

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE

**DETECÇÃO DE *Paecilomyces variotii* PELA
TÉCNICA DE PCR**

Jorge Gassen
Farmacêutico – UFRGS

Março, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE

DETECÇÃO DE *Paecilomyces variotii* PELA TÉCNICA DE PCR

Jorge Gassen
Farmacêutico – UFRGS

Dissertação apresentada no
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do
Ambiente como um dos requisitos
para a obtenção do Grau de
Mestre em Microbiologia
Ambiental.

Orientador: Amauri B. Simonetti
Co-orientadora: Fátima M. Bento

Porto Alegre, RS, Brasil
Março de 2012

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Adalberto e Leila, e às minhas irmãs Lisane e Cristina por todo o incentivo, amor e carinho.

À minha esposa Juliana, pelo amor, carinho e pela presença e apoio constante nos bons e maus momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti minha imensa gratidão pela orientação e pelos ensinamentos, confiança, dedicação e amizade.

À Prof. Dra. Fátima Menezes Bento pela co-orientação, auxílio e ensinamentos transmitidos.

Aos meus familiares e amigos, pelo carinho e pela confiança no meu trabalho.

A todos os colegas de Laboratório, especialmente Adriane, Letícia, Natália, Juciana, Francielle, Aline e Angélica pelo apoio, amizade e ajuda sempre que precisei.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela contribuição em minha formação acadêmica.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

DETECÇÃO DE *Paecilomyces variotii* PELA TÉCNICA DE PCR

Autor: Jorge Gassen¹

Orientador: Amauri Braga Simonetti

Co-orientadora: Fátima Menezes Bento

Resumo

A amplificação *in vitro* de DNA, utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido estudada como uma alternativa aos tradicionais métodos de detecção de micro-organismos contaminantes em tanques de armazenagem de biodiesel. Neste sentido, objetivou-se padronizar um método rápido e eficaz para detecção de *Paecilomyces variotii* utilizando-se a técnica de PCR e avaliar o desenvolvimento de *P. variotii* em amostras contendo diesel puro (B0), mistura diesel/biodiesel (B7) e biodiesel puro (B100). Em sistemas contendo meio mínimo mineral e misturas diesel/biodiesel, após 60 dias, verificou-se que o micro-organismo desenvolveu biomassa significativamente superior em B7 e B100 quando comparados a B0. A técnica de PCR foi capaz de detectar um mínimo de 10^3 esporos/mL de *P. variotii* em suspensão com água, correspondente a 0,0144 ng de DNA/ μ L, e demonstrou ausência de reações inespecíficas frente aos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Pseudallescheria boydii*. Entretanto, o método mostrou-se ineficaz para detecção de *P. variotii* em amostras contendo diesel, biodiesel ou misturas de diesel/biodiesel.

Palavras-chave: biodiesel, contaminação, padronização de PCR, *Paecilomyces variotii*.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Março, 2012.

DETECTION OF *Paecilomyces variotii* BY THE PCR TECHNIQUE

Autor: Jorge Gassen²

Orientador: Amauri Braga Simonetti

Co-orientadora: Fátima Menezes Bento

Abstract

The *in vitro* amplification of DNA using polymerase chain reaction (PCR), has been studied as an alternative to traditional methods for detecting microorganisms contaminating biodiesel storage tanks. In this sense, the aim of this study was to standardize a fast and effective method for detection of *Paecilomyces variotii* using the PCR technique and evaluate the development of *P. variotii* in samples containing pure diesel (B0), blend diesel/biodiesel (B7) and pure biodiesel (B100). In systems containing mineral minimal medium and diesel/biodiesel blends after 60 days, it was found that the microorganism biomass developed significantly higher in B7 and B100 when compared to B0. The PCR technique was able to detect a minimum of 10^3 spores/mL of *P. variotii* in suspension with water, corresponding to 0,0144 ng DNA/ μ L, and showed no nonspecific reactions against the fungi *Aspergillus fumigatus* and *Pseudallescheria boydii*. However, this method proved to be ineffective for the detection of *P. variotii* in samples containing diesel, biodiesel or diesel/biodiesel blends.

Keywords: biodiesel, contamination, PCR standardization, *Paecilomyces variotii*.

²Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. March, 2012.

Sumário

Relação de tabelas.....	v
Relação de figuras.....	vi
Relação de abreviaturas.....	x
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1 Objetivos Gerais.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
3. Revisão Bibliográfica.....	5
3.1 Contaminação microbiana de biodiesel.....	5
3.1.1 <i>Paecilomyces variotii</i>	8
3.2 Métodos de detecção de contaminantes.....	9
3.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	11
4. Materiais e métodos.....	16
4.1 Padronização da PCR.....	16
4.1.1 Micro-organismos.....	16
4.1.2 Extração de DNA.....	16
4.1.3 Análise qualitativa e quantitativa do DNA.....	19
4.1.4 Oligonucleotídeos iniciadores.....	20
4.1.5 Amplificação.....	20
4.1.6 Análise dos produtos da PCR.....	22
4.2 Avaliação da sensibilidade do método.....	22
4.2.1 Crescimento microbiano em misturas de diesel em biodiesel.....	22
4.2.1.1 Micro-organismos.....	22
4.2.1.2 Combustíveis.....	23
4.2.1.3 Condições de cultivo para o crescimento microbiano.....	24
4.2.1.4 Curvas de crescimento de <i>Paecilomyces variotii</i>	25
4.2.2 Detecção de <i>Paecilomyces variotii</i> contaminante por PCR.....	27
4.3 Análise estatística.....	28
5. Resultados e Discussão.....	29
5.1 Curvas de crescimento de <i>Paecilomyces variotii</i>	29
5.2 Extração de DNA.....	35
5.3 Padronização e análise dos produtos da PCR.....	39
5.4 Detecção de <i>Paecilomyces variotii</i> por PCR.....	45
6. Conclusões.....	49
7. Perspectivas.....	50
8. Referências Bibliográficas.....	51
9. Anexos.....	56

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Consequências do desenvolvimento microbiano em sistemas combustíveis.....	7
Tabela 2. Micro-organismos isolados de combustíveis.....	8
Tabela 3. Quantificação de DNA extraído de suspensões de esporos em concentrações crescentes.....	38

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Formação de sedimentos em tanques de armazenagem de óleo diesel.....	7
Figura 2. Desnaturação da dupla fita de DNA.....	13
Figura 3. Anelamento dos <i>primers</i>	14
Figura 4. Extensão da fita de DNA.....	14
Figura 5. Frasco experimental contendo a fase aquosa e a fase oleosa do ensaio.....	25
Figura 6. Frascos experimentais após 28 dias de experimento.....	31
Figura 7. Evolução do desenvolvimento de <i>P. variotii</i> a partir de um inóculo contendo 10^2 esporos/mL em diesel/biodiesel durante um período de 60 dias.....	32
Figura 8. Evolução do desenvolvimento de <i>P. variotii</i> a partir de um inóculo contendo 10^4 esporos/mL em diesel/biodiesel durante um período de 60 dias.....	32
Figura 9. Evolução do desenvolvimento de <i>P. variotii</i> a partir de um inóculo contendo 10^6 esporos/mL em diesel/biodiesel durante um período de 60 dias.....	33
Figura 10. Evolução do desenvolvimento de <i>P. variotii</i> em B0 com quantidades crescentes de micro-organismos inoculados.....	34
Figura 11. Evolução do desenvolvimento de <i>P. variotii</i> em B7 com quantidades crescentes de micro-organismos inoculados.....	34
Figura 12. Evolução do desenvolvimento de <i>P. variotii</i> em B100 com quantidades crescentes de micro-organismos inoculados.....	35
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% para avaliação da qualidade do DNA extraído para posterior uso em PCR.....	36
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% para avaliação da quantidade de DNA extraído de cada ponto das diluições.....	37
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% para avaliação da quantidade de produtos de PCR obtidos de cada ponto das diluições.....	38

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% para avaliação do efeito de uma quantidade crescente de MgCl ₂ na intensidade das bandas.....	41
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% para avaliação do efeito de quantidades crescentes de <i>primers</i> e dNTPs na intensidade das bandas.....	42
Figura 18. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% para avaliação do efeito da temperatura na intensidade das bandas.....	44
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% para avaliação da especificidade dos <i>primers</i>	44
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% para detecção de <i>P. variotii</i> em B0 no tempo 0	45
Figura 21. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% para detecção de <i>P. variotii</i> em B7 no tempo 0	46
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% para detecção de <i>P. variotii</i> em B100 no tempo 0	46

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANP	Agência Nacional do Petróleo
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
atm	Atmosfera
B0	Diesel obtido a partir do petróleo
B7	Mistura contendo 7% de biodiesel em diesel de petróleo
B100	Biodiesel produzido a partir de soja
°C	Grau Celsius
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
mA	Miliampères
mg	Miligramma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pmoles	Picomoles
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SRB	<i>Sulfate Reducing Bacteria</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
U	Unidade
V	Volts
W	Watts

1. INTRODUÇÃO

As crescentes preocupações econômicas e com o meio ambiente, além das estatísticas indicando que as reservas de energias fósseis não ultrapassarão os próximos 50 anos, têm incentivado a busca de novas fontes de combustíveis alternativos, tais como energia eólica, energia solar e os biocombustíveis.

