativamente a Gluc + Hxd, embora estes resultados permaneçam um pouco ambíguos (1c).

Através dos gráficos presentes na Figura 2, conclui-se para as três fontes de C ensaiadas que a solução de OE preparada substitui bem o YE e que a Gln também substitui bem a Pep porque os

crescimentos são muito idênticos, não havendo problemas de adaptação a estes meios (2a). Não foi necessário aumentar a concentração de nenhum dos metais testados no meio de OE já que todas as curvas referentes aos meios com os mesmos são iguais ou inferiores à do meio de OE com Gln (OG), usado como referência para estes casos (2b, exemplo dos meios com OG e Hexadecano). A comparação das curvas de crescimento com YE em função da concentração crescente de cloreto de sódio, revela uma diminuição desse crescimento a partir de um certo limiar. Por outro lado, a sobreposição da curva de crescimento em Oligoelementos, coincidente com as obtidas em YE e moderada concentração de NaCl, não levou à conclusão nem ao teste do limiar do efeito do mesmo NaCl no meio quimicamente definido, pelo que a concentração deste sal não foi afinada.

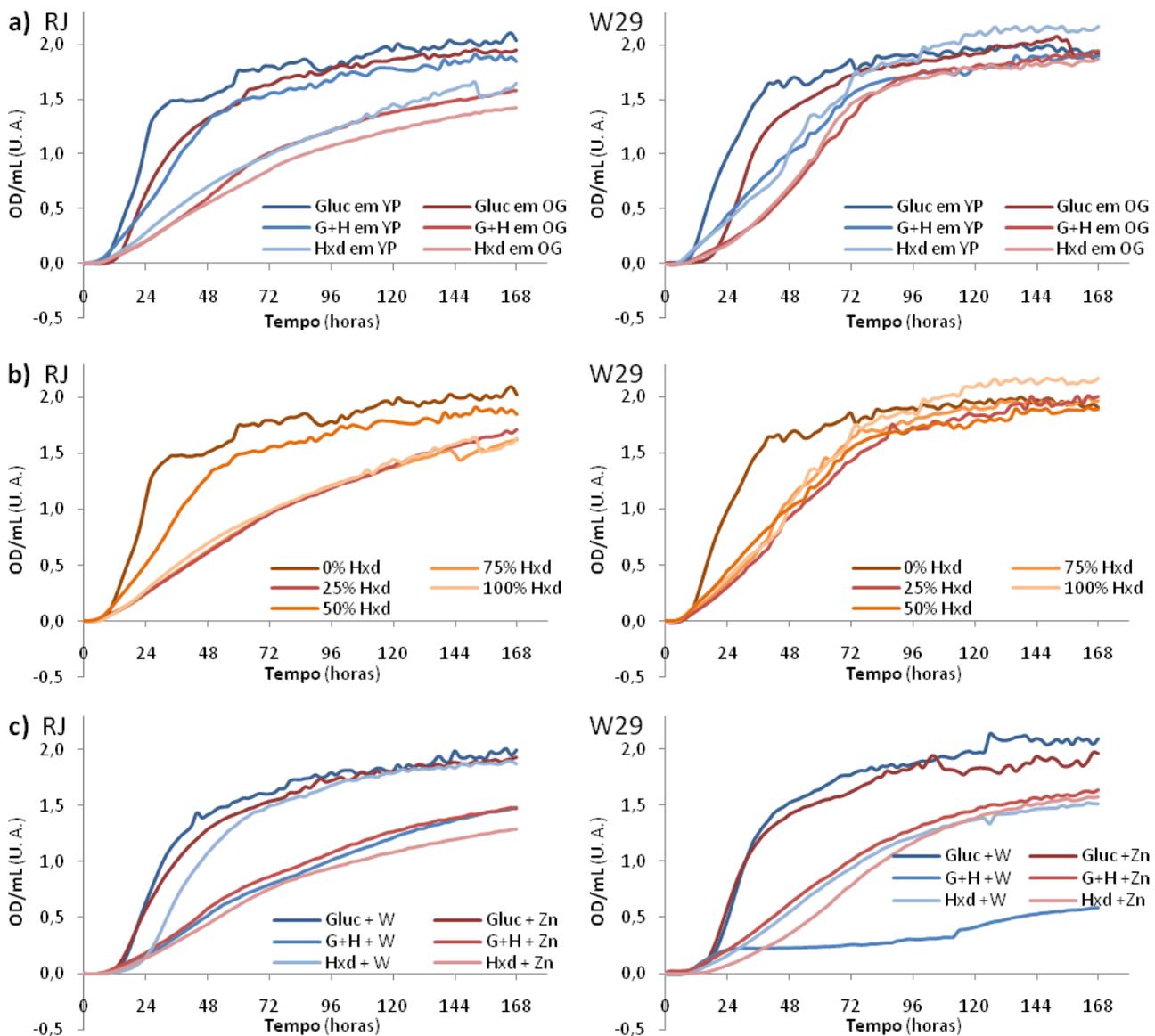


Figura 1 – Curvas de crescimento das duas estirpes em glucose (Gluc), em hexadecano (Hxd) e em 50% glucose e 50% hexadecano (G+H) nos meios: **a)** Yeast Extract com Peptona (YP) e Oligoelementos com Glutamina (OG), **c)** em meio OG com mais tungstênio (+W) e com mais zinco (+Zn). Em **b)** apresentam-se curvas de meios YP com diferentes quantidades de hexadecano, e tendo a quantidade de glucose uma percentagem inversa para 0,1 M de fontes de C total.

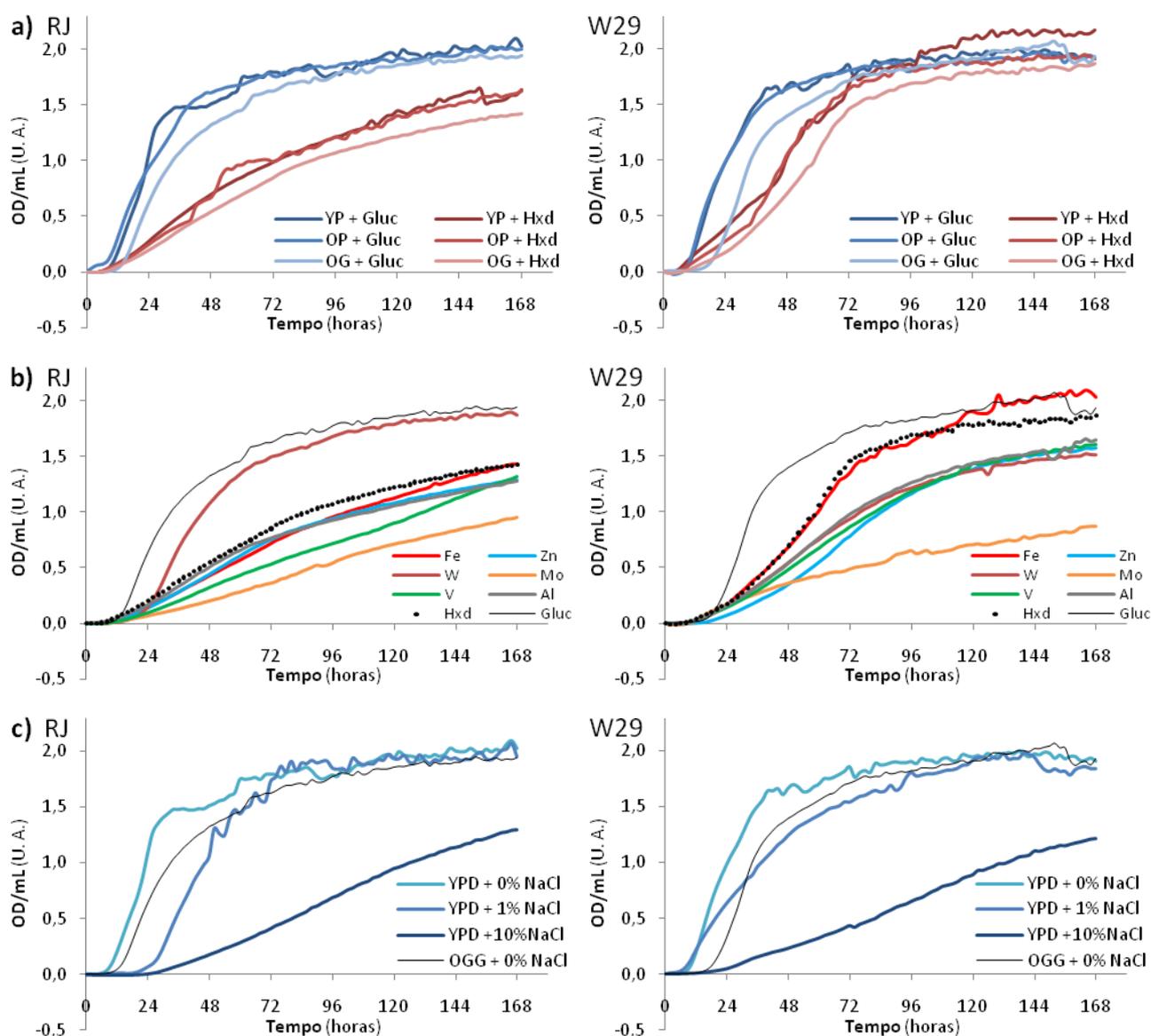


Figura 2 – Curvas de crescimento das duas estirpes nos meios: **a)** com Yeast Extract e Peptona (YP), com Oligoelementos e Peptona (OP), e com Oligoelementos e Glutamina (OG), em glucose (Gluc) e em hexadecano (Hxd); **b)** com mais ferro (Fe), zinco (Zn), tungsténio (W), molibdénio (Mo), vanádio (V) e alumínio (Al) em Oligoelementos com Glutamina e hexadecano, tendo o mesmo base (Hxd) e o meio com glucose (Gluc) como referências; **c)** YPD, YPD com +1% e com +10% de NaCl, e OG com glucose (OGG) sem mais adição de NaCl, como referência.

Atendendo às duas estirpes usadas, observaram-se diferenças, nesta fase do estudo, entre o crescimento das mesmas (Figuras 1 e 2, todos os gráficos). Em Gluc, com todas as condições testadas, o crescimento das estirpes é muito semelhante. A estirpe W29 parece crescer melhor que a RJ (maior OD/mL atingida num menor intervalo tempo), nos meios onde está presente o Hxd. No entanto, apesar dessas diferenças, a reacção a cada um dos metais foi muito semelhante nas duas

estirpes, havendo um decréscimo ou manutenção do crescimento na maior parte dos casos, e sempre um aumento no caso do tungsténio, como foi referido anteriormente.

Com toda a informação obtida nestes crescimentos, colocaram-se algumas dúvidas e desafios experimentais que justificaram outro ensaio de Bioscreen. Pretendeu-se testar então: se seria possível obter curvas de crescimento em AO no Bioscreen; se o a Glutamina, a Peptona e o Tween 80 poderiam ser usados como fonte de C; se é necessário Tween 80 como surfactante nos substratos hidrófobos e se este pode ser substituído por SDS em baixa concentração; se realmente as leveduras preferem Hexadecano à Glucose, ou se este não seria consumido mas apenas afectaria o crescimento; se o tungsténio (em WO_4^{2-}) afecta positivamente o crescimento; e se há crescimentos noutras fontes de C, como álcoois. A isto se adicionaria, no espaço dos 200 poços das placas do novo Bioscreen, um primeiro teste às fracções seleccionadas e obtidas da refinaria.

3.2 Nefalómetros

Na mesma altura em que foi feito o primeiro Bioscreen, foram usados Nefalómetros como abordagem mais clássica. Para se calcularem alguns parâmetros de crescimento, o valor da taxa de crescimento específica ($\mu_{m\acute{a}x}$) e da densidade óptica máxima atingida por mililitro ($OD_{m\acute{a}x}/mL$), obtiveram-se curvas através de dois métodos de medição de OD/mL diferentes. Em ambos os métodos foram medidos dois grupos de culturas em duplicado para cada estirpe, com ≈ 20 mL de meio em frascos de 100 mL (procedimento em anexo). Cada foi grupo inoculado em horas estratégicas diferentes de modo a ser conseguida uma curva contínua por junção dos dados num mesmo gráfico.

Numa abordagem simples, (teoricamente) na fase de crescimento exponencial, cada célula divide-se em duas num determinado tempo médio, denominado tempo de duplicação (t_d). Assim, o número de células em cada instante t da fase exponencial (N_t) é dado pela equação:

$$N_t = N_0 \times 2^{\left(\frac{t}{t_d}\right)}$$

; em que o número de células viáveis no início da fase exponencial é N_0 . No espaço logarítmico, esta equação é uma recta:

$$\ln(N_t) = \mu_{m\acute{a}x} \times t + \ln(N_0)$$

; em que $\mu_{m\acute{a}x}$ é a taxa de crescimento específica, uma medida do t_d , que é expressa por:

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln(2)}{t_d}$$

Este parâmetro foi obtido por ajuste linear de uma recta ao logaritmo dos dados, sendo apresentado como $\mu_{m\acute{a}x}(t_d)$. A $OD_{m\acute{a}x}/mL$ é uma medida da maior densidade celular atingida em determinado meio, e foi calculada através da média dos valores de OD/mL no final da fase pós-exponencial e ≈ 4 dias após inocular. As curvas experimentais são objectivas e poderão ser tratadas com uma abordagem e um modelo mais complexos à medida que for possível elucidar todas as variáveis que afectam a definição daqueles parâmetros.

Usou-se um primeiro procedimento, em meio YPD com 4 ensaios para cada estirpe e 1 controlo sem inóculo, em que se mediram valores de OD/mL de fracções diluídas das culturas em crescimento. Tendo em conta que se tratam de suspensões de células e as medições são de absorvência, quando se obtinha um valor maior que 0,400 a 0,500 OD/mL aumentava-se o factor de diluição (f.d.) aproximadamente para o dobro. Os valores de OD/mL corrigem-se multiplicando pelo f.d. e subtraindo ao valor inicial. Os resultados obtidos e o tratamento efectuado aos dados são apresentados na Figura 3.

Com as linhas de tendência ajustadas aos dados em 3b obtêm-se os valores de $\mu_{m\acute{a}x}(t_d)$ para as duas estirpes: $0,604\ h^{-1}$ (1h 09min) para a RJ, e $0,613\ h^{-1}$ (1h 08min) para a W29. Os valores são muito semelhantes, não sendo evidentes as diferenças entre o crescimento na fase exponencial das estirpes neste meio, como também é mostrado pelos dados presentes nos gráficos da Figura 3. Através do gráfico logarítmico (3b) parece que o crescimento está a parar às 33h, o que é apoiado pelo gráfico pequeno de 3a. Calculando os valores de $OD_{m\acute{a}x}/mL$ como descrito, obtiveram-se 34,8 OD/mL para a RJ e 38,6 OD/mL para a W29 (linhas tracejadas em 3a), que são um pouco díspares. No entanto, este resultado é duvidoso devido à dispersão dos pontos (notório em 3a, sendo resultado do método usado), pelo que os valores de $OD_{m\acute{a}x}/mL$ calculados podem não ser assim tão diferentes. É de ressaltar no entanto que os da estirpe W29 são um pouco mais elevados que da RJ.

Numa segunda abordagem fizeram-se crescimentos em YP com três fontes de C diferentes: Glucose (Gluc), Ácido Oleico (AO) e Hexadecano (Hxd). As diferenças entre os meios, relativamente ao ensaio anterior, compreendem ainda a presença de Tween 80 como surfactante (0,03% m/v), as colónias não eram frescas nem de meio líquido (maior fase de adaptação), e não se efectuaram diluições na medição dos valores de OD/mL. Portanto, não serão calculados os $OD_{m\acute{a}x}/mL$ devido ao limite de sensibilidade do espectrofotómetro ser 2-3 OD/mL, e os resultados com células sem diluição são pouco fiáveis a partir de $\approx 0,500$ OD/mL. Também os valores de $\mu_{m\acute{a}x}(t_d)$ são incertos e sujeitos a algum erro, mas estes serão calculados. Os dados tratados são apresentados na Figura 4.

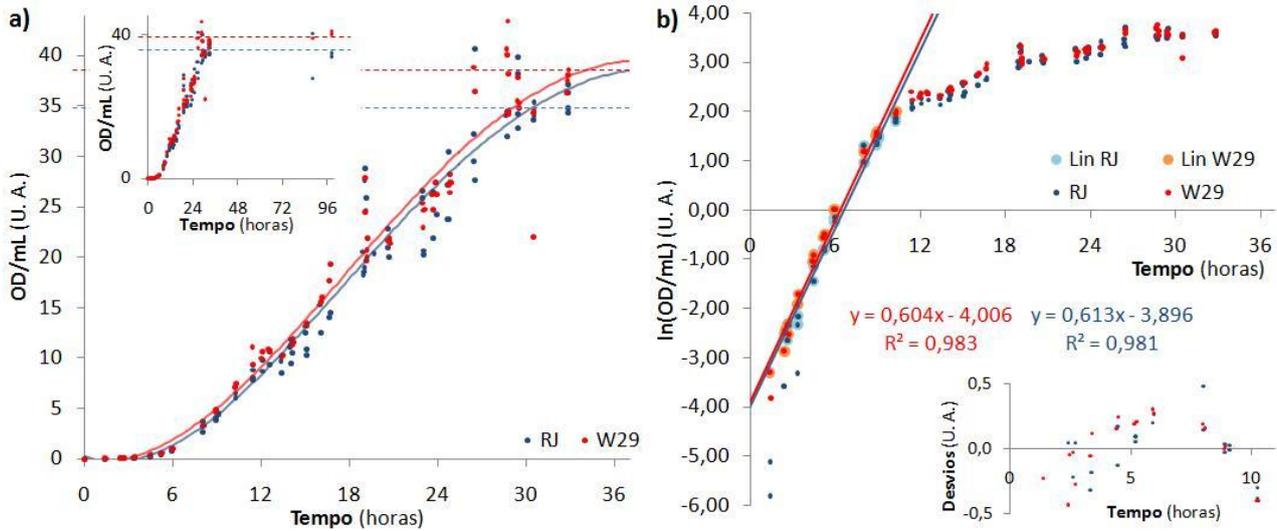


Figura 3 – Gráficos dos crescimentos obtidos em YPD com diluição. **a)** Crescimento de ambas as estirpes (ver legenda na imagem) até às ≈ 33 horas. As linhas cheias apenas mostram a tendência global do crescimento, e as linhas tracejadas mostram o patamar de fase estacionária, tomando o valor de $OD_{m\acute{a}x}/mL$. O patamar é mais evidente no gráfico pequeno, até às 96 horas. **b)** Gráfico logarítmico (ln) dos pontos mostrados em a) e respectivas linhas de tendência para a fase exponencial, com as equações da mesma cor. Os pontos sublinhados a azul claro e laranja foram os usados na linearização, e o gráfico pequeno mostra os desvios desses pontos à em relação à linha de tendência.