Biodiesel é um combustível originado de fontes renováveis produzido a partir de óleos vegetais (babaçu, soja, mamona, dendê, algodão, girassol etc.) ou gordura animal e um álcool (metanol ou etanol), na presença de um catalisador ácido ou básico em um processo chamado de transesterificação. O futuro indica a possibilidade de haverem grandes mudanças na fabricação e utilização de biodiesel pelo Brasil. A expectativa é que o país seja um dos principais produtores e consumidores de biocombustíveis do mundo. Há evidências de que isto significaria a diminuição da emissão de gases de efeito estufa e, conseqüentemente, permitiria o uso do petróleo e seus derivados para outros fins, salientando-se que a produção de biodiesel deverá ser feita a partir de uma visão ecológica, ou seja, com a produção encaixada no ambiente natural e social e, assim, trazer benefícios à sociedade e ao planeta.

O biodiesel tem sido avaliado para ser o substituto do diesel de petróleo. Por ser compatível com o diesel, o biodiesel está sendo adicionado ao diesel de petróleo progressivamente, pois a mistura resulta em um aumento da qualidade do combustível. Além disso, também contribui na diminuição da poluição, pois se trata de uma fonte de carbono proveniente de plantas (fonte renovável), enquanto o diesel é obtido a partir do petróleo.

Tanques de estocagem de combustíveis freqüentemente são contaminados por micro-organismos, principalmente fungos e bactérias. Esta contaminação leva à formação de uma biomassa que pode causar o entupimento de filtros e tubulações. Além disso, a atividade metabólica microbiana produz ácidos orgânicos e inorgânicos, causando alterações químicas e físicas que comprometem a qualidade do combustível.

Entre os contaminantes mais freqüentes estão os fungos filamentosos, entre estes, encontra-se o *Paecilomyces variotii*, um fungo filamentoso comumente encontrado em tanques de estocagem. Os métodos tradicionais de detecção de micro-organismos contaminantes em tanques são demorados e os custos são altos para as operações de descontaminação quando esta for necessária. Portanto, é necessário o desenvolvimento de procedimentos mais rápidos e sensíveis para que a contaminação possa ser detectada mais precocemente.

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante, bem como o advento da amplificação *in vitro* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), que permite obter rapidamente grandes quantidades de cópias de um segmento de DNA específico, viabilizaram

métodos de análise baseados em seqüências de ácidos nucléicos. A aplicação dessas tecnologias originou diversos estudos na busca de métodos mais eficazes para a detecção, diferenciação e identificação de micro-organismos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Padronizar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase para detecção do fungo filamentosso *Paecilomyces variotii*, contaminante de sistemas contendo diesel e/ou biodiesel.

2.2 Específicos

- Avaliar o desenvolvimento do fungo em diferentes períodos de incubação, utilizando-se amostras contendo diesel e biodiesel nas concentrações de B0, B7 e B100.

- Determinar a sensibilidade e a especificidade do método de PCR na fase aquosa de amostras contendo diesel e biodiesel, nas concentrações B0, B7 e B100, após contaminações com concentrações crescentes de esporos fúngicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Contaminação microbiana de biodiesel

O biodiesel é um combustível produzido a partir de óleos vegetais extraídos de diversas matérias primas renováveis como palma, mamona, soja, girassol, entre outras. Pode ser produzido também a partir de gordura animal (Macedo & Macedo, 2004; Marchetti *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Murugesan *et al.*, 2009 a, b).

A constituição química do biodiesel é de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos de cadeia longa que são obtidos, respectivamente, pela transesterificação dos triacilgliceróis com metanol ou etanol. No processo de transesterificação, a reação entre os triacilgliceróis e o álcool é catalisada por um ácido, uma base ou uma enzima, resultando na produção de biodiesel e de subprodutos como o glicerol (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Portaria nº 255 ANP, 2003; Macedo & Macedo, 2004; Marchetti *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Murugesan *et al.*, 2009 a, b). As propriedades físico-químicas do biodiesel são similares àquelas do diesel derivado do petróleo (Marchetti *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Murugesan *et al.*, 2009 b). Assim, a grande compatibilidade dos ésteres de ácidos graxos com o diesel convencional os caracteriza como uma alternativa capaz de

atender à maior parte da frota de veículos diesel já existente no mercado e, quando utilizados em misturas com o diesel de petróleo (por exemplo, B5, B10, B20), não há necessidade de investimento tecnológico para o desenvolvimento ou adaptação dos motores (Biodiesel: Handling and Use Guidelines, 2004; Gerpen *et al.*, 2004).

Uma vantagem do ponto de vista ambiental que o biodiesel apresenta em relação ao diesel mineral, que é a biodegradabilidade, também o torna mais suscetível à contaminação microbiana durante o período de armazenamento (Chesneau, 2000; Passmann, 2005; Bento *et al.*, 2006). A contaminação de biodiesel armazenado é um sério problema, uma vez que pode comprometer a qualidade do produto (Bento *et al.*, 1999; Bento *et al.*, 2006). A contaminação microbiana durante o armazenamento de combustíveis pode levar a perdas que vão desde o comprometimento da qualidade final do combustível nas bombas de abastecimento, desgastes nos bicos injetores, até a corrosão dos tanques de estocagem (Gaylarde *et al.*, 1999). A condição fundamental para iniciar o processo de deterioração do combustível é a água presente nos lastros dos tanques, que entra nos sistemas principalmente pela condensação nas paredes do tanque. Como principal consequência do desenvolvimento microbiano nesse sistema ocorre a formação de uma biomassa na interface óleo-água, que é composta por diferentes grupos microbianos, tais como fungos filamentosos, leveduras, e bactérias (**Figura 1**).

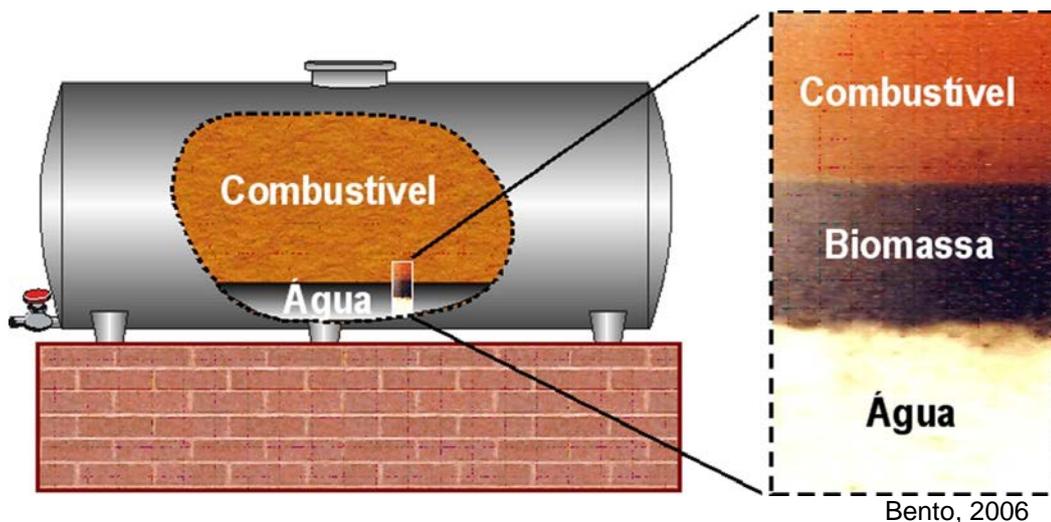


Figura 1: Formação de sedimentos em tanques de armazenamento de óleo diesel.

Tabela 1. Consequências do desenvolvimento microbiano em sistemas combustíveis.

PROBLEMAS DETECTADOS	PRINCIPAIS TIPOS DE MICRO-ORGANISMOS
Bloqueio de mangueiras, válvulas, e filtros	Fungos; bactérias produtoras de polímeros
Aumento do conteúdo de água	Todos
Formação de sedimento	Todos
Produção de biossurfactante	Fungos e bactéria aeróbias
Corrosão de tanques e tubulações	Fungos e bactérias anaeróbias
Produção de sólidos suspensos	Todos
Degradação dos hidrocarbonetos	Fungos e bactérias aeróbias
Bloqueio de injetores	Fungos e bactérias aeróbias
Aumento do conteúdo de enxofre	Bactérias redutoras de sulfato (BRS)
Comprometimento do sistema de injeção	Todos

Gaylarde et al., 1999.

A presença física deste sedimento biológico ocasiona diversos problemas (**Tabela 1**), como por exemplo o entupimento de filtros e tubulações, alterando as propriedades físicas como cor e odor e propriedades químicas como a estabilidade química e a degradação das cadeias de hidrocarbonetos do combustível (Gaylarde *et al.*, 1999; Bento *et al.*, 1999; Bento *et al.*, 2006). Outra

conseqüência inclui a corrosão dos tanques, que provoca acidentes com derramamento de combustíveis, comprometendo o solo, subsolo e corpos de água. A corrosão interna dos tanques ocorre pela presença de água, mas pode ser acelerada pelos produtos gerados durante o desenvolvimento microbiano (Piá, 2002).

Tabela 2. Micro-organismos isolados de combustíveis.

Bactérias		
<i>Acinetobacter</i>	<i>Brevibacterium ammoniaqenes</i>	<i>Pasteurella sp</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Acinetobacter cerificans</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Actinomycetos</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Acrobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Pseudomonas maliphora</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Flavobacterium arborescens</i>	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Flavobacterium diffusum</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	<i>Micrococcus sp.</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Bacillus megatherium</i>	<i>Moraxella sp.</i>	<i>Serratia odorífera</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Ochrobactrum anthropii</i>	SRB ¹
Leveduras		
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Candida quilliermondii</i>	<i>Candida zeylanoides</i>
<i>Candida sp.</i>	<i>Candida lipolytica</i>	<i>Hansenula mrakii</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Candida rugosa</i>	<i>Rhodotorula sp.</i>
<i>Candida fluvialilis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Saccharomyces sp</i>
Fungos filamentosos		
<i>Acremonium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Penicillium hirsutum</i>
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Fusarium acuminatum</i>	<i>Penicillium minioluteum</i>
<i>Alternaria sp.</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Penicillium notatum</i>
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Penicillium spinulosum</i>
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Fusarium sambucinum</i>	<i>Penicillium thomii</i>
<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Geomyces cretaceus</i>	<i>Penicillium waksmanii</i>
<i>Aspergillus fischeri</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Pestalotiopsis aquatica</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Gliomastix sp.</i>	<i>Phialophora sp.</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Helminthosporium sp.</i>	<i>Phialophora richardsiae</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Hormoconis resiniae</i>	<i>Phoma sp.</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Humicola grisea</i>	<i>Phomopsis sp.</i>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Mucor sp.</i>	<i>Pseudallescheria boydii</i>
<i>Aspergillus paradoxus</i>	<i>Paecilomyces sp.</i>	<i>Rhinocladiella sp.</i>
<i>Aspergillus sejunctus</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Aspergillus sydowi</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>Sordaria fimicola</i>
<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Paecilomyces virvus</i>	<i>Stemphylium botryosum</i>
<i>Aspergillus tamaris</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Thielavia sp.</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
<i>Cephalosporium sp.</i>	<i>Penicillium canescens</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>Chaetomium dolichotrichum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Trichoderma koningii</i>
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Penicillium corylophilum</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Cladosporium sp</i>	<i>Penicillium cyclophilum</i>	<i>Trichosporon sp.</i>
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Trichothecium roseum</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Penicillium echinulatum</i>	<i>Tritirachium oryzae</i>
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Ulocladium sp.</i>
<i>Curvularia lunatus</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Ulocladium atrum</i>
<i>Drechslera cynodontis</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Ulocladium chartarum</i>
<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	

¹Sulfate Reducing Bacteria

Gaylarde et al., 1999.

3.1.1 *Paecilomyces variotii*

Inúmeros micro-organismos já foram isolados de tanques de armazenamento de biodiesel (**Tabela 2**) (Edmons & Cooney, 1967; Atlas, 1981;

Vaz, 2010; Gaylarde *et al.*, 1999), sendo que alguns dos fungos mais freqüentemente detectados são *Hormoconis resinae*, *Aspergillus fumigatus*, *P. variotii*, *Penicillium* sp., e as leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Candida silvícola* (Bento & Gaylarde, 2001). Entre estes, já havia sido relatada a habilidade de *P. variotii* desenvolver-se em combustíveis (Gaylarde *et al.*, 1999). Posteriormente Bucker *et al.* (2011) demonstraram que *Paecilomyces* sp é o micro-organismo que desenvolve a maior biomassa em misturas diesel/biodiesel ou biodiesel puro quando comparado com *Aspergillus fumigatus*.

Paecilomyces sp é um fungo filamentoso comumente encontrado no ar, no solo (climas subtropical e tropical), na madeira e em produtos alimentícios (Samson, 1974; Houbraken *et al.*, 2008). É considerado um agente oportunista causador de micoses em pacientes imunocomprometidos (Houbraken *et al.*, 2010); e no ambiente, é considerado o agente causal da biodeterioração do couro, de cosméticos, de emulsões farmacêuticas e do óleo vegetal (Samson, 1974). Além disso, já foi identificado como formador de biofilmes em sistemas de distribuição de água (Doggett, 2000), em polímeros sintéticos (Roberts *at al*, 1986) e até mesmo em roupas espaciais (Breuker *et al*, 2003).

3.2 Métodos de detecção de contaminantes

Os custos com descontaminação, limpeza e drenagem dos tanques de armazenamento de combustíveis são altos. Deve-se evitar, portanto, a execução desses procedimentos quando não houver necessidade, ou seja, quando não existir contaminação. Para detectar contaminantes em amostras de

combustíveis provenientes de tanques de armazenagem, os métodos tradicionais são baseados em técnicas de filtração acompanhadas por microscopia e/ou cultura e consomem muito tempo, principalmente para fungos, que têm crescimento mais lento (Gaylarde *et al.*, 1999).

Em 1979 foram testados kits comerciais para detecção de contaminantes em diesel naval, que foram em geral considerados fáceis de usar; quanto à sensibilidade, apresentaram boa correlação com padrões laboratoriais. O tempo necessário para detecção de fungos, entretanto, ficou entre dois e três dias por se tratar de laminocultivo. Esta técnica consiste em um frasco estéril contendo uma lâmina coberta com ágar enriquecido com nutrientes; a lâmina é então imersa no líquido teste, recolocada no frasco e incubada em temperatura e tempo apropriados. Posteriormente avaliam-se qualitativamente e quantitativamente o desenvolvimento de micro-organismos (Bailey & Mai, 1979).

Um teste bastante rápido e relativamente prático foi desenvolvido em 1996 por Lopes & Gaylarde. Anticorpos policlonais anti-*Hormoconis resinæ* foram produzidos e utilizados na padronização de um método de detecção deste micro-organismo por imunofluorescência em amostras de querosene de aviação. Este teste permitiu a redução do tempo de detecção do micro-organismo de dias para apenas algumas horas, além de demonstrar uma maior capacidade de detecção em comparação com métodos padronizados. Entretanto, é necessário o uso de um microscópio de fluorescência, o que requer um profissional qualificado, além da obtenção de anticorpo monoclonal específico, uma vez que anticorpos policlonais podem produzir reações cruzadas.

Atualmente, os testes mais rápidos e práticos disponíveis comercialmente baseiam-se em reações químicas ou na imunocromatografia. Testes baseados em reações químicas consistem em um tubo contendo uma pastilha reativa. A amostra é adicionada ao tubo e incubada por uma hora a 37^oC. A pastilha reage com enzimas comumente encontradas em micro-organismos contaminantes de combustíveis, gerando um composto corado que é, então, comparado com uma cartela de cores padrão. Trata-se de um método rápido e semi-quantitativo, porém inespecífico (Echa Microbiology, 2012).

Testes baseados na imunocromatografia se desenvolvem em uma membrana de nitro celulose. A membrana possui anticorpos específicos marcados com ouro sob o poço de reação; a amostra contendo uma quantidade desconhecida de micro-organismos é adicionada ao poço de reação, que se reidrata permitindo que os reagentes migrem ao longo da membrana. Durante a migração, os micro-organismos ligados aos anticorpos marcados reagirão com anticorpos específicos fixados na linha “teste”, onde se desenvolve a coloração. Esses testes são simples e rápidos, porém cada kit detecta apenas uma espécie de micro-organismo e são qualitativos (Conidia Biosciences, 2012).

3.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A última década testemunhou muitos avanços na detecção molecular de fungos, sendo que o mais promissor foi a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR é altamente sensível, pois quantidades muito pequenas de sequências específicas de DNA ou RNA podem ser amplificadas enzimaticamente a uma extensão tal que uma quantidade

suficiente de material fica disponível para alcançar o limiar de detecção (Koneman *et al.*, 2001). A técnica de PCR quando utilizada para detectar fungos pode chegar a detectar DNA correspondente a apenas três células fúngicas (Fungaro, 2000). Para detecção do vírus da hepatite C o limite teórico de detecção, por PCR, em condições ótimas, é de aproximadamente 1000 cópias do genoma/mL, mas existem variações da técnica e uma das mais sensíveis é capaz de detectar até 100 cópias do genoma/mL de soro (Brandão *et al.*, 2001).

Desenvolvida inicialmente por Kary B. Mullis, em 1985, a técnica permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA através da ação da enzima DNA Polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento denominado *termociclador*, o qual possibilita a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, de modo a permitir a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (Koneman *et al.*, 2001).

A PCR apresenta diversas vantagens em relação às técnicas convencionais, como maior rapidez, bom limite de detecção, maior especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com micro-organismos que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (Bush & Nitschko, 1999). As principais desvantagens são a incapacidade de diferenciar células vivas de células mortas e o alto investimento em equipamentos e reagentes (Malorny *et al.*, 2003).

O desenvolvimento da PCR reside em três passos fundamentais:

1) a seleção de uma região alvo específica do DNA/RNA para identificar o

micro-organismo; 2) a extração do DNA/RNA da amostra e 3) um método para identificar a presença da região alvo na amostra (Atkins & Clark, 2004).

Para realizar uma PCR, em primeiro lugar deve-se extrair o material genético da célula sem danificá-lo. Normalmente o material extraído é o DNA, mas pode-se trabalhar com RNA também. Depois de extraído o DNA, este é adicionado a uma mistura que contém os dNTPs, os *primers* (também chamados oligonucleotídeos ou iniciadores), cloreto de magnésio e a enzima DNA polimerase em um tampão. Toda esta mistura é colocada no termociclador, que faz os ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação.

Na primeira etapa do ciclo a temperatura é elevada a 94 a 96°C por alguns segundos para que haja a separação da dupla fita de DNA (desnaturação - quebra das pontes de hidrogênio, **Figura 2**).