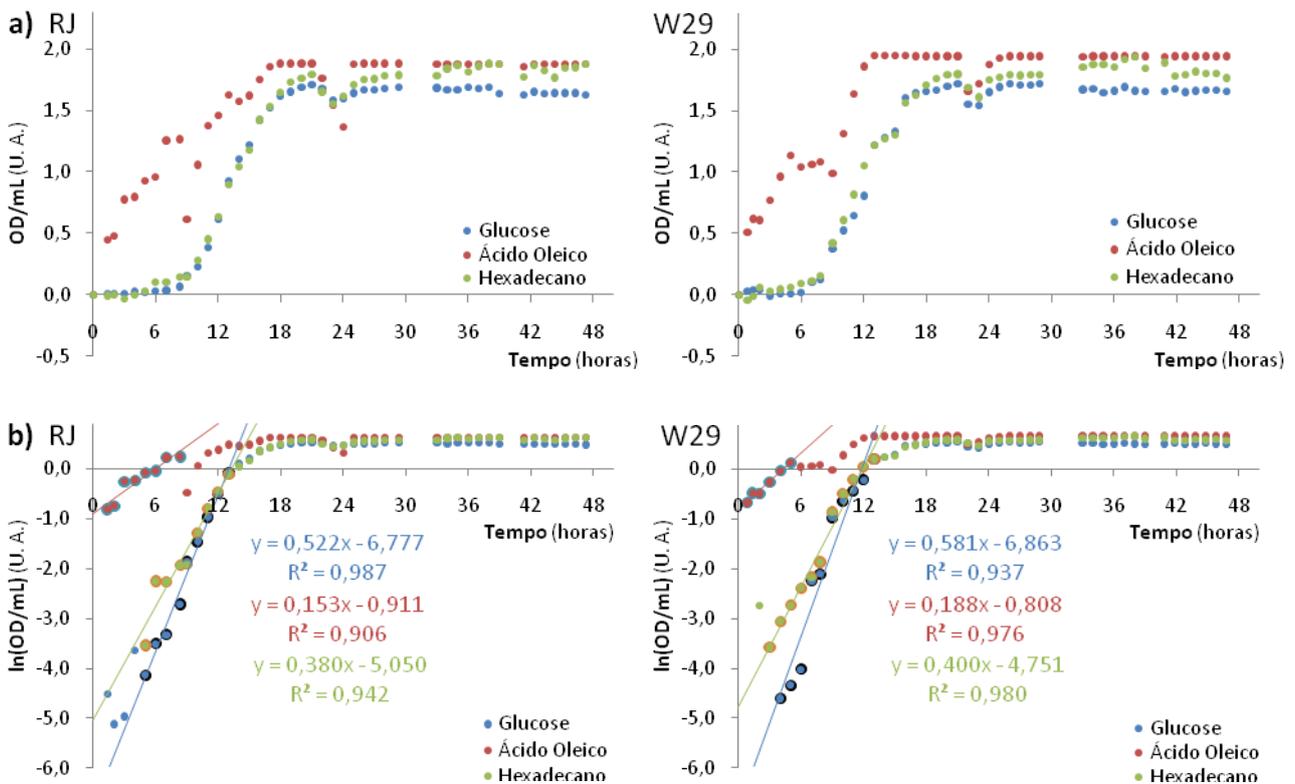


Figura 4 – Gráficos dos crescimentos em YP com diferentes fontes de C sem diluição: glucose (azul), ácido oleico (vermelho) e hexadecano (verde). **a)** Pontos (subtraídos ao primeiro) obtidos para cada uma das estirpes. **b)** Gráficos logarítmicos dos pontos de a) com cada linha de tendência da fase exponencial, e equação, da respectiva cor. Os pontos usados para obter as linhas de tendência são os sublinhados a cor diferente.

Através da análise de 2a, a curva em Hxd não parece muito diferente da curva em Gluc, e a de AO é a que apresenta mais diferenças e também mais variabilidade. No espaço logarítmico, mostrado em 3b, é difícil ajustar uma recta à zona exponencial, como é observável, ainda assim conseguiu-se que cada uma se ajustasse a um bom número de pontos. Os declives dão os valores de $\mu_{máx}(t_d)$ nos diferentes meios: em Gluc, $0,522 \text{ h}^{-1}$ (1h 20min) na RJ e $0,581 \text{ h}^{-1}$ (1h 12min) na W29; em AO, $0,153 \text{ h}^{-1}$ (4h 32min) na RJ e $0,188 \text{ h}^{-1}$ (3h 41min) na W29; em Hxd, $0,380 \text{ h}^{-1}$ (1h 49min) na RJ e $0,400 \text{ h}^{-1}$ (1h 44min) na W29. Com estes dados pode dizer-se que (tal como nas curvas em YPD) são evidentes grandes diferenças no crescimento das estirpes nestes meios, se bem que a W29 parece crescer um pouco mais rapidamente que a RJ em todos os casos. Conclui-se também que, para ambas as estirpes, o crescimento em Gluc é sempre melhor, e que em AO é mais lento que em Hxd ou Gluc. As curvas em Hxd e em Gluc não são efectivamente muito diferentes.

Mas esta experiência foi particularmente importante por uma observação feita nos meios ainda antes de serem inoculados. Devido à presença de Tween 80, os meios bifásicos – AO e Hxd, porque são imiscíveis em água – formavam micelas de pequena dimensão que turvam bastante o meio, mesmo sem agitação. Esta constatação teve uma enorme relevância na medição dos resultados, já que estes meios começavam logo com valores de OD/mL muito superiores, da ordem dos 0,650 para AO, e 0,300 para Hxd, enquanto os valores em Gluc eram $\approx 0,200$ OD/mL. Isto também explica as curvas obtidas dos poços com AO do primeiro ensaio de Bioscreen, confirmando as suspeitas de que fosse devido à acção do surfactante.

Estes ensaios não permitem dar mais respostas às dúvidas existentes, relativamente ao Tween 80 ou Peptona como fontes de C, pelo que se justificou a realização do segundo Bioscreen.

3.3 *Análise aos Produtos da Refinaria – GC-MS*

Os compostos refinados do petróleo são muito voláteis por terem na sua composição uma grande quantidade de substâncias orgânicas leves. Como tal, também as fracções que foram gentilmente cedidas pelos laboratórios da CLC têm essa propriedade. Decidiu-se então realizar a evaporação a 30°C de todos os compostos vindos da refinaria, temperatura a que são inoculadas as leveduras para crescimento, de modo a se obterem fracções “mais ricas” em componentes pouco voláteis. O objectivo deste procedimento foi ter uma maior confiança nos compostos que fossem

escolhidos para os ensaios de crescimento não se evaporavam antes de as leveduras os puderem usar como fonte de C.

Querendo seleccionar, de entre os compostos cedidos: Gasóleo ASTM (DF 20902), Gasóleo PT (T1531, Português), Gasolina sem Chumbo 95 (T1513), Isoctano, Nafta (IIS #0931) e Jet A1 (T1544); quais seriam passíveis de cumprir o objectivo descrito, optou-se por efectuar uma análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS) às fracções evaporadas e não evaporadas.

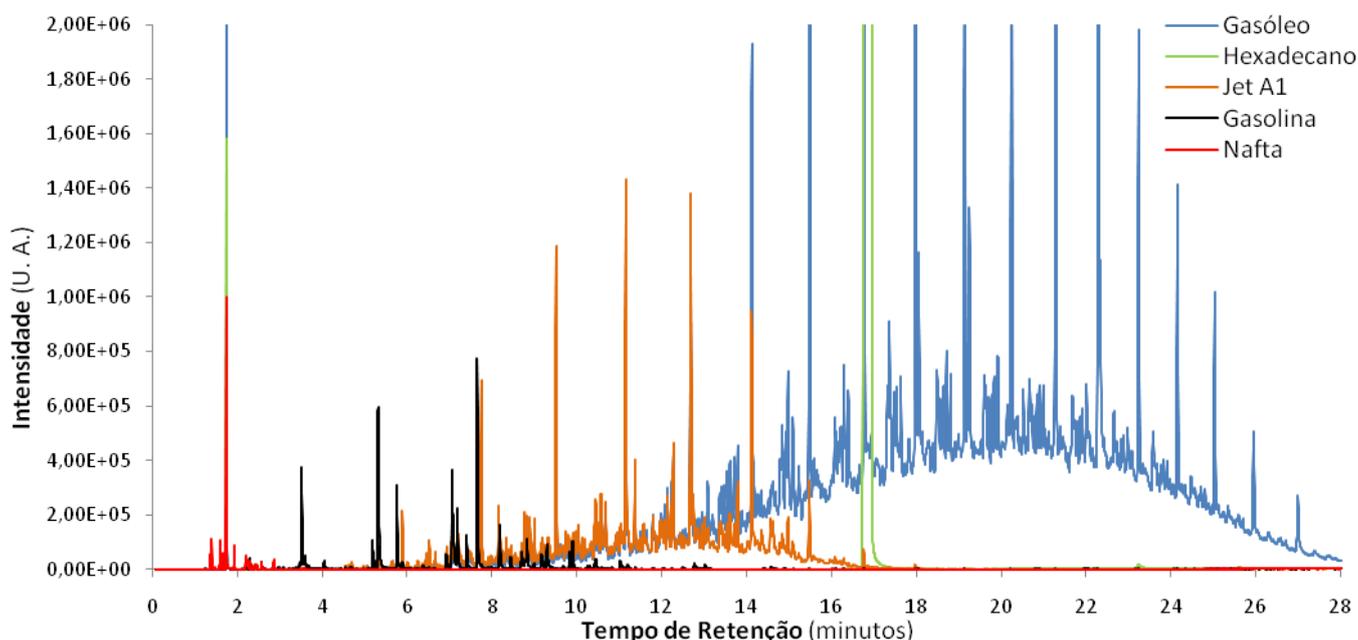


Figura 5 – Cromatogramas dos diferentes compostos (não evaporados) usados na análise de GC-MS, em que se observam por comparação, a ordem de tamanhos dos compostos de carbono de que as misturas são constituídas: Nafta – leves, Gasolina – leves, Jet A1 – médios, Gasóleo – pesados. O hexadecano só apresenta um pico (como esperado) e serve de padrão na imagem, bem como o hexano (primeiro pico) que é contaminante devido à limpeza do aparelho.

A Cromatografia Gasosa é um método muito preciso e reprodutível que separa os componentes de uma mistura pelos seus pontos de ebulição, permitindo que surja um cromatograma característico de cada solução, em que cada pico corresponde a um composto químico, sendo também possível a sua quantificação pela área do pico. A Espectrometria de Massa é uma técnica que separa, através da massa, os fragmentos iónicos gerados da decomposição de moléculas, fornecendo assim um espectro característico de cada composto que permite a sua identificação. Percebe-se, assim, que o acoplamento destas duas técnicas gere um método analítico de quantificação e identificação de componentes de misturas muito poderoso e útil para ser usado. As especificidades da técnica e do procedimento usado encontram-se em anexo.

Os compostos foram então deixados a evaporar durante 1 semana em banho-maria e o Hexadecano foi usado como controlo do ensaio. Ao segundo dia já tinha evaporado (em volume) 33% da Gasolina, 40% da Nafta, 5% do Isoctano e 2% do Hexadecano. Como os volumes dos Gasóleos e do Jet A1 se mantiveram constantes, estes podem ser usados, mas o GC-MS serviu para se ter uma boa ideia da sua composição química. Para além dessa caracterização, também foi possível, nos compostos que evaporaram, a avaliação de sua plausibilidade de utilização nos ensaios seguintes.

Os cromatogramas dos compostos antes e após evaporação encontram-se em anexo, é apresentado na Figura 5 um cromatograma com várias destas misturas para poderem ser comparadas em conjunto, e no Quadro 1 os componentes maioritários de cada composto. O primeiro pico grande de todos os cromatogramas é o do hexano (tempo de retenção de 1,743 min), mas é um contaminante, porque resulta como resíduo da limpeza do sistema com este composto.

Observa-se no gráfico da Figura 5 que são revelados muitos picos, principalmente nos cromatogramas do Jet A1 e dos Gasóleos, dos quais apenas foram identificados os principais, correspondentes aos componentes em maior percentagem nas misturas. Vê-se também, por comparação do pico a verde, que o Hexadecano é vestigial no Jet A1, e que é um dos componentes maioritários no Gasóleo.

Após identificação dos picos mais representativos de cada composto (Quadro 1), é evidente que a Nafta é essencialmente constituída por alcanos leves lineares e ramificados (entre C5 e C7), a Gasolina é uma mistura diversos diversos alquilbenzenos (aromáticos entre C7 e C9), o Jet A1 é composto por alcanos médios (entre C10 e C15) e os Gasóleos são as misturas com mais picos, sendo os principais, alcanos pesados entre C10 e C22. O Hexadecano e Isoctano só apresentam um pico no cromatograma (descontando o hexano), por isso os seus dados são apresentados em anexo.

Globalmente, pode afirmar-se que a Nafta não é adequada ao estudo proposto porque evapora rapidamente, além de que só apresenta alcanos até C7. A Gasolina também evaporou bastante, mas depois deste procedimento apresenta um volume reduzido de baixa volatilidade, mais concentrado em compostos aromáticos pesados e que seria interessante testar por quase não conter alcanos lineares ou ramificados. O Isoctano (C8) evaporou pouco e será usado como alcano ramificado de comparação com os componentes da Gasolina, em termos de número de Carbonos por molécula. O Jet A1 que também será testado por ter evaporado pouco, pela sua constituição, sendo susceptível de comparação com o Dodecano (C12).

O Gasóleo é então, dos destilados de petróleo analisados, o mais interessante para o trabalho em questão devido à sua complexidade de componentes, por ser constituído essencialmente de alcanos pesados na forma de uma mistura líquida, e porque o Hexadecano (alcano de referência que já tem vindo a ser referido) pode então ser um excelente termos de comparação. Porque se têm dois tipos de Gasóleo, e um deles se revelar mais rico em alcanos mais pesados (o PT, como se pode ver em anexo) foi esse o escolhido para prosseguir com os crescimentos.

Quadro 1 – Picos identificados nos cromatogramas das substâncias analisadas por CG-MS. As misturas apresentadas são compostas maioritariamente por: Nafta – alcanos leves, Gasolina – alquil benzenos, Jet A1 – alcanos médios, Gasóleos – alcanos pesados. O hexano (vermelho) é contaminação da limpeza do sistema. O Hexadecano (azul) é vestigial no Jet A1 e maioritário nos Gasóleos. O octadecanoato de metilo (verde) é mais encontrado no Gasóleo PT. O número (Nº) foi atribuído por ordem de eluição crescente dos picos mais relevantes em tamanho.

Nº	Nafta	Gasolina	Jet A1	Gasóleos
1	2-Metil Butano	Hexano	Hexano	Hexano
2	Pentano	Metil Benzeno	Nonano	Decano
3	2-Metil Pentano	Octano	TriMetil Benzeno	Undecano
4	3-Metil Pentano	2-Metil Heptano	Decano	Dodecano
5	Hexano	Etil Benzeno	4-Metil Decano	1,2,3,4-TetraHidro-5-Metil Naftaleno
6	Metil CicloPentano	DiMetil Benzeno	Undecano	Tridecano
7	CicloHexano	DiMetil Benzeno	Dodecano	2-6-DiMetil Undecano
8	Benzeno	Propil Benzeno	2,6-DiMetil Undecano	1,2,3,4-TetraHidro-2,7-DiMetil Naftaleno
9	3-Metil Hexano	1-Etil-3-Metil Benzeno	2,6,7-TriMetil Decano	2,6,10-TriMetil Dodecano
10	<i>trans</i> -1,3-DiMetil CicloPentano	TriMetil Benzeno	Tridecano	Tetradecano
11	<i>cis</i> -1,3-DiMetil CicloPentano	1-Etil-2-Metil Benzeno	2,6,10-TriMetil Dodecano	Pentadecano
12	1,2-DiMetil Pentano	TriMetil Benzeno	Tetradecano	Hexadecano
13	Heptano	TriMetil Benzeno	Pentadecano	2,6,10-TriMetil Pentadecano
14	Metil-CicloHexano	1-Metil-3-Propil Benzeno	Hexadecano	Heptadecano
15	Etil-CicloPentano	4-Etil-1,2-Dimetil Benzeno	Heptadecano	2,6,10,14-TetraMetil Pentadecano
16		4-Etil-1,2-Dimetil Benzeno		Octadecano
17		TetraMetil Benzeno		2,6,10,14-TetraMetil Hexadecano
18				Nonadecano
19				Eicosano
20				Heneicosano
20*				Octadecanoato de Metilo
21				Docosano
22				Tricosano
23				Tetracosano
24				Pentacosano
25				Hexacosano

3.4 Segundo Bioscreen

De forma a responder a algumas questões levantadas com os resultados do primeiro Bioscreen (BS1), procedeu-se à realização de um segundo. O meio base para todas as condições de crescimento é constituído por solução de Oligoelementos (OE), Glutamina (Gln) como fonte de N a 1 % (m/v), tampão de Fosfatos a 50 mM e pH 7,0, com inóculos de 0,003 OD/mL no poço, sendo as fontes de C o principal componente variado nestes ensaios. Realizaram-se alguns controlos relativos a condições testadas no Bioscreen anterior, como brancos dos meios com Glucose, Hexadecano, Ácido Oleico (AO) com Tween 80 (T800, como surfactante), AO apenas. Fizeram-se outros brancos, dos Compostos da Refinaria e dos Álcoois, para concluir acerca da sua contribuição na OD/mL final.