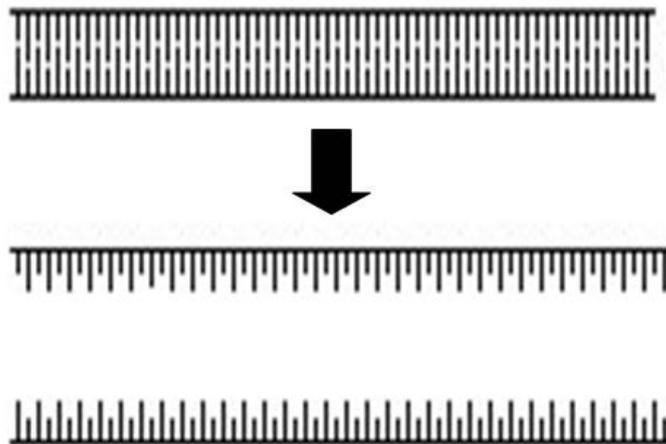


Figura 2: desnaturação da dupla fita de DNA.

Na segunda etapa, a temperatura é reduzida entre 50 e 60°C dependendo da quantidade de citosina (C) e guanina (G) encontrada no *primer*,

para que os *primers* se anelem com a fita molde de DNA (anelamento, **Figura 3**).

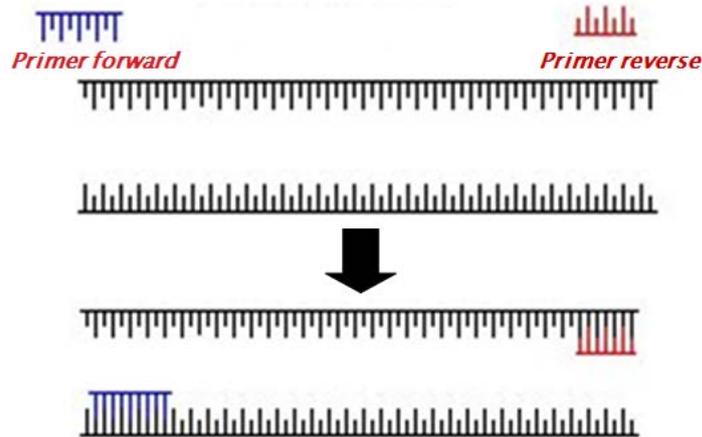


Figura 3: anelamento dos *primers*.

Na última etapa do ciclo a temperatura é elevada a 72°C para que a enzima possa funcionar sintetizando a nova molécula (extensão, **Figura 4**) e em seguida um novo ciclo é iniciado. Normalmente são realizados de 25 a 40 ciclos (Maniatis *et al.*, 1983).

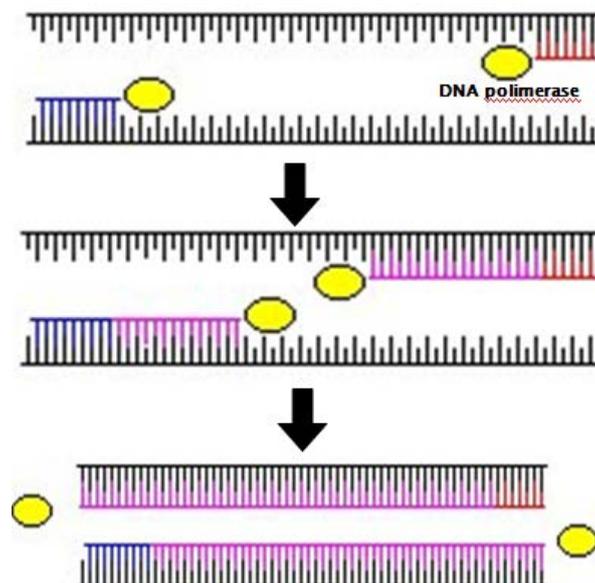


Figura 4: extensão (síntese da nova molécula).

O DNA ribossomal (rDNA) fúngico consiste de três genes, a subunidade grande (25S), a subunidade pequena (18S) e o gene 5.8S,

separados por regiões ITS (do inglês *Internal Transcribed Spacer*, ou Espaçador Transcrito Interno), em unidades repetidas muitas vezes. A região ITS é uma área de particular importância para o estudo de fungos, pois possui áreas altamente conservadas e outras altamente variáveis sendo, portanto, um alvo ideal para o desenvolvimento de *primers* específicos para a detecção e identificação de espécies fúngicas (White *et al.*, 1990).

Existe um grande número de métodos de extração de DNA para fungos. A escolha do método depende da necessidade de uma extração rápida, da pureza do DNA e do tipo de amostra ambiental da qual o DNA será extraído. Na análise de amostras ambientais, é necessário um processo de extração com alto rendimento, para aumentar o limite de detecção do método. O DNA pode ser extraído do micélio ou dos esporos através de diversos processos físicos como maceração com nitrogênio líquido, agitação com pérolas, enzimas que degradam a parede celular ou detergentes como dodecil sulfato de sódio (SDS) e brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) (Arriel *et al.*, 2002; Vanittanakom *et al.*, 2002; Haugland *et al.*, 2004; Lignell *et al.*, 2008).

A PCR tem sido usada para detectar sequências de genes que codificam enzimas que participam da via biossintética das micotoxinas, detectar fungos patógenos vegetais e patógenos humanos como *Paracoccidioides sp*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon sp*, *Penicillium sp* e *Paecilomyces sp* (Haynes *et al.*, 1995; Sugita *et al.*, 1999; Fungaro, 2000; Marques, 2003; Haugland *et al.*, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.1.1 Micro-organismos

Para a padronização da PCR foi utilizado o fungo filamentoso *P. variotii* cepa ATCC 16023 (PV1), adquirida da Fundação André Tosello (Campinas, SP) em setembro de 2010. Para avaliar se a PCR padronizada é capaz de detectar a cepa de *P. variotii* encontrada em tanques de armazenamento de combustíveis contaminados, foi utilizado o micro-organismo isolado (PV2) através da filtração de amostras de biodiesel de soja como descrito por Bento & Gaylarde (1996). Para avaliar a especificidade dos *primers*, foram utilizados dois fungos filamentosos, *Pseudallescheria boydii* e *Aspergillus fumigatus*, igualmente isolados de acordo com Bento & Gaylarde (1996). O meio de crescimento e manutenção utilizado para os micro-organismos foi ágar malte 2%, pH 6,5.

4.1.2 Extração de DNA

A extração do DNA genômico do *P. variotii* (PV1 e PV2) foi realizada de acordo com o método proposto por Ferreira e Grattapaglia (1996), após preparação prévia.

A preparação prévia consistiu em cultivo do micro-organismo em Caldo Malte 2% (**Anexo 9.1.3**). Depois de preparado o caldo, o micro-organismo foi inoculado com auxílio de uma alça microbiológica e incubado em estufa microbiológica a 28°C por 7 dias. Após esse período, o micélio foi retirado do caldo, lavado com água destilada e seco com papel filtro. Em seguida, o micélio foi macerado em um gral com o uso de nitrogênio líquido até pulverização total.

Conforme proposto por Ferreira e Grattapaglia (1996), 0,7 mL de tampão CTAB previamente aquecido a 65°C foi adicionado a 100 mg do micélio pulverizado, em um tubo tipo eppendorf com capacidade para 1,5 mL. A mistura foi incubada em banho termostatizado a 65°C durante uma hora, com agitação periódica em intervalos de 10 minutos. A esse homogeneizado foi adicionado 0,6 mL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1, agitando-se manualmente por 5 minutos. Esta preparação foi então centrifugada por 10 minutos a 11.400 g em uma centrífuga Eppendorf Minispin; a fase aquosa foi transferida para um novo tubo eppendorf previamente identificado e esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C, a 1 atm. Nesse tubo foi adicionado 0,4 mL de isopropanol P.A. gelado (-20°C) e o tubo foi homogeneizado durante 1 minuto, e depois submetido à temperatura de -20°C por no mínimo 30 minutos para formação do sedimento. O tubo foi centrifugado por 20 minutos a 11.400 g, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% por 5 minutos e uma vez com 1 mL de etanol absoluto por 3 minutos. O precipitado ficou secando à temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspensionado em 150

μ L de tampão Tris-EDTA (TE) com RNase (10 μ g/mL) e incubado a 37°C por 30 minutos.

Além disso, com o objetivo de determinar qual a quantidade mínima de esporos e de DNA que pode ser detectada pelo método de extração utilizado e pela PCR padronizada neste trabalho, foi feita uma diluição seriada de esporos (PV1) em água, de forma a obter as suspensões dos esporos nas quantidades de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos por mL de água. Para a realização do experimento, primeiramente foi necessário preparar uma suspensão concentrada de esporos. O fungo foi inoculado em 10 tubos de ensaio com capacidade para 10 mL contendo 3 mL de Ágar Malte (**Anexo 9.1.2**), e os tubos foram incubados em estufa a 28°C por 21 dias. Após esse período, nos tubos onde o fungo cresceu foram adicionados 2 mL de uma solução de Tween 80 a 0,01% e os tubos foram agitados levemente para liberar os esporos. O conteúdo de todos os tubos foi vertido em um frasco de vidro estéril e, em seguida, foi feita a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Após a contagem, uma suspensão com concentração de 10^8 esporos/mL foi preparada, e a partir desta foram preparadas as diluições maiores, todas em um volume final total de 1 mL em tubos eppendorf com capacidade para 1,5 mL.

De posse da diluição seriada, o próximo passo foi proceder a extração do DNA. Para isso, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 6.700 g e o sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta. Os tubos ficaram em repouso em estufa a 37°C com a tampa aberta até secagem total (aproximadamente 30 minutos). Em seguida, o sedimento foi macerado com

um pistilo, visando romper a parede dos esporos expondo o DNA. Após essa preparação, a extração do DNA foi procedida conforme proposto por Ferreira e Grattapaglia (1996) e já descrito previamente.

Outros métodos também foram testados para romper o micélio e os esporos em fase aquosa em tubo eppendorf de 1,5 mL, porém com rendimento inferior ao método previamente descrito. Foi utilizada maceração com pistilo e uso de nitrogênio líquido; choque térmico com banho termostaticado fervente e nitrogênio líquido; uso de sonicador, para rompimento de células por ultrassom; uso de homogeneizador de tecidos (Omni Mixer); e uso de pérolas de vidro de 1 mm (técnica *bead beating*).

4.1.3 Análise Qualitativa e Quantitativa do DNA

As análises qualitativa e quantitativa do DNA extraído foram realizadas avaliando-se o extrato por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, com brometo de etídio como corante. Nesse procedimento, o DNA ressuspenso foi diluído na proporção de 1 parte da amostra para 9 partes de água estéril; a 5 µL dessa diluição, 1 µL de tampão de amostra de uso (Gel Loading Dye, New England Biolabs) foi adicionado e o volume total foi introduzido em uma canaleta do gel, para comparação com um marcador de peso molecular (adicionado nas mesmas condições em outra canaleta) com a finalidade de determinar a concentração de DNA extraído, além de sua qualidade. O marcador utilizado foi Lambda/Hind III 0,1 µg/µL (Ludwig Biotec) contendo 8 fragmentos variando entre 125 e 23.130 pares de bases; para a eletroforese, foi utilizada uma fonte da marca GSR modelo 300 STD, tendo sido

utilizadas as seguintes condições para a corrida: voltagem 100 V, amperagem 50 mA e potência de 120 W. O gel foi analisado e documentado em um fotodocumentador Kodak Digital Science (Kodak DC 120) utilizando o software Kodak 1D 3.5 (KODAK). A quantificação do DNA total extraído da série de diluição de esporos foi feita pela técnica de fluorometria, utilizando-se o equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (INVITROGEN).

4.1.4 Oligonucleotídeos Iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) selecionados para padronização da PCR foram os seguintes:

Forward: 5'-CGAAGACCCCTGGAACG

Reverse: 5'-GTTGTTGAAAGTTTTAATTGATTGATTGT

Esses *primers* foram desenvolvidos e testados por Haugland *et al.* (2004), que os utilizou em uma padronização de PCR em tempo real com o uso de kits comerciais (Applied Biosystems). As informações sobre a seqüência estão depositadas no GenBank sob o número de acesso AY373941. Os *primers* amplificam uma sequência localizada na região ITS e o fragmento amplificado possui 73 pares de bases, conforme segue:

CGAAGACCCCTGGAACGCTGCCTGGAAGGTTGCCGTCTGAGTATAACAATCA
ATCAATTAAACTTTCAACAAC

4.1.5 Amplificação

Adaptou-se a metodologia proposta por Haugland *et al.* (2004), com modificações. A solução foi inicialmente preparada com 4,95 µg de albumina bovina, 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase, 0,1 µM de cloreto de

magnésio, tampão de reação (10 mM de Tris-HCl e 50 mM de KCl), 12,5 pmol de cada *primer*, 50 µM de cada dNTP e 10 µg de DNA molde, completando com água destilada estéril o volume para um total de 25 µL. Todos os reagentes citados foram desenvolvidos e fornecidos por Ludwig Biotec, exceto os *primers* (GBT Oligos).

Para a amplificação, foi utilizado um equipamento Eppendorf Mastercycler Personal, programado para efetuar inicialmente 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação do molde e 1 minuto a 60°C para anelamento dos *primers* e extensão.

Para definir boas condições de reação, foram realizadas curvas com quantidades crescentes de cloreto de magnésio, dNTPs e primers e foram testadas temperaturas de anelamento e extensão crescentes. O cloreto de magnésio foi testado nas concentrações 0,5, 1,0 1,5, 2,0 e 2,5 mM; os dNTPs foram testados nas concentrações 50, 100, 150 e 200 µM de cada; e os *primers* foram testados nas quantidades 12,5, 25, 37,5, 50 e 62,5 pmoles de cada *primer*. Cada curva foi feita separadamente, mantendo-se as concentrações iniciais dos outros componentes. As temperaturas de anelamento testadas foram 56°C, 58°C, 60°C, 62°C e 64°C, de acordo com Haugland *et al.* (2004), que utilizou a temperatura de 60°C para padronização de *Real Time* PCR com estes *primers*.

Com o objetivo de avaliar a especificidade dos *primers*, após a padronização da PCR foram testados também DNAs extraídos de

Pseudoallescheria boydii e *Aspergillus fumigatus* sob as mesmas condições do *P. variotii*.

4.1.6 Análise dos produtos de PCR

A análise dos produtos de PCR foi realizada avaliando-se os produtos por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, com brometo de etídio (0,5 µg/mL) como corante. Nesse procedimento, a 8 µL do produto foram adicionados 2 µL de tampão de amostra e o volume total foi introduzido em uma canaleta do gel, para comparação com um marcador de peso molecular (*ladder* de 50 pares de bases (50-1000 pares de bases), Ludwig Biotec), adicionado nas mesmas condições em outra canaleta, com a finalidade de visualizar uma banda na região de 73 pares de bases. Para a eletroforese, foi utilizada uma fonte da marca GSR modelo 300 STD, tendo sido utilizadas as mesmas condições já descritas para caracterizar o DNA mencionado anteriormente em 4.1.3.

4.2 Avaliação da sensibilidade do método

4.2.1 Crescimento microbiano em misturas de biodiesel em diesel

4.2.1.1 Micro-organismos

Para a avaliação da sensibilidade do método desenvolvido neste trabalho foi utilizado o fungo filamentoso *P. variotii* (PV2) isolado através de

filtração de amostras de biodiesel B4, como descrito por Bento & Gaylarde (1996). O micro-organismo foi identificado com base nos estudos morfológicos analisados por microcultivo, de acordo com Barnett (1960) e confirmado por identificação molecular realizada pela Fundação André Tosello. Por se tratar de uma cepa isolada de biodiesel, esta foi considerada ideal para simulação de uma situação de contaminação em misturas diesel/biodiesel.

4.2.1.2 Combustíveis

Os combustíveis utilizados nos experimentos foram fornecidos pela Distribuidora de Petróleo Ipiranga S.A. Foram utilizados óleo diesel (S-50) e biodiesel produzido a partir de soja. Foi utilizada a mistura com 7% de biodiesel ao diesel (denominada B7), somente biodiesel (B100) e somente diesel (B0). A mistura de diesel e biodiesel (B7) foi preparada no laboratório utilizando-se uma proveta graduada. A esterilização do combustível (diesel, biodiesel e da mistura) foi realizada utilizando-se um frasco Kitassato esterilizado e um filtro com membranas de porosidade 0,22 μm (Millipore). O combustível filtrado foi armazenado em frascos de vidro previamente esterilizados em autoclave. Após a esterilização, o combustível foi acondicionado nos frascos, que foram guardados em caixas de papelão, para evitar a foto-oxidação do combustível, por uma semana a temperatura ambiente.

4.2.1.3 Condições de cultivo para o crescimento microbiano

Os experimentos envolvendo o crescimento dos fungos filamentosos, utilizando diesel/biodiesel como fonte de carbono e energia, foram conduzidos em frascos de vidro, previamente esterilizados, com capacidade para 150 mL, utilizando-se uma fase aquosa e uma fase oleosa, como pode ser visualizado na **Figura 5**. A fase aquosa (meio mineral) foi confeccionada conforme Richard & Vogel (1999), sendo composta por nutrientes minerais que simula a condição de água de lastro presente nos tanques, com o objetivo de acelerar o crescimento dos micro-organismos deteriorogênicos do combustível. O meio mineral, cuja composição é apresentada no **Anexo 9.1.1**, foi esterilizado. Após a esterilização da fase aquosa adicionou-se a fase oleosa nestes frascos, na proporção de 1:1 (20 mL de fase aquosa e 20 mL de fase oleosa). A fase oleosa foi constituída por diesel (B0), biodiesel (B100) ou pela mistura diesel/biodiesel (B7), esterilizadas como descrito anteriormente. O experimento foi realizado em triplicata, montado com repetições destrutivas.