Da análise da Figura 6a, conclui-se facilmente que a curva correspondente ao AO com T800 é muito semelhante às obtidas no BS 1 com inóculo. O pressuposto levantado aquando da análise dos mesmos é então confirmado: de facto o T800 tem uma acção de surfactante na presença de substâncias hidrófobas, o que conduz à formação de micelas que perturbam a OD. Os controlos individuais de cada uma das substâncias revelam que não existe contribuição para a medição da OD/mL, o que por sua vez consolida a afirmação anterior. Dos ensaios individuais de crescimento com AO e em T80 observa-se crescimento em ambas as estirpes, não aparentando ser muito diferente nos dois casos. Assim, além de se verificar o crescimento destas leveduras num composto hidrófobo (AO) como referido na bibliografia, conclui-se que de facto é possível obter essas curvas de crescimento num Bioscreen. Também se conclui que o surfactante T80 é usado como fonte de Carbono, mas tendo sido testado na concentração de 0,1 M é necessário realizar um novo ensaio para testar o crescimento na concentração de surfactante, a 0,03% (m/v).

Na Figura 6b, uma análise relativa das curvas de crescimento nas diferentes fontes de C permite concluir acerca da preferência das leveduras pelas mesmas. Observa-se então que, além de existir crescimento em Gluc, também ocorre em Gln, Pep, Hxd, e Dodecano (Dodec). Os ensaios com Gluc são semelhantes para ambas as estirpes, assim como os ensaios com Gln. Existe uma semelhança entre o crescimento em Hxd e o da Gln, principalmente na estirpe W29. Levanta-se assim a hipótese do Hxd não estar a ser usado como fonte de C na presença de Gln, a qual pode ser simultaneamente fonte de N e C. O crescimento em Dodec foi bastante divergente nas duas estirpes. Confirma-se aparentemente o crescimento em alcanos, contudo a estirpe RJ apresenta um maior tempo de adaptação ao meio com este alcão, relativamente à W29, sendo a OD final medida num mesmo intervalo de tempo superior para a última.

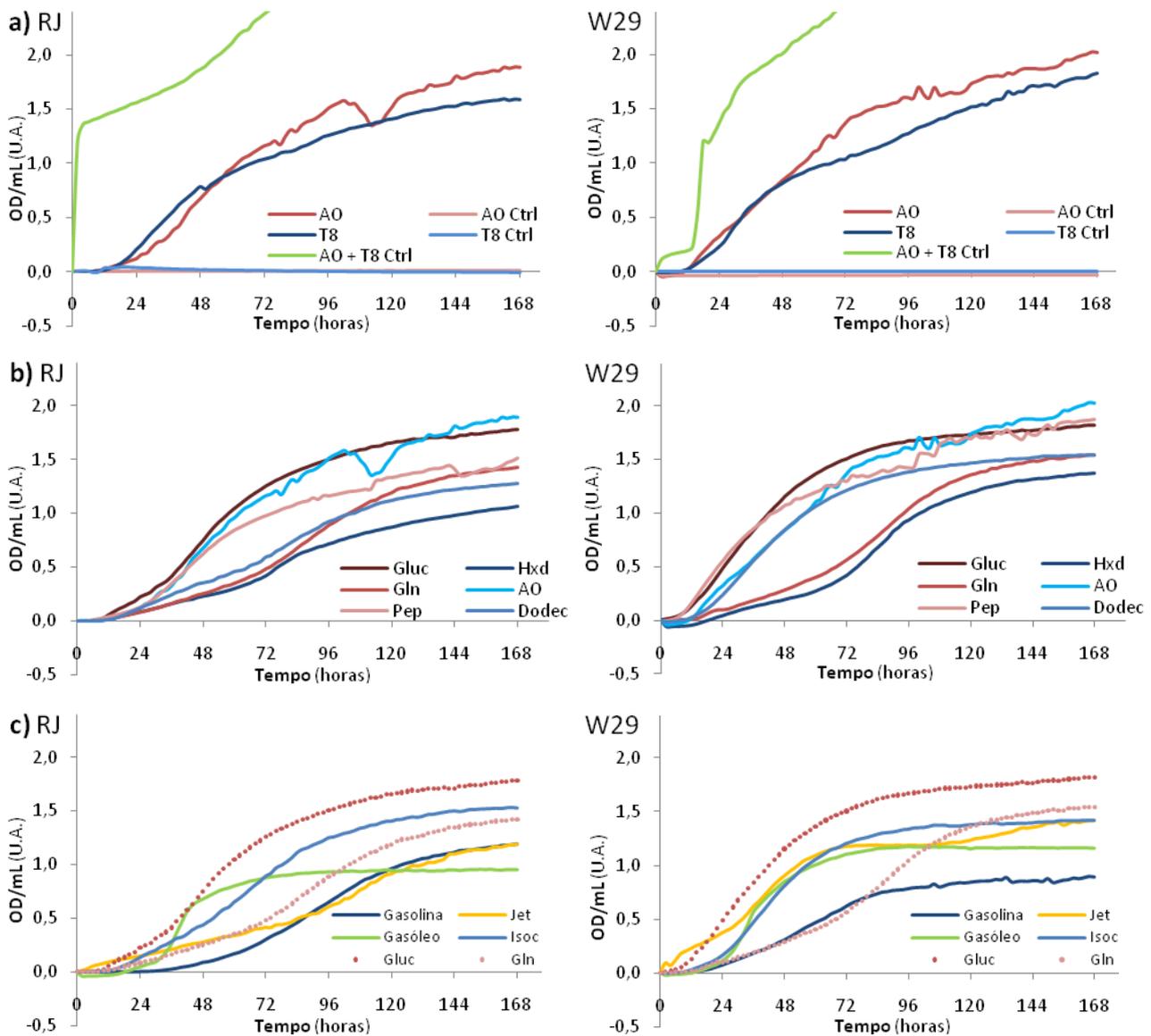


Figura 6 – Curvas de crescimento das duas estirpes no meio de OE com tampão fosfatos a 50 mM e pH 7, e Gln como fonte de N a 0,1% (m/v) com: **a)** ácido oleico (AO) e Tween 80 (T8) a 0,1 M (fontes de C), e respectivos controlos (ctrl); **b)** com glucose (Gluc), glutamina (Gln), dodecano (Dodec), peptona (Pep), ácido oleico (AO) e hexadecano (Hxd) como fontes de C; **c)** com Gasolina, Gasóleo, Jet A1 (Jet), Isoctano (Isoc) como fontes de C, e as curvas de Gluc e Gln como referências.

O crescimento em Compostos de Refinaria (3,33% final, v/v) mostra resultados aparentemente satisfatórios, se forem tidos como referência os crescimentos em Glucose e Glutamina. Observa-se, em 6c, um crescimento particularmente diferente, e similar, na presença de Gasóleo, nas duas estirpes, apesar da OD/mL final ser inferior na RJ. Verificou-se um crescimento, relativamente comparável entre as duas estirpes, para o Isoctano e também para a Gasolina, sendo que para o Jet A1 as curvas de crescimento resultantes são bastante distintas.

Testou-se ainda o crescimento nos álcoois lineares 1-Nonanol, 1-Decanol, 1-Undecanol e 1-Dodecanol como fontes de C, mas em nenhuma destas condições houve um resultado positivo. Como a concentração aplicada nestes casos foi de 0,1 M, coloca-se a hipótese de ser uma concentração letal, pois estes compostos podem levar à permeabilização de membranas celulares. Porque não são miscíveis com a água, poderão também impedir a oxigenação do meio. Estes resultados são apresentados em anexo.

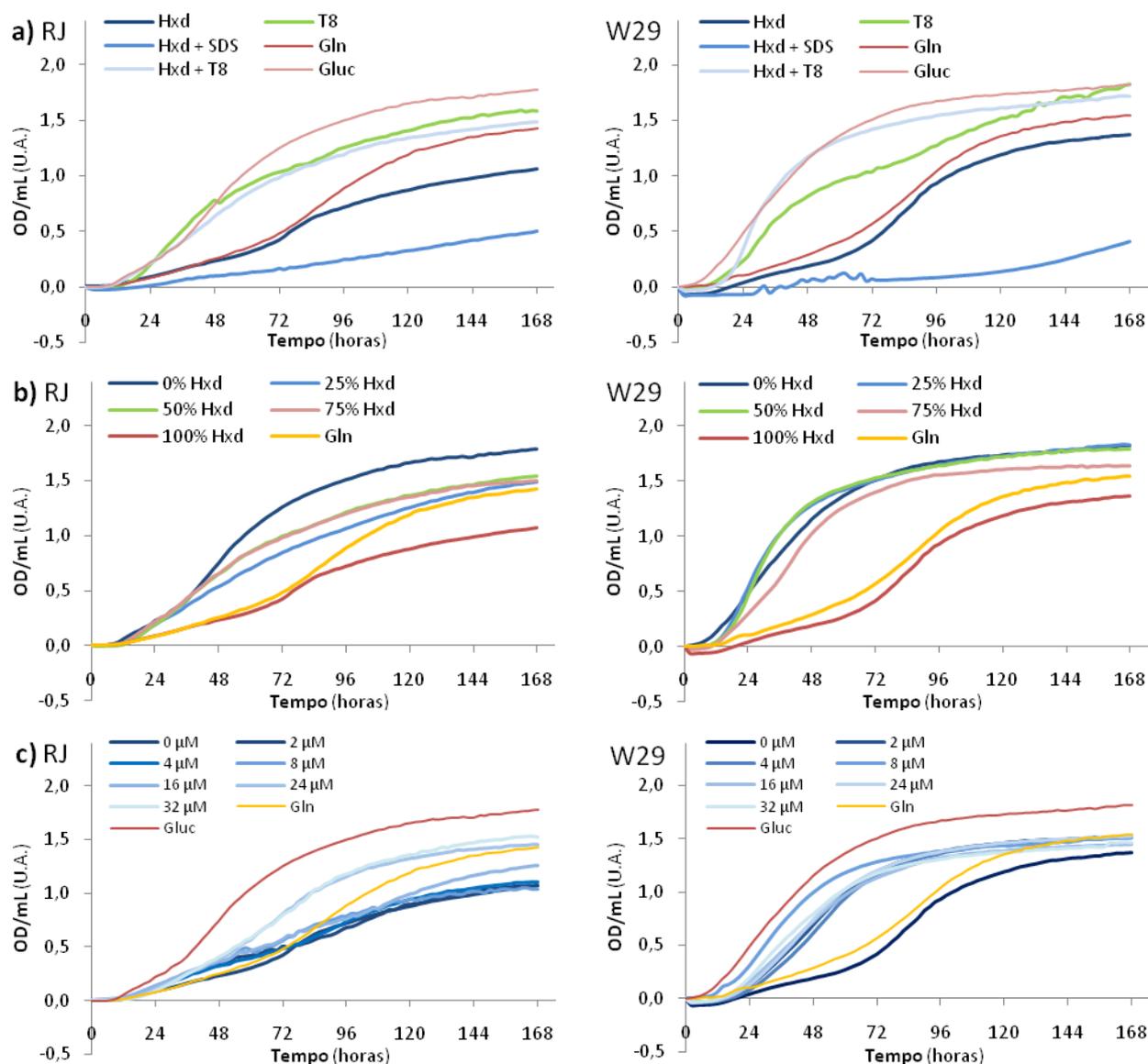


Figura 7 – Curvas de crescimento das duas estirpes no meio de Oligoelementos com tampão fosfatos pH 7 e glutamina como fonte de N: **a)** Crescimento em Hxd com e sem surfactantes (SDS e Tween 80 (T80)) e comparação com T80, Gluc e Gln; **b)** Crescimento em Hxd e Gluc a diferentes proporções (0% Hxd = 100% Gluc e 100% Hxd = 0% Gluc); **c)** Crescimento em Hxd com concentrações crescentes de tungsténio (0 μ M = sem tungsténio).

Atendendo aos resultados da Figura 7a para as duas estirpes, observam-se facilmente diferenças no crescimento entre as mesmas nas várias fontes de C. Para a estirpe RJ, o crescimento em Hxd com T80 é idêntico ao crescimento em T80, o que pode sugerir mais uma vez que o Hxd não é usado como fonte de C. Já na estirpe W29, o crescimento com Hxd e T80 é mais rápido que no meio de T80, pelo que não se exclui de todo a hipótese do Hxd ser usado pela levedura, podendo ter um papel no favorecimento do seu crescimento). No entanto, os dois resultados destas estirpes levam à conclusão de que a Gln é usada como fonte de C, assim como o Tween 80. Do uso de SDS como surfactante conclui-se que este é prescindível, uma vez que, além do crescimento na sua presença ter sido significativamente inferior ao meio de Hxd, as OD/mL registadas podem ser reflexo de qualquer outra ocorrência que não o crescimento celular. Não é possível retirar todas as dúvidas com os dados disponíveis à data; todavia sabe-se que o SDS é um detergente aniónico forte que leva à desintegração das membranas, lisando as células, e complicando as medidas de OD/mL.

Relativamente ao crescimento com Hxd, este é semelhante ao crescimento em Gln, especialmente para a estirpe W29. Para a RJ, inicialmente os crescimentos são comparáveis, tornando-se ligeiramente diferentes numa fase mais tardia. Estes dados levantaram sérias dúvidas quanto ao uso de Hxd como fonte de C por parte das duas estirpes, requerendo melhor averiguação.

Para averiguar a preferência da *Yarrowia lipolytica* por uma ou mais fontes de C, realizaram-se ensaios com concentrações variáveis de Gluc e Hxd. As observações efectuadas (7b) não diferem grandemente dos resultados expostos previamente (Figura 1b, no BS1), no que toca aos meios com apenas Gluc, Gln e Hxd, porém agora o meio não contém T80. Desta forma, observa-se para a estirpe RJ que as concentrações de 25, 50 e 75% revelam um comportamento intermédio entre o crescimento nas concentrações de 0% (só Gluc) e 100% (só Hxd). Mais uma vez os comportamentos entre as duas estirpes não são exactamente idênticos e, para a estirpe W29, com excepção de 100% Hxd cujo crescimento se assemelha ao da Gln, as restantes proporções têm crescimento idêntico ao de Gluc. Neste caso, parece efectivamente que o crescimento é estimulado pela presença de Hxd, ou que, caso este não afecte o crescimento, que as concentrações 0,075 M e 0,05 M de Gluc são as mais adequadas ao crescimento desta estirpe.

O crescimento, das leveduras em Hxd condicionado por diferentes concentrações de tungsténio, foi variável entre as duas estirpes, 7c. Na RJ as curvas de crescimento são aproximadamente homólogas nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 16 μM de tungsténio, o que sugere que apenas concentrações mais elevadas de tungsténio, como 24 e 32 μM , contribuem significativa e positivamente para o crescimento desta estirpe neste meio. Por outro lado, na W29 as concentrações

de tungsténio utilizadas não parecem influenciar de forma diferente o crescimento, sendo este superior para todas as concentrações comparativamente à ausência total deste metal (curva de 0 μM).

Apesar de terem sido resolvidas muitas dúvidas levantadas com o BS1, outras surgiram com os resultados deste segundo ensaio, sendo justificadamente necessário realizar um terceiro Bioscreen.

3.5 Terceiro Bioscreen

Na execução do BS3, resolveu-se testar as mesmas fontes de C, com a alteração da fonte de N orgânica (Glutamina) por uma inorgânica (Cloreto ou Sulfato de Amónio).

Tendo sido escolhidas duas fontes inorgânicas deste elemento essencial, pela observação da Figura 8a, pode-se constatar que o crescimento no meio de referência (Gluc como fonte de C) foi homólogo em ambas as fontes de N, nas estirpes RJ e W29. Este crescimento foi inferior ao meio com Gluc e Gln, mas superior ao meio em que a Gln servia simultaneamente como fonte dos dois elementos. Estas observações sugerem que o crescimento é efectivamente estimulado pela presença deste aminoácido no meio. Tal pode dever-se ao facto de, uma vez que possui C na sua constituição, este servir de fonte inicial enquanto são expressos os enzimas necessários para a aquisição de outras substâncias, como a Gluc ou o AO. Os gráficos apresentados em 8b vêm reforçar estas observações: o crescimento com Gluc e Gln é melhor que apenas em Gln, que por sua vez é superior ao crescimento em Hxd e Gln, sendo que não se verificou qualquer tipo de crescimento em meio líquido com Hxd na ausência de Gln, ou seja, com fontes inorgânicas de N. Esta observação pode ainda implicar o já anteriormente referido na análise do BS2 (Figura 7b): que o Hxd não é utilizado pela levedura, mas influencia o seu crescimento noutras fontes de Carbono.

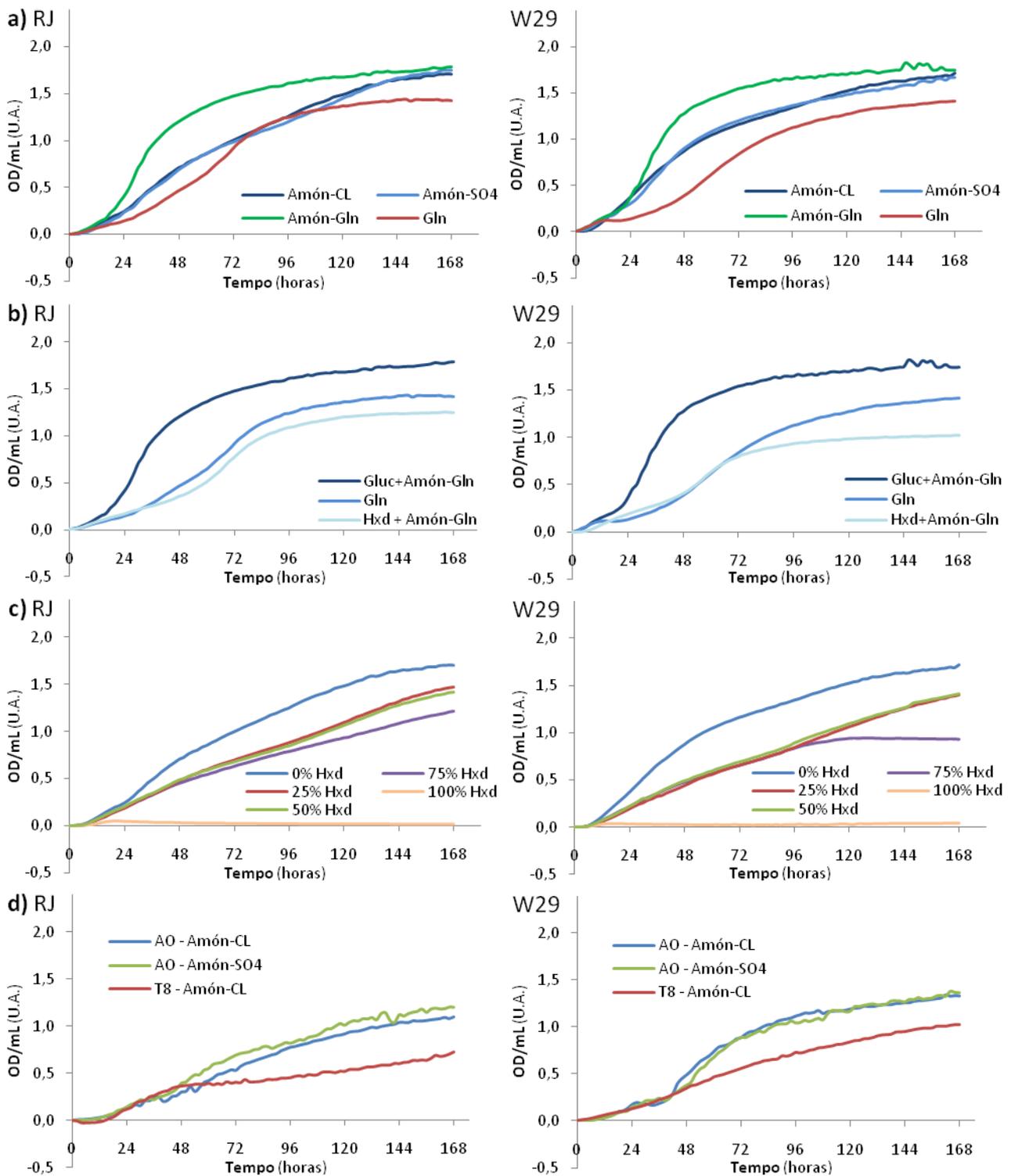


Figura 8 – Curvas de crescimento das duas estirpes no meio de Oligoelementos com tampão fosfatos pH 7: **a)** crescimento em Gluc com diferentes fontes de N (N), Cloreto de Amónio (Amón-CL), Sulfato de Amónio (Amón-SO4) e Glutamina (Amón-Gln), tendo como meio de comparação o crescimento num meio com Gln como fonte de C e N; **b)** crescimentos em Gln, com diferentes fontes de carbono (Hxd, Gluc e Gln); **c)** crescimento em diferentes proporções de Hxd e Gluc com Cloreto de Amónio como fonte de N; **d)** crescimentos em Ácido Oleico (AO) em Amón-CL e Amón-SO4 e crescimento em Tween 80 (T80) em Amón-CL.

O crescimento com diferentes proporções de Hxd e Gluc, em Cloreto de Amónio (Figura 8c), mostra-se de acordo com as ideias agora ilustradas: as curvas com 0% Hxd, ou seja, apenas Gluc, revelam um bom crescimento para ambas as estirpes, enquanto no meio em 100% de Hxd não se observa crescimento. As concentrações intermédias de Hxd e Gluc mostram que as leveduras foram capazes de crescer enquanto existia Gluc no meio, embora de forma inferior de quando esta se encontrava a 100%. Conclui-se, assim, que o Hxd afecta definitivamente o crescimento em Gluc. Também neste ensaio de BS foi possível observar crescimentos das leveduras em Ácido Oleico e Tween 80 (estando este na concentração de surfactante – 0,03% m/v), encontrando-se os resultados na Figura 8d. A comparação das curvas obtidas em AO nas duas fontes inorgânicas de N vem apoiar o que se concluiu dos meios de Gluc: ambos são passíveis de substituir a Gln de forma igualmente eficaz. Estes crescimentos em AO e T80 (com Cloreto de Amónio) vêm suportar as conclusões do BS2, onde foi referido que estas estirpes de *Y. lipolytica* usam tais compostos como fontes de C.

Em relação às restantes fontes de Carbono – Dodec, Compostos da Refinaria, 1-Undecanol, 1-Dodecanol e Hxd com concentrações variáveis de tungsténio – não se observou crescimento (resultados em anexo). Estes resultados vão inicialmente contra o esperado, mas podem ser justificados por uma possível adaptação mais prolongada aos meios de fontes inorgânicas de N, e de os próprios meios não serem uniformes, mas sim bifásicos. Isto leva a que o acesso aos substratos seja difícil ou mesmo impossível, e/ou a uma deficiente troca gasosa de O₂.

Sendo fundamental otimizar os crescimentos em fontes hidrófobas de alcanos para a concretização dos objectivos propostos, decidiu-se efectuar crescimentos em meios sólidos, tendo por base o meio de OE desenvolvido, tampão de Fosfatos e Cloreto de Amónio.

3.6 Crescimentos em Placas – Meios Sólidos

Após as dificuldades encontradas no BS3 com os crescimentos em meios líquidos contendo alcanos que, como foi referido, é possível serem devidas aos meios apresentarem duas fases, decidiu-se então efectuar crescimentos em meios sólidos. O procedimento seguido está descrito em [Yamagami 2007, Hirakawa 2009 e Mauersberger 2001], e contempla que sejam humedecidos papéis de filtro com os diferentes substratos hidrófobos, sendo o meio plaqueado por cima (com agar) quente, mantendo as concentrações como descrito em anexo. Após solidificação do meio, as fontes de C ficam espalhadas em pequenas gotículas no seu interior, mas também à superfície, onde

são inoculadas as leveduras. Com isto esperava-se que as células tivessem maior facilidade de aquisição e utilização das fontes de C alternativas, sem que tal as privasse de oxigénio ou qualquer outro nutriente. Inocularam-se ambas as estirpes na mesma placa com diferentes diluições das suspensões dos inóculos, como é mostrado na Figura 9a, com o propósito de se obterem colónias isoladas.

Através de uma análise das placas elaboradas, das quais algumas são apresentadas na Figura 9, e comparativamente ao controlo (apresentado em 9c), observou-se que nos meios contendo Hexadecano (9e), Isoctano (não apresentada), Jet A1 (9i), 1-Dodecanol (9h) e 1-undecanol (semelhante a 9h), como possíveis fontes de C não, não tinha crescido qualquer colónia até às 2 semanas de incubação.

Pelo contrário, em Glucose (que é também um controlo positivo) verificou-se um bom crescimento 9b como era esperado, sendo bem visíveis colónias muito bem isoladas nas zonas de menor diluição. Na placa de Hexadecano com Glucose a 0,01 M cresceram muitas colónias, embora não sejam muito grandes, daí serem pouco visíveis na imagem 9f (apenas uma se compara em tamanho às da 9b). Estes resultados dos meios com Hexadecano e Glucose levam a pensar que as células não se conseguiram adaptar e utilizar o Hexadecano, pondo dúvidas uma vez mais, quanto ao seu uso como fonte de C. No entanto a colónia maior do meio de 9f dá esperanças que se consiga obter crescimento numa nova placa de Hxd, caso o problema seja uma questão de verdadeira adaptação à fonte de C principal (mas mais difícil) do meio.

Em Ácido Oleico observo-se um crescimento muito rápido em torno de algumas gotas que se formaram em certas zonas da placa (substância imiscível no meio). Não sendo o resultado exactamente esperado, não deixa ainda assim de ser considerado positivo.

Dois resultados duvidosos surgem das placas com Dodecano e Gasolina (9g e 9j). Nestes meios obtiveram-se algumas colónias, que não são muito visíveis, mas aparentam uma morfologia diferente da do controlo. Assim, não se rejeitando a hipótese de crescimento, isto só seja confirmado por repicagem em novas placas.

Significativamente, o tempo de adaptação nestes meios sólidos também desempenha um papel importante. Um resultado positivo para a W29 surgiu na placa com Gasóleo (9k e 9l) onde, durante alguns dias, nada se observava. Felizmente, ao final de 1 semana de incubação já tinham crescido algumas pequenas colónias no bordo do meio sólido (9l), dando esperanças de se obterem bons crescimentos ao serem repicadas para uma nova placa com este meio.

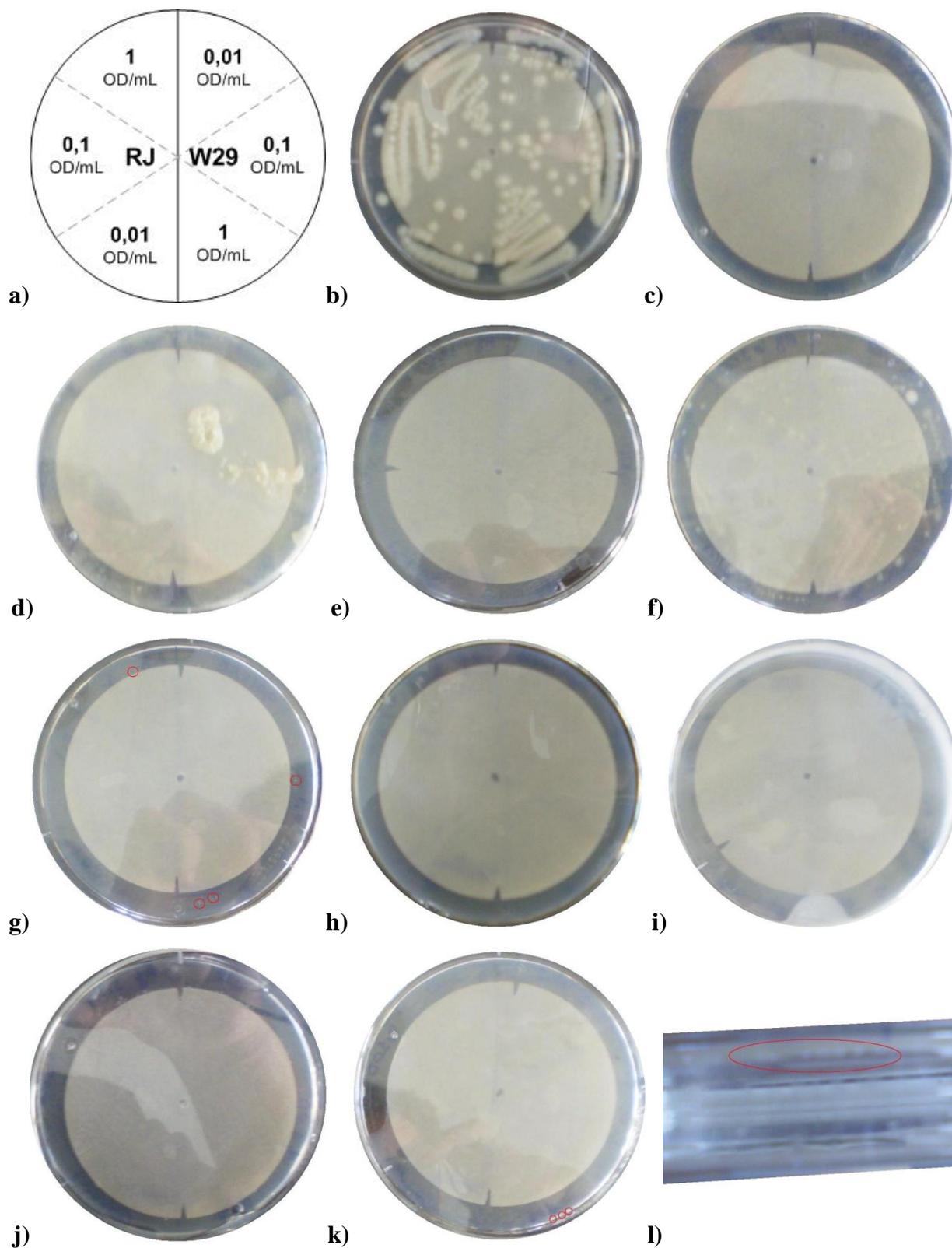


Figura 9 – Imagens das placas de meio sólido, inoculadas como o esquema de **a)**, com meio de Oligoelementos, Cloreto de Amónio como fonte de N e Diferentes fontes de C: **b)** Glucose, **c)** Nenhuma (controlo), **d)** Ácido Oleico, **e)** Hexadecano, **f)** Hexadecano com Glucose a 0,01 M (10% da conc. de **b)**, **g)** Dodecano, **h)** 1-Dodecanol, **i)** Jet A1, **j)** Gasolina, **k)** Gasóleo e **l)** Gasóleo (ampliação horizontal na zona das colónias). Algumas colónias são destacadas com círculos vermelhos que apenas servem para esse efeito. As colónias têm 170 horas (\approx 1 semana) de crescimento a 30°C.

Este método mostrou-se uma alternativa possível aos meios líquidos de forma a ser produzida biomassa suficiente para realizar as electroforeses bidimensionais (caso haja crescimento), e também otimizar as condições de crescimento, em meio líquido, de células assim adaptadas. Semelhantemente, o outro objectivo de selecção de colónias aptas a crescer em nas fracções, como a do Gasóleo serão concretizadas a partir de colónias adaptadas em meio sólido. Esta evolução experimental facultará ensaios que permitirão tirar conclusões definitivas sobre algumas das hipóteses e dúvidas geradas na presente fase do nosso projecto.

4. Conclusão e Perspectivas Futuras

Apesar de ser indispensável realizar ensaios de crescimento por um método alternativo ao BS, tal não foi possível nesta fase, mas podem-se destacar alguns resultados que são substanciais para dar resolução aos problemas/objectivos propostos.

Como primeira conclusão, é possível discriminar, só com base nos crescimentos efectuados, o comportamento das duas estirpes. Contrariamente à RJ, a W29 parece sistematicamente ter um crescimento mais rápido e atingir uma OD/mL máxima superior. Ainda, a forma genérica das curvas é substancialmente diferente nas duas estirpes.

Estas observações foram feitas em meio quimicamente definido, elaborado e melhorado por nós, que mostrou cumprir os requisitos que são proporcionados pelo meio de Yeast Extract.

A evolução na fonte de N também se revelou importante, iniciando-se os estudos com Peptona, dando-se uma transição pela Glutamina, a qual inicialmente se pensou ser indicada para o caso, uma vez que na literatura se encontrou que também este aminoácido favorecia a forma leveduriforme. Contudo, as leveduras estão aptas a crescer num meio apenas com Glutamina, que funciona não só fonte de N mas também de C, influenciando positivamente todos os crescimento noutras fontes de C, como foi observado em diversos meios. Este facto, numa fase inicial da caracterização/definição de uma gama de compostos hidrófobos passíveis de serem usados pela *Yarrowia lipolytica*, levou-nos a falsos positivos que uma análise posterior (com outras fontes de N) confirmou. No entanto, ficou estabelecido que as duas fontes inorgânicas deste elemento essencial, o Cloreto e Sulfato de Amónio, apresentam igual potencial na substituição da Glutamina (e da Peptona).

Foi possível comprovar o crescimento da levedura em substâncias que não Gluc, Pep e Gln, como o AO e T80. Esperava-se que o Hxd fosse utilizado como fonte de C, uma vez que é abrangido pela categoria dos alcanos pesados, e bastante referenciado na literatura como tal, para esta espécie. Porém, a única conclusão passível de não ser enganosa em relação a este composto é que parece influenciar o crescimento noutras fontes de C em meio líquido. No entanto, a estratégia de utilização de riscados em meio sólido (onde previamente se difundiu hexadecano num papel de filtro estéril) permitiu a obtenção de colónias individualizadas e adaptadas a esta fonte de C, como é sugerido na literatura. Aliás, a maioria dos meios cujas fontes de C serem substâncias hidrófobas apresentando características bifásicas levou-nos a crer que muitos dos resultados negativos que se obtiveram tenham sido resultado consertado de duas consequências: a inacessibilidade ao Carbono e a deficiente oxigenação do meio. Mais uma vez, e por estas razões independentes da acção de qualquer surfactante, surgiu a necessidade de encontrar um método alternativo passível de proporcionar melhores resultados.