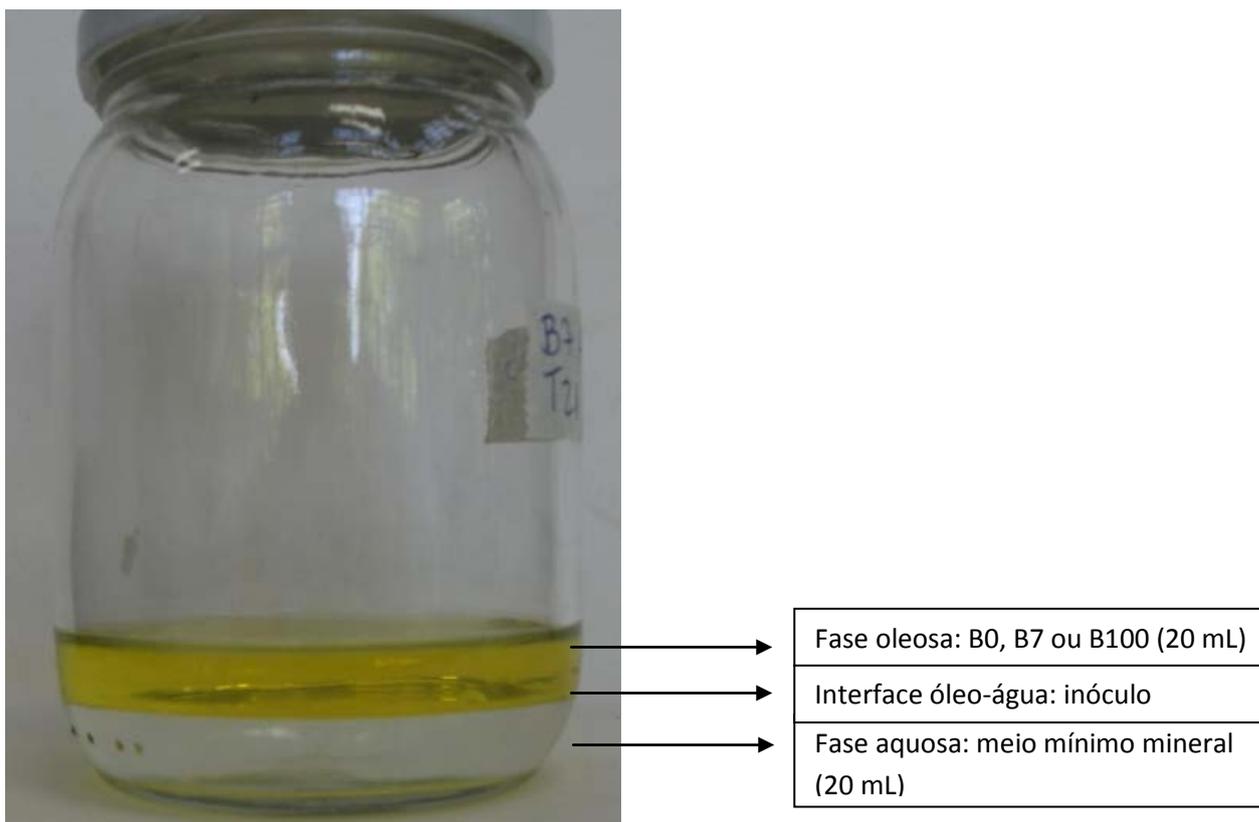


Figura 5: Frasco experimental (150 mL), contendo a fase aquosa e a fase oleosa do ensaio, na proporção de 1:1 v/v.

4.2.1.4 Curvas de crescimento de *Paecilomyces variotii*

A avaliação do crescimento do fungo filamentoso *P. variotii* (PV2) foi realizada nas condições descritas na seção 4.2.1.3. A padronização do inóculo foi realizada inoculando-se o fungo em 10 tubos de ensaio com capacidade para 10 mL contendo 4 mL de Ágar Malte (**Anexo 9.1.2**), com posterior incubação em estufa a 28°C por 21 dias. Após esse período, nos tubos onde o fungo cresceu foram adicionados 2 mL de uma solução de Tween 80 a 0,01% e os tubos foram agitados levemente para liberar os esporos. O conteúdo de todos os tubos foi vertido em um frasco de vidro estéril e, em

seguida, foi feita a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Após a contagem, uma suspensão de esporos em meio mineral com concentração de 10^8 esporos/mL foi preparada (suspensão concentrada). Esta suspensão concentrada foi inicialmente deixada em estufa a 28°C por 24 horas sob agitação e posteriormente adicionada a cada frasco de cultivo, de modo a se obter as concentrações de 10^2 , 10^4 e 10^6 esporos por mL; nos frascos-controle não foi adicionado inóculo. Cada sistema contém 20 mL de fase aquosa e 20 mL de fase oleosa. Assim, para obter a concentração final de 10^6 esporos/mL, 400 μL da suspensão concentrada foi transferida com o uso de uma pipeta estéril em capela de fluxo laminar para o sistema, caracterizando uma diluição 1:100 (0,4 mL para 40 mL, diminuindo a concentração de 10^8 para 10^6 esporos/mL). Para obter a concentração final de 10^4 esporos/mL, foi feita uma diluição prévia de 1:100 da suspensão concentrada (levando a uma concentração de 10^6 esporos/mL) e desta diluição foi transferido 400 μL para o sistema, da mesma forma descrita anteriormente. Para a concentração final de 10^2 esporos/mL, foi feita uma diluição de 1:10000 a partir da suspensão concentrada e desta diluição foi transferido 400 μL da mesma forma como as anteriores. O experimento foi conduzido à temperatura ambiente, sendo registrada diariamente a temperatura média. As amostras foram avaliadas em batelada, nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 42 e 60 dias.

De acordo com Hill & Hill (1993) uma contagem de micro-organismos, para ser considerada como nível de contaminação leve, deve variar entre 10^3 e 10^4 leveduras/fungos filamentosos por mL de água de lastro, enquanto uma contagem de 10^4 a 10^6 leveduras/fungos filamentosos por mL

indica um alto nível de contaminação. Assim, um inóculo contendo 10^2 esporos/mL foi escolhido para representar um nível de contaminação normal ou tolerável, um inóculo com 10^4 esporos/mL para representar um nível baixo a moderado de contaminação e um inóculo com 10^6 esporos/mL para simular um alto nível de contaminação.

O crescimento do micro-organismo foi avaliado através da biomassa formada na interface óleo-água. A biomassa fúngica foi quantificada através da técnica do peso seco (**Anexo 9.2**). Após a separação das fases aquosa e oleosa de cada frasco, com o auxílio de um funil de separação, a biomassa formada foi retida em discos de papel-filtro, previamente pesados. Para a remoção do excesso de óleo, foram utilizados 4 mL de hexano sobre cada disco. Os discos foram colocados em estufa a 50°C, durante 4 dias, para remoção da umidade, e da estufa foram transferidos diretamente para um dessecador, de onde foram retirados somente para a pesagem.

4.2.2 Detecção de *Paecilomyces variotii* contaminante por PCR

Para avaliar qual a quantidade, em massa, de fungo contaminante que é necessária para que seja detectável por PCR, e que tempo é necessário para que um determinado número de esporos se desenvolva a ponto de tornar-se detectável por PCR, dois experimentos foram conduzidos simultaneamente. Ao mesmo tempo em que a biomassa foi quantificada nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 42 e 60 dias (conforme descrito em **4.2.1.4**), nestes mesmos períodos foi realizada a técnica de PCR em cada amostra para verificar se a contaminação

encontrava-se detectável ou não. As amostras utilizadas para testar detecção por PCR foram preparadas em triplicata, em repetições não destrutivas.

A extração de DNA foi procedida retirando-se uma alíquota de 0,5 mL da fase aquosa, após agitação prévia do frasco. As alíquotas foram colocadas em tubos tipo eppendorf (com capacidade para 1,5 mL), e centrifugadas a 11.400 g por 10 minutos em uma centrifuga Eppendorf Minispin. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e os tubos foram deixados abertos por duas horas em uma estufa a 50°C para secagem total do sedimento. Em seguida, o sedimento foi triturado com um pistilo por 1 minuto. A partir desta etapa, o DNA foi extraído de acordo com Ferreira & Grattapaglia (1996) conforme descrito em **4.1.2**.

Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas à PCR sob as condições descritas em **4.1**, e em seguida o produto da PCR foi analisado conforme descrito em **4.1.6**.

4.3 Análise estatística

A análise estatística dos dados referentes aos valores da biomassa, obtidos durante as curvas de crescimento do micro-organismo, foi realizada com o uso do programa Assistat (versão 7.4). Constou da análise de variância (ANOVA) e foi complementada pelo teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância, para verificar diferenças entre os diferentes tratamentos, nos tempos avaliados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curvas de crescimento de *Paecilomyces variotii* em misturas de diesel e biodiesel

O experimento foi conduzido durante o período de 28 de outubro a 26 de dezembro de 2011, com os frascos deixados à temperatura ambiente por todo o período. Durante este período a temperatura mínima foi de 16°C e a máxima de 30°C, com a temperatura média oscilando entre 20 e 24°C.

O crescimento de *P. variotii* em diesel puro (B0), biodiesel B7 e biodiesel puro (B100) com diferentes concentrações de inóculo, durante um período de 60 dias, é mostrado nos **Anexos 9.3, 9.4 e 9.5** e nas **Figuras 6, 7 e 8**.

A medida da biomassa através da metodologia do peso seco tem sido utilizada para se determinar o crescimento de micro-organismos capazes de utilizar diesel e biodiesel como fonte de carbono e energia em condições que simulam o armazenamento. Esta metodologia foi usada por Bento *et al.* (2005) para acompanhar o crescimento de *Aspergillus fumigatus* na interface óleo-água em experimentos de degradação de óleo diesel. Em 2007, Miranda *et al.* avaliaram o potencial de degradação de óleo diesel de *Candida ernobii* e *Rhodotorula aurantiaca* em experimento com meio mineral e 12% de óleo

diesel e estimaram a biomassa pelo método do peso seco. Mais recentemente, Bucker *et al.* (2011) também utilizaram este método para avaliar o efeito da adição de diferentes proporções de biodiesel derivado da soja ao óleo diesel, no crescimento de fungos deteriorogênicos.