Não menos importante, a presença do metal pesado Tungsténio parece influenciar o crescimento de forma positiva, o que abre novas perspectivas para a realização dos proteomas e caracterização de enzimas relacionados com a presença deste. A presença de Tungstato afecta preferencialmente a W29, parecendo que, a partir de um limiar de concentração, transforma o comportamento em Hexadecano com Glutamina semelhante ao crescimento em Glucose (também com Glutamina).

A próxima futura realização dos proteomas das duas estirpes em função de todos os parâmetros estratégicos detectados na análise do panorama dos crescimentos, uns controlados e otimizados e outros ainda inconclusivos, permitir-nos-á determinar a origem metabólica de alguns destes comportamentos.

Esperamos que a apresentação pública destes resultados, em ***Poster***, já possa incluir a análise destes proteomas, e o resultado do crescimento de culturas já adaptadas a Hexadecano e Gasóleo em meio quimicamente definido.

5. Bibliografia

- Aguedo, M. ; et al (2005).** *Decalactone production by Yarrowia lipolytica under increased O₂ transfer rates.* Biotechnology Letters, 27: 1617-1621
- Alexandre, B. ; et al (2004).** *Estudos em Respiração Celular: Proteómica em Substratos Alternativos.* Tese de Licenciatura.
- Amaral, P. ; et al (2003).** *Emprego de Carregador de Oxigênio na produção de Lipase por Yarrowia lipolytica.* Tese de Pós-Graduação.
- Amaral, P. ; et al (2006).** *Cell surface characterization of Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682.* Yeast, 23: 867-877
- Amaral, P. ; et al (2006).** *Production and characterization of a bioemulsifier from Yarrowia lipolytica.* Process Biochemistry, 41: 1894–1898
- Amaral, P. ; et al .** *Morphological Analysis of Yarrowia lipolytica under Stress Conditions through Image Processing.* Poster.
- Athenstaedt, K. ; et al (2006).** *Lipid particle composition of the yeast Yarrowia lipolytica depends on the carbon source.* Proteomics, 6: 1450-1459
- Barth, G. ; et al (1997).** *Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica.* FEMS Microbiology Reviews, 19: 219-237
- Beckerich, J. ; et al (1998).** *Yarrowia lipolytica: a model organism for protein secretion studies.* International Microbiology, 1: 123-130
- Braun, R. ; et al (2007).** *Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins.* Anal Bioanal Chem, 389: 1033-1045
- Brondino, C. ; et al (2006).** *Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family.* Current Opinion in Chemical Biology, 10: 109-114
- Carreira, A. ; et al (2001).** *Brown Pigments Produced by Yarrowia lipolytica Result from Extracellular Accumulation of Homogentisic Acid.* Applied and Environmental Microbiology, 67: 3463-3468
- Cholet, O. ; et al (2008).** *Transcriptional Analysis of L-Methionine Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast Yarrowia lipolytica in Relation to Volatile Sulfur Compound Biosynthesis.* Applied and Environmental Microbiology, 74: 3356-3367

- Endoh-Yamagami, S.; et al (2007).** *Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Heterocomplex of Yas1 and Yas2p Regulates Cytochrome P450 Expression in Response to Alkanes in the Yeast *Yarrowia lipolytica*.* Eukaryotic Cell, 6: 734-743
- Esteves, C.(1999).** *Purificação e Caracterização de uma nova Proteína Isolada de uma Bactéria Reditora de Sulfato: *Desulfovibrio Salexigens*.* Tese de Licenciatura.
- Fickers, P. ; et al (2005).** *Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*.* Journal of Biotechnology, 115: 379–386
- Fickers, P.; et al (2004).** *Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*.* Journal of Applied Microbiology, 96: 742-749
- Finogenova, T. ; et al (2008).** *Mutant *Yarrowia lipolytica* Strains Producing Citric Acid from Glucose.* Applied Biochemistry and Microbiology, 44: 197-202
- Finogenova, T.; et al (2002).** *Biosynthesis of citric and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under continuous cultivation.* Appl Microbiol Biotechnol, 59: 493-500
- Förster, A. ; et al (2007).** *Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*.* Appl Microbiol Biotechnol, 75: 1409-1417
- García, E. ; et al (2008).** *Production of 3-hydroxy- γ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*.* J. Mol. Catal. B: Enzym.
- Gole, A. ; et al (2002).** *Patterned assembly of *Yarrowia lipolytica* yeast cells onto thermally evaporated octadecylamine films.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 25: 363–368
- Gomes, N. ; et al (2008).** *Development of bioprocesses based in biphasic media involving the yeast *Yarrowia lipolytica*.* CHEMPOR 2008: 1971-1976
- Gonçalves. ; et al.** *Olive mill wastewater valorization: Use by non-conventional yeasts.* Unpublished Manuscript.
- Görg, A. ; et al (2000).** *The Current State of Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients.* Electrophoresis, 21: 1037-1053
- Guerrero-Castillo, S. ; et al (2009).** *In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway.* Biochimica et Biophysica Acta, 1787: 75-85

- Hagler, A. ; et al (1981).** *Yeasts from Marine and Estuarine Waters with Different Levels of Pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil.* Applied and Environmental Microbiology, 41: 173-178
- Hartinger, J. ; et al (1996).** *16-BAC/SDS–PAGE: A Two-Dimensional Gel Electrophoresis System Suitable for the Separation of Integral Membrane Proteins.* Analytical Biochemistry, 240: 126
- Helling, S. ; et al (2006).** *2-D differential membrane proteome analysis of scarce protein samples.* Proteomics, 6: 4506-4513
- Herrero, A. ; et al (1999).** *Candida albicans and Yarrowia lipolytica as alternative models for analysing budding patterns and germ tube formation in dimorphic fungi.* Microbiology, 145.
- Hirakawa, K. ; et al (2009).** *Yas3p, an Opi1-Family Transcription Factor Regulates Cytochrome P450 Expression in Response to n-Alkanes in Yarrowia lipolytica.* JBC, Accepted Manuscript.
- Imandi, S. ; et al (2008).** *Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste.* Bioresource Technology, 99: 4445-4450
- Kautola, H. ; et al (1991).** *Production of citric acid with immobilized Yarrowia lipolytica.* Appl Microbiol Biotechnol, 35: 447-449
- Klein, C. ; et al (2005).** *The membrane proteome of Halobacterium salinarum.* Proteomics, 5: 180
- Kobayashi, S.; et al (2008).** *Disruption of the SCS2 Ortholog in the Alkane-Assimilating Yeast Yarrowia lipolytica Impairs its Growth on n-Decane but does not Impair with Inositol Prototrophy.* Biosci. Biotechnol. Biochemistry, 72: 2219-2223
- Kurischko, C. ; et al (1986).** *Parasexual process in the yeast Yarrowia lipolytica.* J. Basic Microbiol., 26: 33-41
- Kusch, H. ; et al (2007).** *Proteomic analysis of the oxidative stress response in Candida albicans.* Proteomics, 7: 686-697
- Lee, K. ; et al (2009).** *Effect of separation dimensions on resolution and throughput using very narrow-range IEF for 2-DE after solution phase isoelectric fractionation of a complex proteome.* J. Sep. Sci., 32.
- Li, X. ; et al (2008).** *Proteomic profiling of proteins associated with methamphetamine-induced neurotoxicity in different regions of rat brain.* Neurochemistry International, 52: 256-264

- Lopes, M. ; et al (2008).** *Hyperbaric bioreactors use with *Yarrowia lipolytica* cultures: cellular adaptation to hyperbaric conditions.* CHEMPOR 2008: 1965-1970
- Lopes, M. ; et al (2008).** *Yarrowia lipolytica lipase production enhanced by increased air pressure.* Letters in Applied Microbiology, 46: 255-260
- L'vov, N. ; et al (2002).** *Tungsten-containing Enzymes.* Biochemistry, 67: 234-239
- Madzak, C. ; et al (2004).** *Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review.* Journal of Biotechnology, 109: 63–81
- Matsuoka, M. ; et al (1980).** *Role and Control of Isocitrate Lyase in *Candida lipolytica*.* Journal of Bacteriology, 144: 692-697
- Mlicková, K. ; et al (2004).** *Lipid Accumulation, Lipid Body Formation, and Acyl Coenzyme A Oxidases of the Yeast *Yarrowia lipolytica*.* Applied and Environmental Microbiology, 70: 3918
- Moura, J. ; et al (2004).** *Mo and W bis-MGD enzymes: nitrate reductases and formate dehydrogenases.* J Biol Inorg Chem, 9: 791-799
- Navarre, C. ; et al (2002).** *Subproteomics: Identification of plasma membrane proteins from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.* Proteomics, 2: 1706-1714
- Novotny, M. ; et al (1982).** *Capillary Gas Chromatography/Mass Spectrometry of Aza-Arenes Isolated from Crude Coal Tar.* Chromatographia, 15
- Papanikolaou, S. ; et al (2008).** *Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil.* Biomass and Bioenergy, 32: 60-71
- Papanikolaou, S. ; et al (2008).** *Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media.* Bioresource Technology, 99: 2419-2428
- Penque, D. ; et al (2009).** *Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery.* Proteomics Clin. Appl., 3: 155-172
- Pignède, G. ; et al (2000).** *Characterization of an Extracellular Lipase Encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*.* Journal of Bacteriology, 182: 2802-2810
- Poritz, M. ; et al (1988).** *Small ribonucleoproteins in *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica* homologous to signal recognition particle.* PNAS USA - Cell Biology, 85: 4315-4319

- Rabiloud, T. ; et al (1996).** *Solubilization of proteins for electrophoretic analyses.* Electrophoresis, 17: 813-829
- Richard, M. ; et al (2001).** *Tagging Morphogenetic Genes by Insertional Mutagenesis in the Yeast *Yarrowia lipolytica*.* Journal of Bacteriology, 183: 3098-3107
- Ruiz-Herrera, J. ; et al (2002).** *Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*.* Arch Microbiol, 178: 477-483
- Rymowicz, W. ; et al (1993).** *Studies on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and continuous air-lift bioreactors.* Appl Microbiol Biotechnol, 39.
- Schmitz, C. ; et al (2000).** *Competition between *n*-alkane-assimilating yeasts and bacteria during colonization of sandy soil microcosms.* Appl Microbiol Biotechnol, 54: 126-132
- Scioli, C. ; et al (1997).** *The Use of *Yarrowia lipolytica* to Reduce Pollution in Olive Mill Wastewaters.* Pergamon, Wat. Res., 31: 2520-2524
- Speers, A. ; et al (2007).** *Proteomics of Integral Membrane Proteins Theory and Application.* Chem. Rev., 107: 3687-3714
- Spencer, J. ; et al (2002).** *Non-conventional yeasts.* Appl Microbiol Biotechnol, 58: 147-156
- Stab, A. ; et al (2001).** *Physiological characterisation of genes contributing to enhanced aluminium resistance in yeast.* Plant nutrition – Food security and sustainability of agro-ecosystems: 42-43
- Sumita, T. ; et al (2002).** **YIALK1* encoding the cytochrome *P450ALK1* in *Yarrowia lipolytica* is transcriptionally induced by *n*-alkane through two distinct *cis*-elements on its promoter.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 294: 1071-1078
- Swennen, D. ; et al (2002).** *Secretion of active anti-Ras single-chain Fv antibody by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*.* Microbiology, 148: 41-50
- Tannu, N. ; et al (2007).** *Cytosolic proteomic alterations in the nucleus accumbens of cocaine overdose victims.* Mol Psychiatry., 12: 55-73
- Trindade, J.; et al (2008).** *Aging mechanisms of oil-in-water emulsions based on a bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica*.* Colloids and Surfaces A, 324: 149-154
- Tsolakos, N. ; et al (2009).** *Comparison of two combinations of cyanine dyes for prelabelling and gel electrophoresis.* Proteomics, 9.

- Van Beilen, J.; et al (2007).** *Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation.* Appl Microbiol Biotechnol, 74: 13-21
- Van Rooyen, . ; et al (2005).** *Biotransformation of Alkenes, AlkilBenzenes and Their Derivatives by Genetically Engineered Yarrowia lipolytica Strains.* Tese.
- Von Mühlen, C. ; et al (2006).** *Caracterização de Amostras Petroquímicas e Derivados Utilizando Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GCxGC).* Quim. Nova, 29: 765-775
- Wang, S. ; et al (2004).** *Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae).* Planta, 220: 17-29
- Weber, H. ; et al (1988).** *Mating in the alkane-utilizing yeast Yarrowia lipolytica.* J. Basic Microbiol., 4: 229-240
- Werhahn, W. ; et al (2002).** *Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from Arabidopsis thaliana by three-dimensional gel electrophoresis.* Electrophoresis, 23: 640-646
- Williams, T. ; et al (2006).** *A novel Bicine running buffer system for doubled sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins.* Electrophoresis, 27: 2984
- Witing, I. ; et al (2008).** *Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis.* Proteomics, 8: 3974-3990
- Yamagami, S. ; et al (2004).** *A Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Essential for Cytochrome P450 Induction in Response to Alkanes in Yeast Yarrowia lipolytica.* The Journal of Biological Chemistry, 279: 22183-22189
- Yano, Y. ; et al (2008).** *Reduction of lipids in fish meal prepared from fish waste by a yeast Yarrowia lipolytica.* International Journal of Food Microbiology, 121: 302-307
- Zinjarde, S. ; et al (1998).** *Short Note: Double-stranded RNA from a marine alkane-degrading yeast Yarrowia lipolytica.* World Journal of Microbiology & Biotechnology, 14: 299-300
- Zvyagil'skaya, R. ; et al (2005).** *A novel alkali-tolerant Yarrowia lipolytica strain for dissecting Na⁺-coupled phosphate transport systems in yeasts.* Cell Biology International, 29: 87-94

6. Agradecimentos

Primeiramente, um agradecimento à Universidade de Lisboa e à Fundação Amadeu Dias que, com as Bolsas criadas, proporcionaram esta possibilidade de realização de um projecto de investigação. Ao Professor Doutor Belarmino Barata, que sugeriu o tema de trabalho e orientou o projecto, e à Ana Cristina Silva, colega de trabalho exemplar que participou e muito ajudou na realização do trabalho. Agradece-se também ao Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT) da FCUL, no qual decorreu a maior parte do trabalho laboratorial, e em particular à Doutora Sandra Chaves pelo apoio e grande disponibilidade que sempre prestou a este trabalho. Ao Professor Doutor João Coutinho, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, que gentilmente forneceu as estirpes de *Yarrowia lipolytica* utilizadas. Também ao Engenheiro David Dinis dos laboratórios da CLC (Companhia de Logística de Combustíveis, S. A. – Aveiras de Cima, Portugal), pelo interesse que demonstrou no projecto e por ter fornecido os destilados de petróleo que foram usados no trabalho. Finalmente, agradece-se ao grupo de Cromatografia e Electroforese Capilar do Centro de Química e Bioquímica da FCUL, nomeadamente ao Professor Doutor José Manuel Nogueira e ao Nuno Neng, por terem permitido a realização do GC-MS aos compostos da Refinaria usados.

André Filipe da Costa Faustino

andre_gromito@hotmail.com

Rua Principal, nº 54, Monte Gordo, 2640-603
Sobral da Abelheira, Mafra, Portugal

Telemóvel: 914756436

Prof. Doutor Belarmino A. S. Barata

bbarata@fc.ul.pt

Faculdade de Ciências da Universidade de
Lisboa, Departamento de Química e Bioquímica,
Campo Grande, Ed. C8, 1749 Lisboa, Portugal

Telefone directo: +351-217500398 ou +351-
217500075/+351-217500000 x.28258

Fax: +351-217500088

Anexos

Apresentam-se neste anexo as tabelas relativas às quantidades das soluções preparadas, os protocolos experimentais desenvolvidos, os resultados importantes menos relevantes de serem apresentados no relatório, e algumas especificidades de algumas técnicas usadas, de modo a complementar toda a informação contida no Relatório de Progresso. No último ponto é apresentado o Quadro Curricular de André Filipe da Costa Faustino para comprovativo do cumprimento dos 60 ECTS requeridos no presente Ano Lectivo.

Tabelas das Principais Soluções Preparadas

Solução de Oligoelementos				Stock (10x)	no Ensaio
Metais de Fundo	Formula	MM	g / L (10x)	em 1 L (M)	Conc. Final (M)
-	NaCl	58,45	30,00	5,13E-01	5,13E-02
Ferro	FeCl ₂ .4H ₂ O	198,75	0,0210	1,06E-04	1,06E-05
Zinco	ZnCl ₂	136,32	0,0100	7,34E-05	7,34E-06
Cobre	CuCl ₂ .2H ₂ O	169,45	0,0020	1,18E-05	1,18E-06
Cobalt	CoCl ₂ .6H ₂ O	237,83	0,0100	4,20E-05	4,20E-06
Níquel	NiCl ₂ .6H ₂ O	237,59	0,0028	1,18E-05	1,18E-06
Cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	146,98	0,0110	7,48E-05	7,48E-06
Magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	246,37	0,3000	1,22E-03	1,22E-04
Manganésio	MnCl ₂ .4H ₂ O	197,84	0,0100	5,05E-05	5,05E-06
Selénio	Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	263,00	0,0055	2,09E-05	2,09E-06
Boro	H ₃ BO ₃	61,81	0,0010	1,62E-05	1,62E-06
Vitamina	Tiamina-HCl	-	0,0100	-	-
Soluções Independentes de cada Metal				Stock (10x)	Ensaio
Metais a Variar	Formula	MM	g / L (10x)	em 100 mL (M)	Conc. Final (M)
Ferro	FeCl ₂ .4H ₂ O	198,75	0,1260	6,34E-03	6,34E-04
Molibdénio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241,95	0,0020	8,27E-05	8,27E-06
Vanádio	NaVO ₃	121,94	0,0010	8,20E-05	8,20E-06
Tungsténio	Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	329,84	0,0027	8,19E-05	8,19E-06
Zinco	ZnCl ₂	136,32	0,0100	7,34E-04	7,34E-05
Alumínio	AlK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	474,22	0,0100	2,11E-04	2,11E-05
Tampão de Fosfatos de Potássio (pH 7,0) com Sulfato				Stock (10x)	Ensaio
Outras Soluções	Formula	MM	g / L (10x)	em 1 L (M)	Conc. Final (M)
Fósforo	KH ₂ PO ₄	136,10	42,0000	3,09E-01	5,01E-02
	K ₂ HPO ₄	174,20	33,5000	1,92E-01	
Enxofre	Na ₂ SO ₄	142,07	1,5000	1,06E-01	1,06E-02

Tabelas de Razões Molares

Na decisão das quantidades de cada sal a adicionar nas soluções preparadas foi tida em conta a proporção molar de determinados elementos em relação a outros, relacionando-se uns com outros por diversos motivos químicos e fisiológicos. Essa comparação numérica é apresentada em Tabela:

Razões Molares entre Elementos						
Na/K	1,05	Fe/Metais	Fe Normal	0,07	Mo/Metais	0,05
(Na+K)/Cl	2,76		Fe Aumentado	4,35	V/Metais	0,05
(Na+K)/(Cl+S+P)	1,26	Zn/Metais	Zn Normal	0,05	W/Metais	0,05
Ca/Mg	0,06		Zn Aumentado	0,53	Al/Metais	0,13
(Na+K)/(Ca+Mg)	1097	Fe/Mg	Fe Normal/Mg	0,09	Al/Ca	2,82
SO ₄ /PO ₄	0,21		Fe Aumentado/Mg	5,29	Mo/Se	3,95
Catiões/Aniões	1,27				W/Se	3,91

Protocolos Experimentais

- Primeiro Bioscreen e Nefalómetros:

Sexta-Feira

9-10h – Preparar as soluções para autoclavar ao início da tarde (apenas as que não se degradarem ou a sua concentração não for alterada):

Água Destilada:

- Acertar o pH a 7,0 a 30°C de ≈1 L de água destilada e rotular.

Solução Stock de Yeast Extract (10%):

- Pesar 4,0 g de Yeast Extract e dissolver para ≈30 mL de solução em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 40 mL e rotular.

Solução Stock de Peptona (10%):

- Pesar 4,0 g de Peptona e dissolver para ≈30 mL de solução em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 40 mL e rotular.

Solução Stock de NaCl (25%):

- Pesar 5,0 g de NaCl e dissolver para ≈15 mL de solução em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 20 mL e rotular.

Solução Stock de NaCl (10%):

- Pesar 2,0 g de NaCl e dissolver para ≈ 15 mL de solução em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 20 mL e rotular.

Solução Stock de Fosfatos e Sulfato (10%):

- Pesar 42,0 g de KH_2PO_4 , 33,5 g de K_2HPO_4 e 1,5 g de Na_2SO_4 , e dissolver para ≈ 800 mL de solução em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C com KOH, perfazer o volume para 1000 mL e rotular.

Preparar 100 mL de meio YPD+Agar (1,5%) para fazer 4 placas:

Pesar 1,0 g de Yeast Extract (1%), 0,640 g de Peptona (0,64%), 2,0 g de Glucose e dissolver tudo em ≈ 90 mL de água destilada.

Acertar o pH a 7,0 e perfazer o volume para 100 mL. Adicionar o 3,0 g de Agar e rotular.

Plaquear antes de arrefecer.

14h – Preparar as soluções que não podem ser autoclavadas.

12h-14h – Autoclavar as soluções e o material.

15h-16h – Fazer 4 placas de meio YPD sólido e esperar que arrefeça.

Soluções que não podem ser autoclavadas:

Solução Stock de Glutamina (2,5%):

- Pesar 2,0 g de Glutamina e dissolver para ≈ 50 mL de solução em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 60 mL e rotular.

Solução Stock de Glucose (18%, 1M):

- Pesar 1,8 g de Glucose e dissolver para ≈ 8 mL de solução em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 10 mL e rotular.

Solução Stock de SDS (28,8%, 1M):

- Pesar 1,44 g de SDS, dissolver para 5 mL de solução em água destilada e rotular.

Solução Stock de Tween 80 (0,3%):

- Pipetar 14,0 mL de Tween 80, dissolver para 50 mL em água destilada e rotular.

Solução Stock de Oligoelementos (10x):

- Dissolver, para ≈ 800 mL de solução em água destilada, os sais nas seguintes quantidades:

NaCl – 30,00 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0110 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3000 g; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,0210 g;

ZnCl_2 – 0,0100 g; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0020 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0100 g; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0028 g;

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,0100 g; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,0055 g; H_3BO_3 – 0,0010 g; Tiamina-HCl – 0,0100 g.

- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 1000 mL e rotular.

Solução Stock de Ferro (10x):

- Pesar 0,1260 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e dissolver para ≈ 80 mL de solução em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C , perfazer o volume para 100 mL e rotular.

Solução Stock de Molibdénio (10x):

- Pesar 0,0020 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e dissolver para ≈ 80 mL de em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C , perfazer o volume para 100 mL e rotular.

Solução Stock de Vanádio (10x):

- Pesar 0,0010 g de NaVO_3 e dissolver para ≈ 80 mL de solução em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C , perfazer o volume para 100 mL e rotular.

Solução Stock de Tungsténio (10x):

- Pesar 0,0027 g de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e dissolver para ≈ 80 mL de em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C , perfazer o volume para 100 mL e rotular.

Solução Stock de Zinco (10x):

- Pesar 0,0100 g de ZnCl_2 e dissolver para ≈ 80 mL de solução em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C , perfazer o volume para 100 mL e rotular.

Solução Stock de Alumínio (10x):

- Pesar 0,0100 g de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e dissolver para ≈ 80 mL em água destilada.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C , perfazer o volume para 100 mL e rotular.

Ácido Oleico**Hexadecano**

- Esterilizar ≈ 10 mL destas soluções por filtração com seringa e filtros de poros com 45 μm .

17h-19h – (Antes de sair) Fazer riscados para as estirpes, pelo menos uma placa para cada. Colocar as placas na estufa e registar a hora.

Segunda-Feira

9h – Trabalhar numa Câmara de Fluxo Lâminar. Registrar a hora de início. Colocar todas as soluções a jeito e todo o material estéril e devidamente organizado:

- Soluções descritas na Sexta-Feira
- MicroPipetas de 20, 100, 200 e 1000 μL (tudo a dobrar de preferência).
- Pontas respectivas para as pipetas
- Ansas de inoculação azuis (“grandes”) e brancas ou amarelas (calibradas de 1 μL).
- Gobelés grandes para material sujo e contaminado.

- Duas Placas de BioScreen
- Tubos Eppendorf
- Adicionar os volumes das respectivas diluições pela ordem descrita na **Tabela**.
- Depois das adições (poços com 300 μ L), preparar as suspensões para inocular a partir das placas:
 - Preparar suspensões das duas estirpes em eppendorfs com 1000 μ L de água destilada, agitar bem e medir os valores de OD₆₀₀ com ansas azuis.
 - Diluir para 1 OD/mL noutra eppendorf em, pelo menos, 200 μ L (OD_{susp}).
 - Inocular os poços a partir do tubo de 1 OD/mL com ansas brancas, calibradas de 1 μ L.
 - Colocar as placas no BioScreen e pôr o ensaio a correr. As Condições de Ensaio serão: Temperatura – 30°C; Tempo de ensaio – 168 horas (1 Semana); pH – 7,0 ; Agitação – Máxima; Intervalos de Medição – 2 horas; OD/mL inicial de inóculo – 0,003 U. A..

- Nefalómetros:

Material: 300 mL de meio YPD; Placas com as estirpes de *Y. lipolytica*; Pipetas de 20 mL; Anas de inoculação (estéreis); Pontas de 100, 200 e 1000 μ L; MicroPipetas de 100, 200 e 1000 μ L; 2 Erlenmeyers de 25 ou 50 mL; Espectrofotómetro de Cuvettes; Cuvettes de plástico; 10 Nefalómetros / Erlenmeyers de 100 mL; Estufa a 30°C com agitação a 160 rpm

Procedimento

Fazer rolhas de algodão para os nefalómetros e erlenmeyers.

Verificar o rigor das MicroPipetas.

Trabalhar na esterilidade com os meios contendo células.

Em cada registo de OD₆₀₀, registar sempre a hora.

Serão inoculados 4 nefalómetros de cada vez com 20 mL cada, 2 para cada estirpe (RJ e W29).

Quarta-feira

Preparar as soluções e o material de manhã para autoclavar, nomeadamente: 300 mL de meio YPD (acertar o pH a 7,0), Erlenmeyers e/ou Nefalómetros.

Autoclavar à tarde.

Preparar o inóculo de cada estirpe, com 5 a 10 mL de meio YPD, às 19-20h.

Deixar durante a noite na estufa a 30°C com agitação a 160 rpm e registar a hora.

Quinta-feira

Medir os valores de OD_{600} dos inóculos em cuvete com uma diluição adequada, por volta das 8-9h, e calcular o volume necessário para inocular os nefalómetros com um OD_{600} inicial de 0,100.

Inocular os **nefalómetros 1** com 20 mL de meio YPD, medir os valores de OD_{600} iniciais e registar no quadro. Colocar na estufa e registar a hora (colocar também os erlenmeyers dos inóculos).

Colocar 20 mL de meio YPD num nefalómetros e colocar na estufa sem inoculação, para ser o controlo.

Fazer medições de OD_{600} de hora em hora para **todos os nefalómetros**, até às 22h. Corrigir a diluição (em cuvete) para valores de OD_{600} acima de 0,500.

Medir os valores de OD_{600} dos inóculos em cuvete com uma diluição adequada por volta das 19h e calcular o volume necessário para inocular os nefalómetros com um OD_{600} inicial de 0,100.

Inocular os **nefalómetros 2** com esse volume calculado. Medir OD_{600} inicial, pôr na estufa e registar a hora.

Sexta-feira

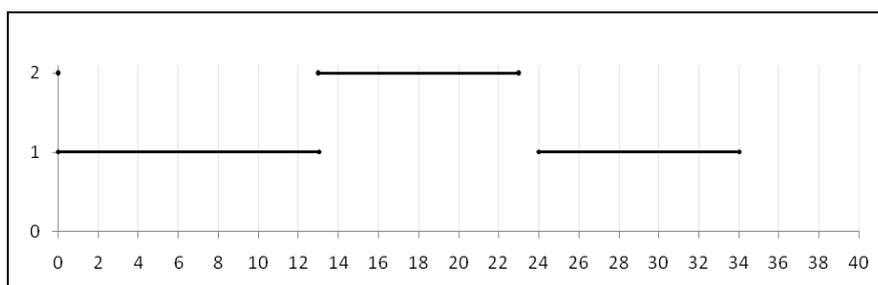
Medir valores de OD_{600} de **todos os nefalómetros** às 9h e continuar durante todo o dia de hora em hora.

Acabar com as medições por volta das 18h ou 19h.

Usar lixívia (ou outro método) para matar as células e limpar e arrumar o material.

No final do trabalho: os inóculos **1** estarão $\approx 14h$ e os **2** estarão $\approx 11h$ na incubação; os valores de OD_{600} foram medidos durante $\approx 12h$ de cada vez, em intervalos de tempo aproximadamente regulares, e os nefalómetros **1** terão mais 14h que os **2** (aproximadamente); as medições foram feitas durante dois dias inteiros (9h-22h).

O gráfico abaixo mostra os intervalos de tempo esperados das medições em que se têm sempre duplicados, excepto nos tempos onde não há registos (a vermelho) por problemas do procedimento.



- Análises por GC-MS:

Equipamento: As análises por cromatografia gasosa capilar foram efectuadas no sistema da Agilent Technologies, constituído por um cromatógrafo gasoso (Agilent 6890 Series) equipado com amostrador automático (Agilent 7683) e injector de vaporização de temperatura programada (PTV), acoplado ao detector selectivo de massa (Agilent 5973N). Todos os dados registados e o controlo instrumental foram efectuados a partir do software MSD ChemStation (G1701; versão C.00.00; Agilent Technologies). A coluna capilar utilizada foi Teknokroma TR-520232 TRB-5MS (27,6 m × 0,25 mm I.D., 0,30 μm d_p).

Protocolo

O injector PTV foi seleccionado no modo de injeção “split (1/100)” (fluxo: 150 mL min⁻¹; pressão: 0,0 psi; purga: fluxo 60,0 mL min⁻¹, tempo 2 min. O volume de injeção foi 1 μL. A fase móvel utilizada foi hélio no modo de pressão constante (19,58 psi). A temperatura do forno foi programada desde 50 °C (2 min) até 280 °C (a 10 °C min⁻¹), mantendo-se isotérmica durante 3 min.

A temperatura da linha de transferência, fonte de ionização e o quadrupólo foram mantidos a 280 °C, 230 °C e 150 °C. Foi usada ionização electrónica (70 eV) numa gama de massa compreendida entre 35 e 550 Da no modo de varrimento contínuo, uma corrente de ionização de 34,6 μA e um potencial multiplicador de 1200 V.

- Segundo Bioscreen:

Sexta-Feira

9-12h – Preparar as soluções para autoclavar ao início da tarde (apenas as termicamente estáveis e que a sua concentração não seja alterada):

Água Destilada:

- Acertar o pH a 7,0 a 30°C de ≈ 1 L de água destilada e rotular.

Solução Stock de Peptona (10%):

- Pesar 1,0 g de Peptona, dissolver para 10 mL de solução em água destilada e rotular.

Solução Stock de Fosfatos e Sulfato (10%):

- Verificar o pH a 30°C da solução anteriormente feita, ajustar a 7,0 com KOH e rotular.

Preparar 100 mL de meio YPD+Agar (1,5%) para fazer 4 placas:

Pesar 1,0 g de Yeast Extract (1%), 0,640 g de Peptona (0,64%), 2,0 g de Glucose e dissolver tudo em \approx 90 mL de água destilada.

Acertar o pH a 7,0 e perfazer o volume para 100 mL. Adicionar o 3,0 g de Agar e rotular.

Plaquear antes de arrefecer.

12h-14h – Autoclavar as soluções e o material.

15h – Fazer 4 placas de meio YPD sólido e esperar que arrefeça.

14h – Preparar as soluções que não podem ser autoclavadas:

Solução Stock de Glutamina (3,33%, 3,33x):

- Pesar 2,0 g de Glutamina e dissolver para \approx 50 mL de solução em água destilada.

- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 60 mL e rotular.

Solução Stock de Glucose (18%, 1M):

- Pesar 1,8 g de Glucose, dissolver para 10 mL de solução em água destilada e rotular.

Solução Stock de SDS (0,3%):

- Através da solução anteriormente feita a 14,4%, retirar 208 μ L e dissolver para 10 mL.

Solução Stock 1 de Tween 80 (0,8M):

- Pipetar um determinado volume de Tween 80 se diluir.

Solução Stock 2 de Tween 80 (0,3%):

- Pipetar 1,40 mL de Tween 80, dissolver para 5 mL em água destilada e rotular.

Solução Stock de Ferro e Tiamina (20x):

- Dissolver 0,0021 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 0,0010 g de Tiamina-HCl (vit. B1) para \approx 40 mL de solução em água destilada, acertar o pH a 7,0 a 30°C e perfazer o volume para 50 mL. Rotular e guardar.

Solução Stock de Metais de Fundo (20x):

- Dissolver, para \approx 400 mL de solução em água destilada, os seguintes sais nas respectivas quantidades:

NaCl – 30,00 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0110 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3000 g; ZnCl_2 – 0,0100 g;

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0020 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0100 g; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0028 g;

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,0100 g; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,0055 g; H_3BO_3 – 0,0010 g;

- Acertar o pH a 7,0 a 30°C e perfazer o volume para 500 mL. Guardar em tubos “Falcon”.

Solução Stock de Oligoelementos (10x):

- Juntar iguais vol.s das sol.s Stock de Ferro e Tiamina (20x) e Stock de Metais de Fundo (20x).

Solução Stock de Tungsténio (10x):

- Usar a solução previamente feita.

Ácido Oleico	Nonanol	Decanol	Undecanol	Dodecanol	Dodecano
Hexadecano	Jet A1	Gasóleo PT	Gasolina	Isoctano	

- Esterilizar \approx 10 mL dos compostos por filtração com seringa (50 mL) e filtros de 45 μ m de poro.

17h-19h – (Antes de sair) Fazer riscados para as estirpes, pelo menos uma placa para cada. Colocar as placas na estufa e registar a hora.

Segunda-Feira

9h – Trabalhar numa Câmara de Fluxo Lâminar. Registrar a hora de início. Colocar todas as soluções a jeito e todo o material estéril e devidamente organizado:

- Soluções feitas na Sexta-Feira
- MicroPipetas de 20, 100, 200 e 1000 μ L (tudo a dobrar de preferência).
- Pontas respectivas para as pipetas
- Ansas de inoculação azuis (“grandes”) e 200 brancas ou amarelas (calibradas de 1 μ L).
- Gobelés grandes para material sujo e contaminado.
- Duas Placas de BioScreen
- Tubos Eppendorf

- Adicionar os volumes das respectivas diluições pela ordem descrita na respectiva **Tabela**.

- Depois de todas as adições (poços com 300 μ L), preparar as suspensões para inocular a partir das placas:

- Preparar suspensões das duas estirpes em eppendorfs com 1000 μ L de água destilada, agitar bem e medir os valores de OD₆₀₀ com ansas azuis.

- Diluir para 1 OD/mL noutra eppendorf em, pelo menos, 200 μ L (OD_{susp}).