Na avaliação do crescimento do *P. variotii* em diesel puro (B0), biodiesel B7 e biodiesel puro (B100), foi possível verificar o crescimento do fungo (**Anexos 9.3, 9.4 e 9.5**) já nos primeiros sete dias do período de experimento, independentemente da carga de micro-organismos inoculada ou do tipo de combustível utilizado. Nos combustíveis B0 e B7, entretanto, apenas o inóculo 10^6 apresentou desenvolvimento significativo ($p < 0,05$) neste período, enquanto no B100 todos os inóculos apresentaram crescimento significativo nos primeiros sete dias. Este resultado difere de Bucker *et al.* (2011), que não encontrou crescimento significativo de *P. variotii* em B0. O resultado encontrado por Bucker está relacionado a uma fase de adaptação às condições de crescimento, uma vez que o inóculo foi preparado em ágar malte, um meio rico, e imediatamente inoculado nos frascos experimentais. O desenvolvimento de *P. variotii* em B0 observado no presente estudo, por sua vez, pode estar relacionado à ausência da fase de adaptação que pode ter sido evitada pelo período de incubação prévio (24 horas a 28°C) do pré-inóculo.

Aos 14 dias de experimento, o inóculo 10^4 desenvolveu biomassa significativa em B7, o que não ocorreu com B0. Apenas aos 21 dias de experimento os inóculos 10^2 e 10^4 passaram a formar uma biomassa significativa em B0, ao mesmo tempo em que 10^2 formou biomassa significativa em B7. Isto mostra que, assim como em experimentos anteriores (Bucker *et al.*

(2011), o *P. variotii* desenvolve-se mais lentamente conforme diminui o teor de biodiesel nas amostras.

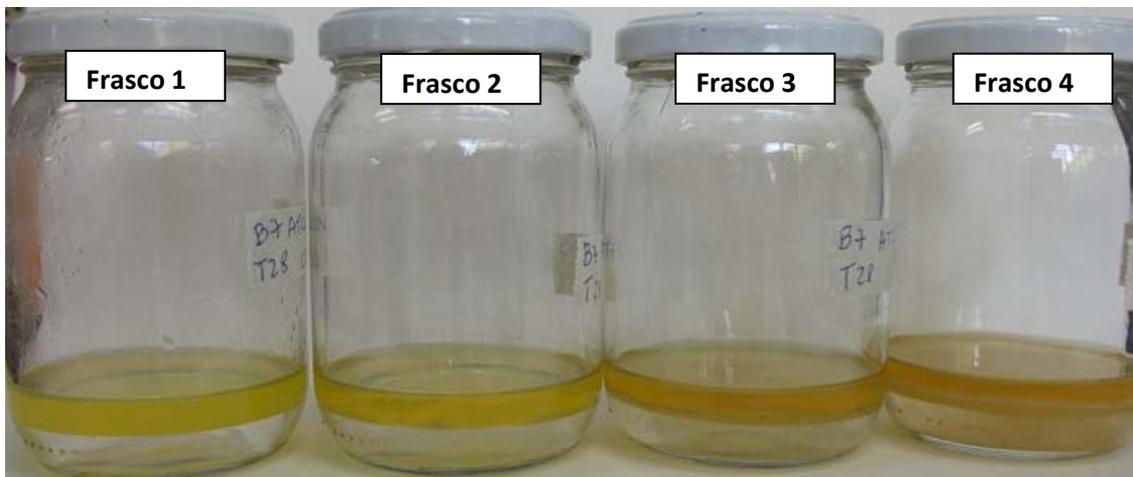


Figura 6: Frascos experimentais (150 mL), contendo a fase aquosa e a fase oleosa (B7) após um período de 28 dias. Frasco 1: controle (sem inóculo); Frasco 2: 10^2 esporos/mL; Frasco 3: 10^4 esporos/mL; Frasco 4: 10^6 esporos/mL.

Ao final do período de sessenta dias foi possível observar (**Figuras 7, 8 e 9**) que em B7 e B100, houve desenvolvimento do *P. variotii* muito superior àquele ocorrido em B0, independentemente da quantidade de micro-organismos inoculados. Comparando o desenvolvimento dos inóculos 10^4 e 10^6 nos diferentes tipos de combustíveis (**Figuras 8 e 9**) não houve diferença significativa entre B7 e B100, porém houve entre estes e B0 no fim do experimento. Isto confirma a tendência observada no início deste experimento de um crescimento mais acentuado conforme aumenta o teor de biodiesel nas amostras.

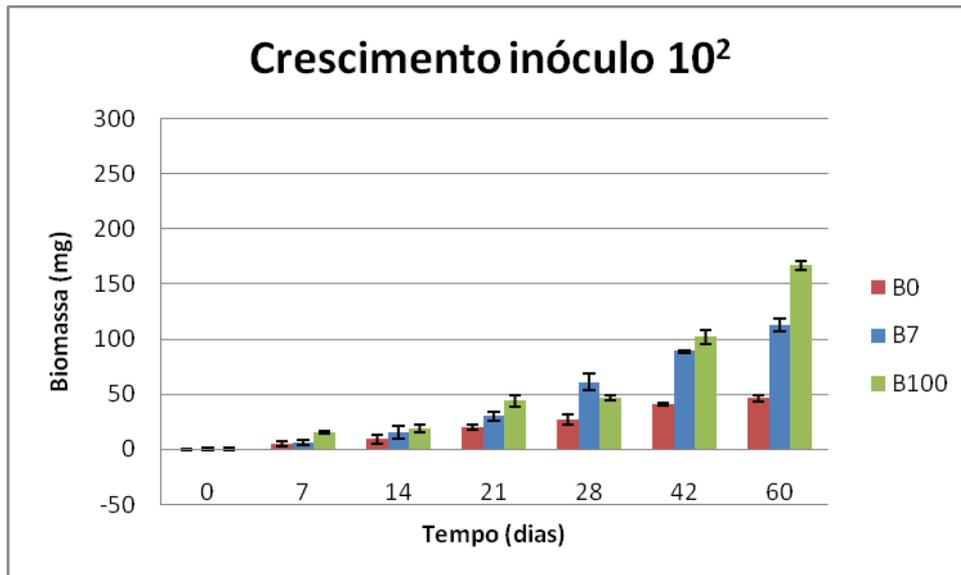


Figura 7: Evolução do desenvolvimento de *P. variotii* a partir de um inóculo contendo 10² esporos/mL em diesel/biodiesel durante um período de 60 dias. Cada ponto da curva representa uma média de três determinações.

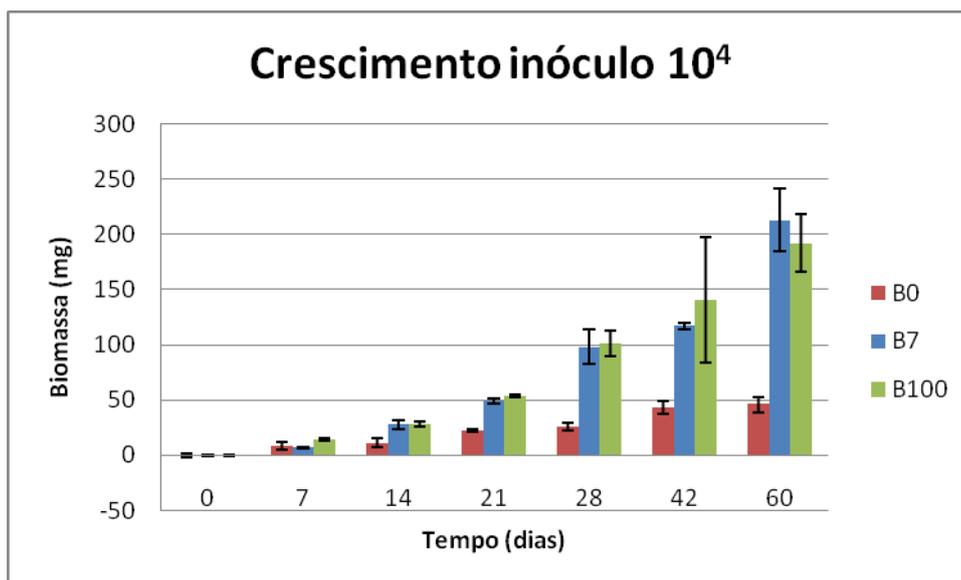


Figura 8: Evolução do desenvolvimento de *P. variotii* a partir de um inóculo contendo 10⁴ esporos/mL em diesel/biodiesel durante um período de 60 dias. Cada ponto da curva representa uma média de três determinações.