- Inocular os poços a partir do tubo de 1 OD/mL com ansas brancas, calibradas de 1 μ L.

- Colocar as placas no BioScreen e pôr o ensaio a correr. As Condições de Ensaio serão:

Temperatura – 30°C; Tempo de ensaio – 168 horas (1 Semana); pH – 7,0 ; Agitação – Máxima; Intervalos de Medição – 2 horas; OD/mL inicial de inóculo – 0,003 U. A..

- Terceiro Bioscreen:

Sexta-Feira

Manhã – Preparar as soluções para autoclavar ao início da tarde:

Água Destilada e Solução Stock de Fosfatos e Sulfato (10%)

Preparar 100 mL de meio YPD Líquido e Sólido (Agar a $\approx 2\%$) para fazer 4 placas:

Pesar 1,0 g de Yeast Extract (1%), 0,640 g de Peptona (0,64%), 2,0 g de Glucose e dissolver tudo em ≈ 90 mL de água destilada.

Acertar o pH a 7,0 e perfazer o volume para 100 mL.

- Retirar 10 mL e esterilizar por filtração *.

- Distribuir o filtrado em 1 mL por 9 tubos eppendorf e inocular 4 para cada estirpe (1 é suplente)

Adicionar 1,8 g de Agar aos restantes 90 mL, rotular e autoclavar.

Guardar o meio sólido em banho-maria a 50 °C e plaquear antes de arrefecer.

12h-14h – Autoclavar as soluções. Plaquear o meio Sólido em 4 placas, depois de autoclavado, e fazer riscados depois de arrefecer para as duas estirpes. Preparar as seguintes soluções:

Solução Stock de Oligoelementos (10x):

- Juntar, em cada um de 2 tubos falcon de 15 mL estéreis, 5 mL de Stock de Metais de Fundo (20x) com 5 mL de Stock de Ferro e Tiamina (20x) directamente por filtragem.

Solução Stock de Tungsténio (200 μM):

- Pesar 0,0066 g de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e dissolver para ≈ 80 mL em água destilada.

- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 100 mL em balão volumétrico e rotular.

Solução Stock de Sulfato de Amónio (10x):

- Pesar 1,850 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dissolver para ≈ 15 mL em água destilada em proveta.

- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 20 mL e rotular.

Solução Stock de Cloreto de Amónio (10x):

- Pesar 1,498 g de NH_4Cl e dissolver para ≈ 15 mL em água destilada em proveta.

- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 20 mL e rotular.

- Esterilizar as soluções por filtração com seringa e filtros com 45 μm de poro *.

Antes de sair – Ter a certeza que se inocularam os meios líquidos e sólidos e que tudo está esterilizado e existe em suficiente quantidade. Colocar as placas na estufa e registar a hora.

Segunda-Feira

9h – Preparar as suspensões dos álcoois e verificar todo o Material e soluções.

Suspensões de Álcoois (10x):

- Juntar, em eppendorf estéril, 17,4 μL de 1-Nonanol com 982,6 μL de Água Destilada.
- Juntar, em eppendorf estéril, 20,8 μL de 1-Undecanol com 979,2 μL de Água Destilada.
- Juntar, em eppendorf estéril, 22,4 μL de 1-Dodecanol com 977,6 μL de Água Destilada.
- Agitar vigorosamente no vórtex o respectivo tubo a cada pipetagem.

Verificar que todas as Soluções estão prontas e Esterilizadas:

- Solução de Oligoelementos (10x) _ ; - Tampão $\text{PO}_4 + \text{SO}_4$ (10x) _ ; - Água Destilada Estéril _ ;
- Sulfato de Amónio (10x) _ ; - Cloreto de Amónio (10x) _ ; - Glutamina (10x) _ ; - Solução de Tungsténio (200 μM) _ ; - Glucose (10x) _ ; - Hexadecano _ ; - Dodecano _ ; - Ácido Oleico _ ;
- Tween 80 (0,3%, 10x) _ ; - Suspensão de 1-Nonanol _ ; - Suspensão de 1-Undecanol _ ;
- Suspensão de 1-Dodecanol _ ; - Gasolina _ ; - Gasóleo _ ; - JET A1 _ ; - Isoctano _

13h30 – Trabalhar numa Câmara de Fluxo Lâminar. Registrar a hora de início.

- Colocar todas as soluções a jeito e todo o material estéril e devidamente organizado:
 - Soluções descritas acima
 - MicroPipetas de 20, 100, 200 e 1000 μL (tudo a dobrar de preferência) e respectivas pontas
 - Ansas de inoculação azuis (“grandes”) e 200 brancas ou amarelas (calibradas de 1 μL)
 - 2 Placas de BioScreen
 - Placas das estirpes e tubos eppendorf (pelo menos 4), e meios líquidos inoculados.
 - Gobelés grandes para material sujo e contaminado
- Adicionar os volumes das respectivas diluições pela ordem descrita na **Tabela**.
- Depois de todas as adições (poços com 300 μL), preparar as suspensões para inocular:
 - Agitar bem e medir o valor de OD/mL das culturas líquidas.
 - Caso sejam necessárias as culturas em placa, fazer suspensões das duas estirpes em eppendorf com 1000 μL de água destilada, agitar bem e medir os valores de OD₆₀₀ com ansas azuis.
 - Diluir entre 10 e 1 OD/mL noutra eppendorf em, pelo menos, 300 μL .
 - Inocular os poços a partir do tubo de 10 a 1 OD/mL com ansas brancas, calibradas de 1 μL .
- Colocar as placas no BioScreen e pôr o ensaio a correr. As Condições de Ensaio serão:
Temperatura – 30°C; Tempo de ensaio – 168 horas (1 Semana); pH – 7,0 ; Agitação – Máxima;
Intervalos de Medição – 2 horas; OD/mL inicial de inóculo – 0,030 U. A..

- Placas – Meios Sólidos:

9h30 – Preparar as soluções e o material para a autoclave.

Água Destilada, Solução Stock de Fosfatos e Sulfato (10%), 15 Tubos falcon de 50 mL, 13 Papeis de Filtro numa placa de Petri e 10 Tubos eppendorf, tudo para **autoclavar**.

Solução Stock Agar (2x, 4%):

- Pesar 4,0 g de Agar e juntar água destilada para 100 mL. Rotular e **autoclavar**. Manter a 50 °C (líquido) até ser usado.

Solução Stock de Oligoelementos (10x):

- Juntar, num tubo falcon de 50 mL estéril, 10 mL de Stock de Metais de Fundo (20x) com 10 mL de Stock de Ferro e Tiamina (20x) directamente por **filtração**.

Solução Stock de Cloreto de Amónio (10x):

- Pesar 1,498 g de NH₄Cl e dissolver para ≈15 mL em água destilada em proveta.
- Acertar o pH a 7,0 a 30°C, perfazer o volume para 20 mL, esterilizar por **filtração** e rotular.

- ESTERILIZAR TODAS as soluções (na autoclave ou por filtração).

- Adicionar a Tubos “falcon” estéreis as quantidades (em mL) definidas no quadro abaixo:

(Vol. em mL)	Controlo	Glucose	Gluc + Hxd	Hexadecano	Dodecano	Ácido Oleico
Oligoelementos	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tampão P+S	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Fonte de N	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Glucose	-	1,5	0,150	-	-	-
Água	3,0	1,5	3,0	3,0	3,0	3,0
Papel de Filtro	Água	Água	Hexadecano	Hexadecano	Dodecano	Ácido Oleico

(Vol. em mL)	Gasolina	Gasóleo	Jet A1	Isoctano	Undecanol	Dodecanol
Oligoelementos	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tampão P+S	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Fonte de N	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Glucose	-	-	-	-	-	-
Água	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Papel de Filtro	Gasolina	Gasóleo	Jet A1	Isoctano	Undecanol	Dodecanol

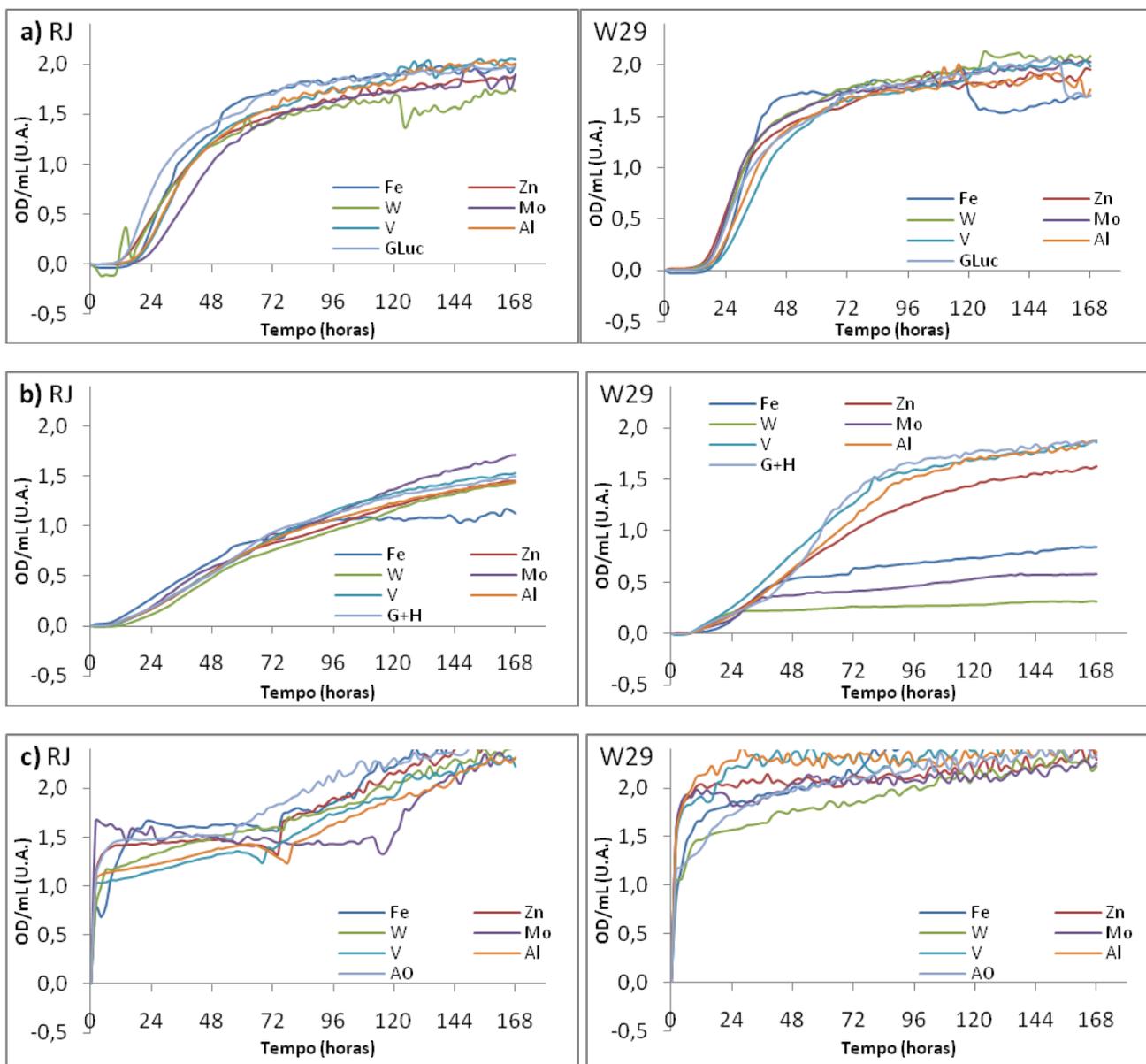
- Quando a autoclavar, **adicionar 7,5 mL de Agar 4% líquido** a cada meio e guardar no banho-maria a 50°C.

- Adicionar **300 µL** das fontes de carbono imiscíveis (ou água nos restantes casos) aos papeis de filtro já nas placas e plaquear os meios de seguida. Deixar os meios a secar.

- Preparar 3 suspensões de cada estirpe, com **1, 0,1, e 0,01 OD/mL** de concentração celular. Inocular os meios como descrito na Figura 9ª do relatório. Guardar as placas a 30°C o tempo necessário.

Resultados Anexos do Relatório

- Primeiro Bioscreen:



(Continuação na pág. 49)

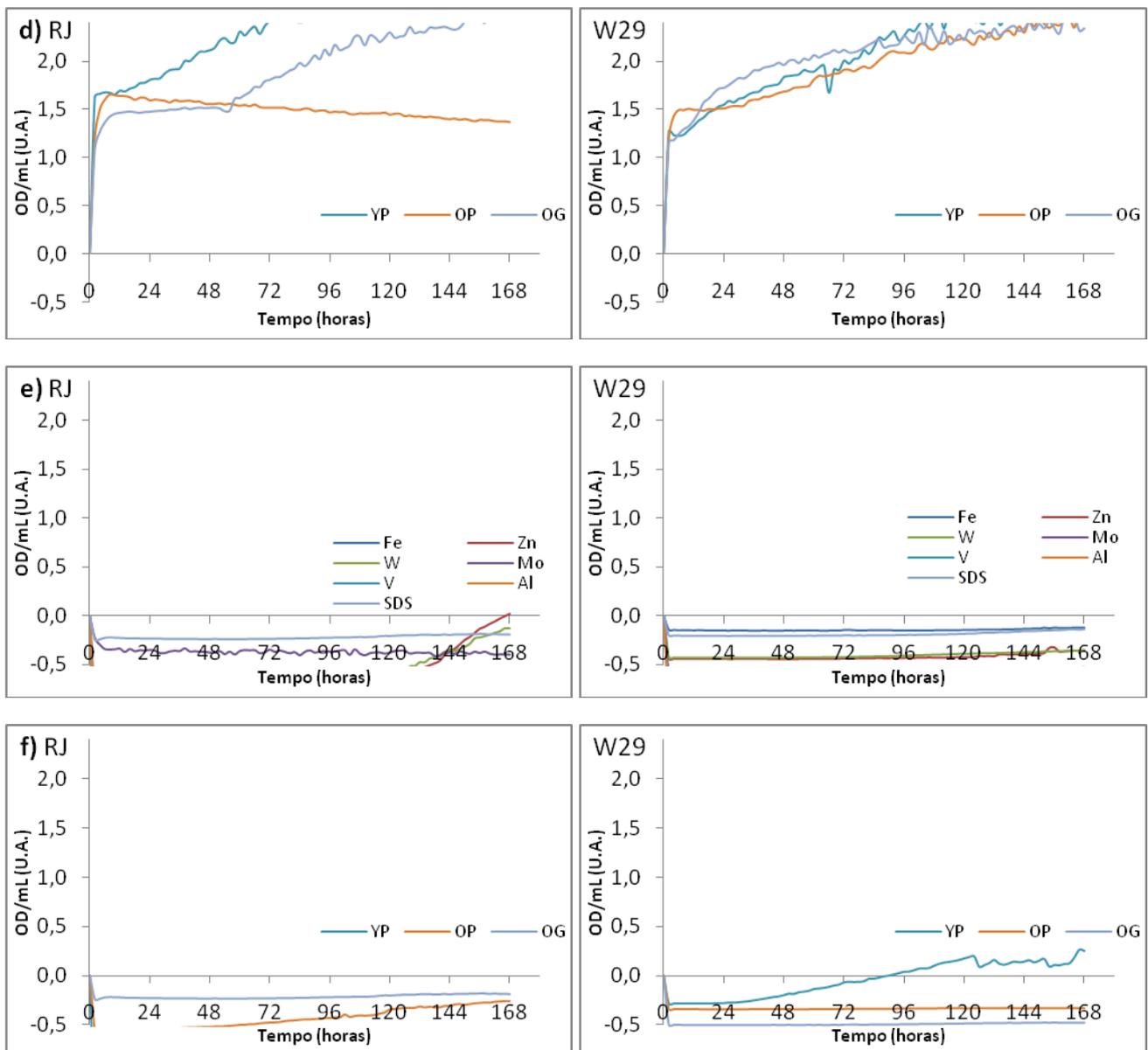


Figura 1A – Curvas de crescimento das duas estirpes nos meios de OE com Gln e T8 como surfactante: **a)** Fonte de carbono Gluc com mais ferro (Fe), zinco (Zn), tungsténio (W), molibdénio (Mo), vanádio (V) e alumínio (Al) e o meio com glucose (Gluc) sem metais como referência; **b)** Fonte de carbono Gluc e Hxd (G+H) com mais ferro (Fe), zinco (Zn), tungsténio (W), molibdénio (Mo), vanádio (V) e alumínio (Al) e o meio com G+H sem metais como referência; **c)** Fonte de carbono Ácido Oleico (AO) com mais ferro (Fe), zinco (Zn), tungsténio (W), molibdénio (Mo), vanádio (V) e alumínio (Al) e o meio com AO sem metais como referência; **e)** Fonte de carbono SDS com mais ferro (Fe), zinco (Zn), tungsténio (W), molibdénio (Mo), vanádio (V) e alumínio (Al) e o meio com SDS sem metais como referência. Com Yeast Extract e Peptona (YP), com Oligoelementos e Peptona (OP), e com Oligoelementos e Glutamina (OG): **d)** fonte de carbono Ácido Oleico (AO); **f)** fonte de carbono SDS.

- Segundo Bioscreen:

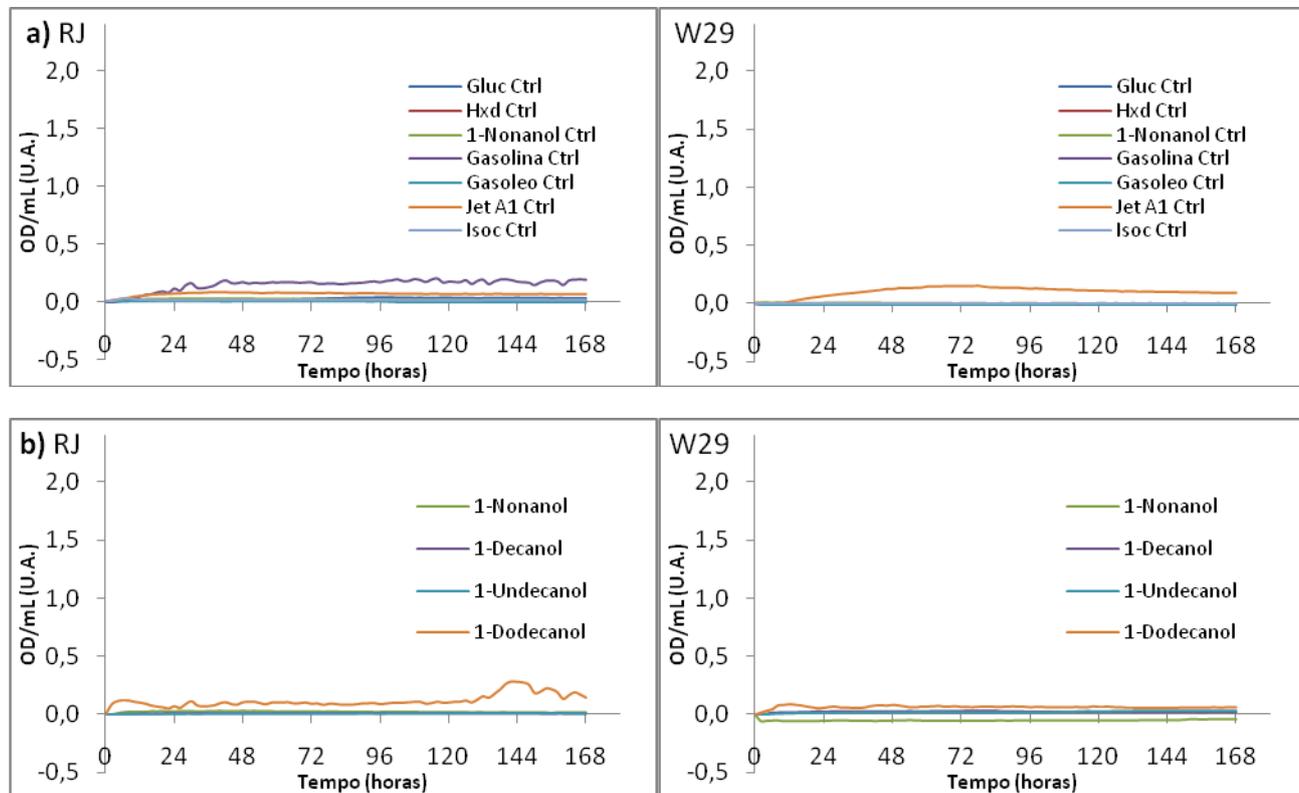


Figura 2A – Curvas de crescimento das duas estirpes no meio de Oligoelementos com tampão fosfatos pH 7 e glutamina como fonte de azoto: **a)** ensaios controlo (Ctrl) / brancos dos meios com Glucose (Gluc), Hexadecano (Hxd), 1-Nonanol, Gasolina, Gasóleo, Jet A1 e Isoctano (Isoc); **b)** curvas de crescimento com álcoois como fonte de carbono a 0,1M: 1-Nonanol, 1-Decanol, 1-Undecanol e 1-Dodecanol.

- Terceiro Bioscreen:

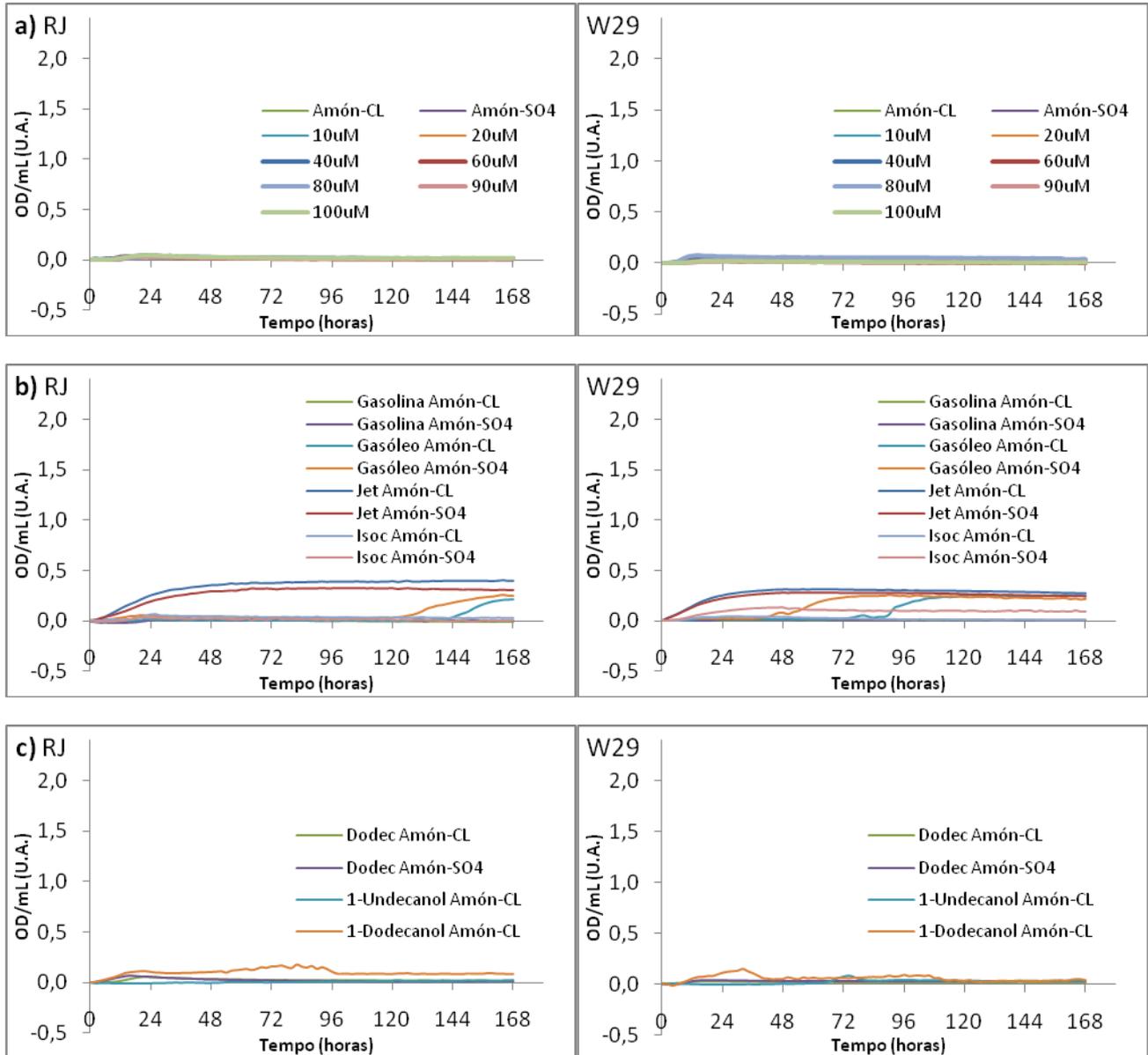
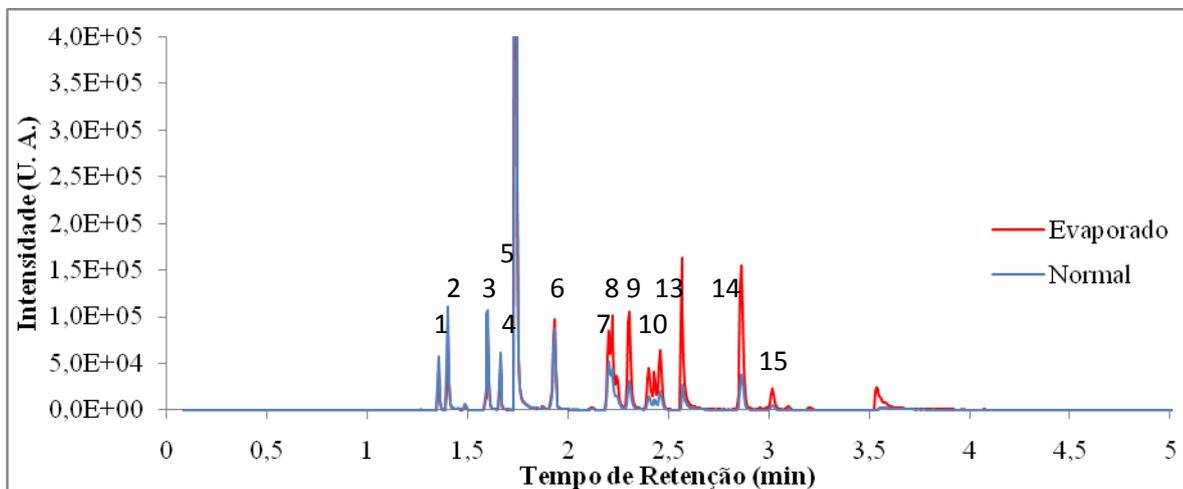


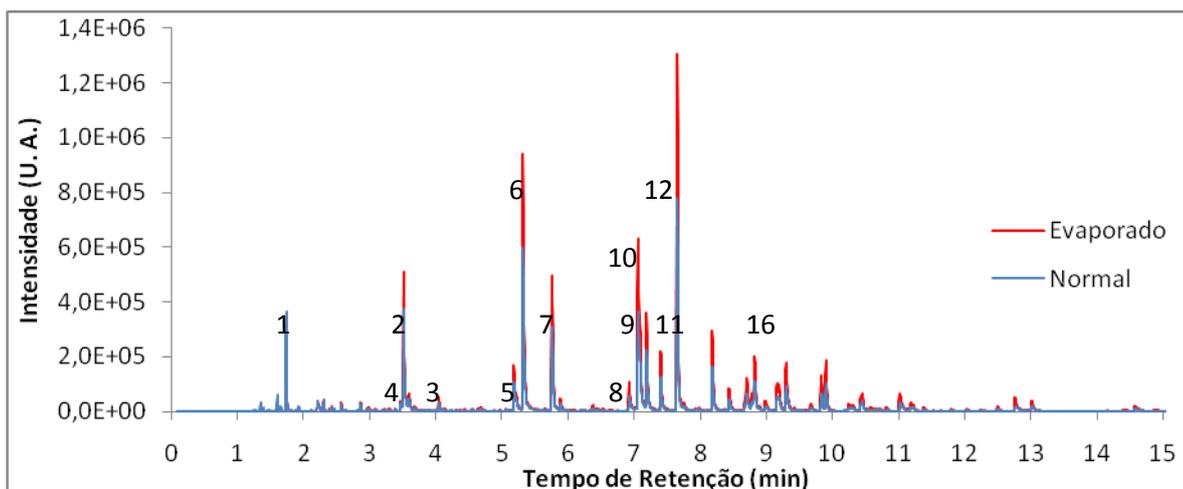
Figura 3A – Curvas de crescimento das duas estirpes no meio de Oligoelementos com tampão fosfatos pH 7: **a)** crescimento em Hexadecano com diferentes fontes de azoto (N), Cloreto de Amónio (Amón-CL), Sulfato de Amónio (Amón-SO4) e crescimento em Hexadecano com concentrações crescentes de tungsténio (10,20,40,60,80,90 e 100µM tungsténio); **b)** com Gasolina, Gasóleo, Jet A1 (Jet), Isoctano (Isoc) como fontes de carbono com Amón-CL e Amón-SO4; **c)** com Dodecano (Dodec) em Amón-SO4 e Amón-CL e 1-Undecanol e 1-Dodecanol (0,01M) em Amón-CL.

- Cromatogramas de GC:

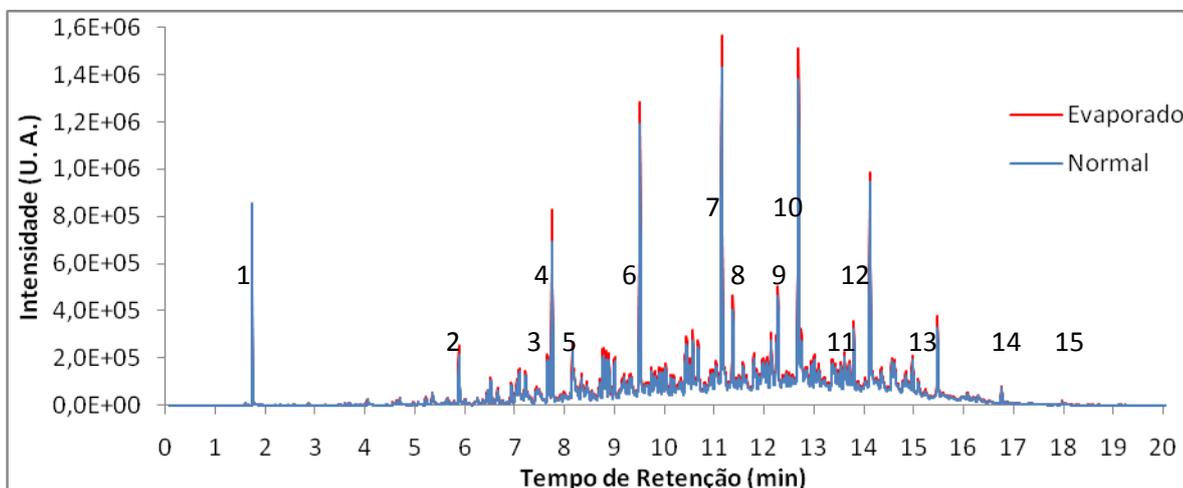
Cromatograma de Nafta



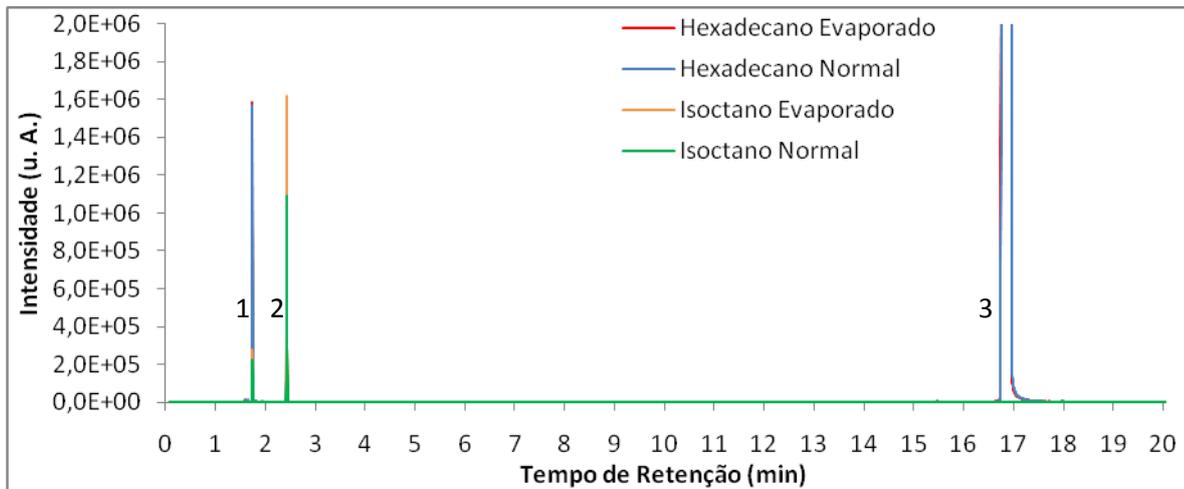
Cromatograma de Gasolina



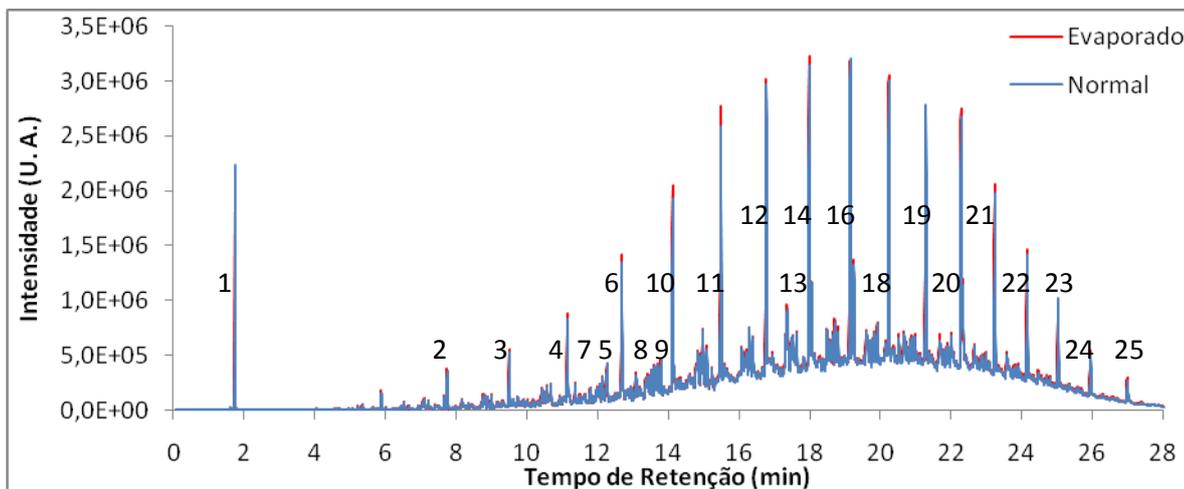
Cromatograma de Jet A1



Cromatograma de Isoctano (2) e Hexadecano (3)



Cromatograma de Gasóleo PT



Cromatograma dos Gasóleos (fracção normal)