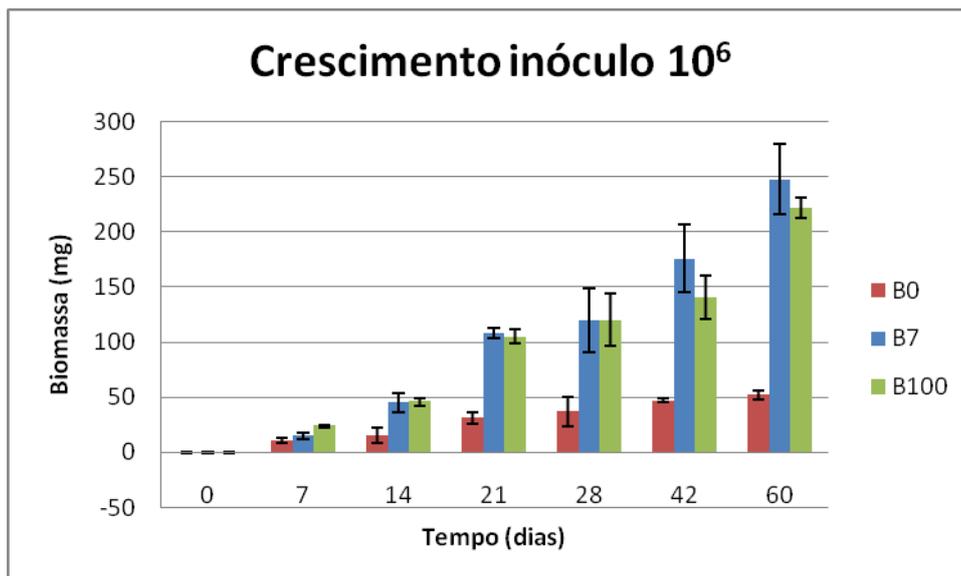


Figura 9: Evolução do desenvolvimento de *P. variotii* a partir de um inóculo contendo 10^6 esporos/mL em diesel/biodiesel durante um período de 60 dias. Cada ponto da curva representa uma média de três determinações.

Analisando a **Figura 10** pode-se observar melhor que, em B0, *P. variotii* desenvolve-se pouco quando comparado com o desenvolvimento em B7 e B100 (**Figuras 11 e 12**) e que há pouca diferença de crescimento entre os inóculos. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Bucker *et al.* (2011), onde não houve crescimento significativo em óleo diesel.

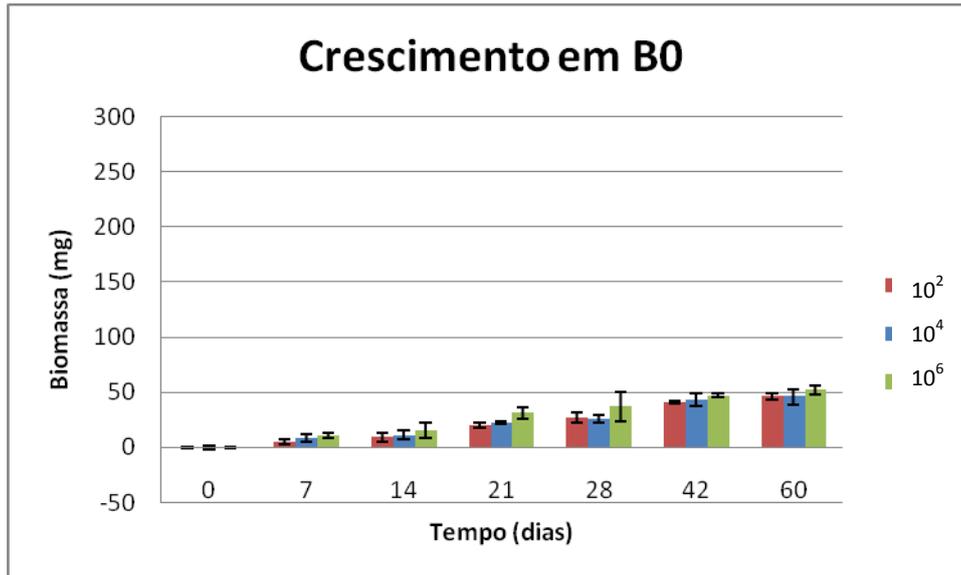


Figura 10: Evolução do desenvolvimento de *P. variotii* em B0 com quantidades crescentes de micro-organismos inoculados (10^2 , 10^4 e 10^6 esporos/mL). Cada ponto da curva representa uma média de três determinações.

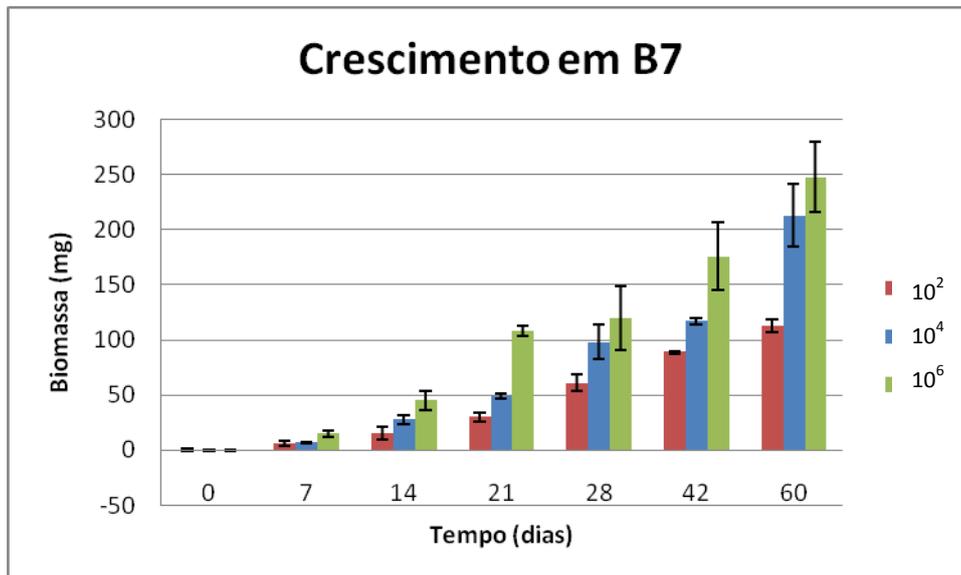


Figura 11: Evolução do desenvolvimento de *P. variotii* em B7 com quantidades crescentes de micro-organismos inoculados (10^2 , 10^4 e 10^6 esporos/mL). Cada ponto da curva representa uma média de três determinações.

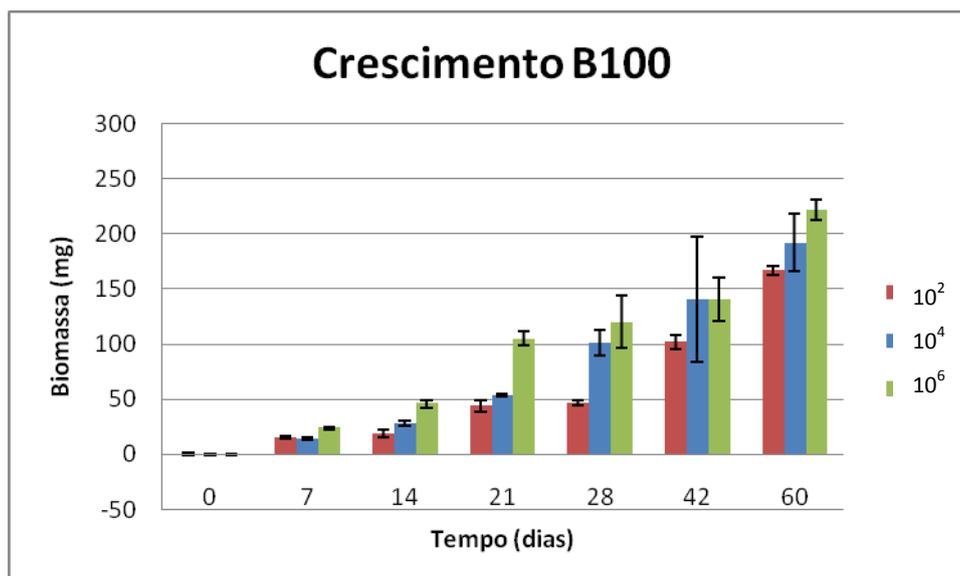


Figura 12: Evolução do desenvolvimento de *P. variotii* em B100 com quantidades crescentes de micro-organismos inoculados (10^2 , 10^4 e 10^6 esporos/mL). Cada ponto da curva representa uma média de três determinações.

5.2 Extração de DNA

O DNA de *P. variotii* extraído a partir do micélio cultivado foi avaliado através da visualização em gel, conforme a **Figura 13**. A imagem apresenta bandas bem definidas mostrando que a extração forneceu uma concentração aceitável de DNA para uso em PCR. Devido à possibilidade da presença de RNA no extrato as amostras foram tratadas com RNase (conforme descrito em **4.1.2**), assegurando a ausência de bandas características de RNA.

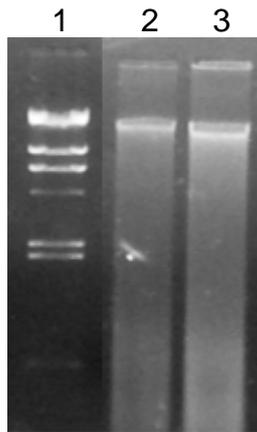


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultra-violeta, para avaliar a qualidade do DNA extraído de micélio para posterior uso em PCR. Coluna 1: marcador Lambda/Hind III (0,1 µg/µL); Coluna 2: *P. variotii* cepa ATCC 16023; Coluna 3: *P. variotii* isolado de biodiesel.

Através do equipamento Kodak Digital Science (Kodak DC 120) e com o uso do software Kodak 1D 3.5 (KODAK), foi possível determinar a concentração de DNA no extrato. Assim, foram obtidas as concentrações de 16 ng/µL de DNA de *P. variotii* cepa ATCC e 18 ng/µL de DNA de *P. variotii* isolado de biodiesel.

Com o objetivo de determinar qual a quantidade mínima de DNA extraído de esporos que pode ser detectada, foi feita uma diluição seriada de esporos em água, de forma a se obter as suspensões dos esporos nas quantidades de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos/mL de água. Após essas amostras passarem pelo processo de extração descrito em **4.1.2**, foram submetidas à eletroforese, sendo o resultado mostrado na **Figura 14**.

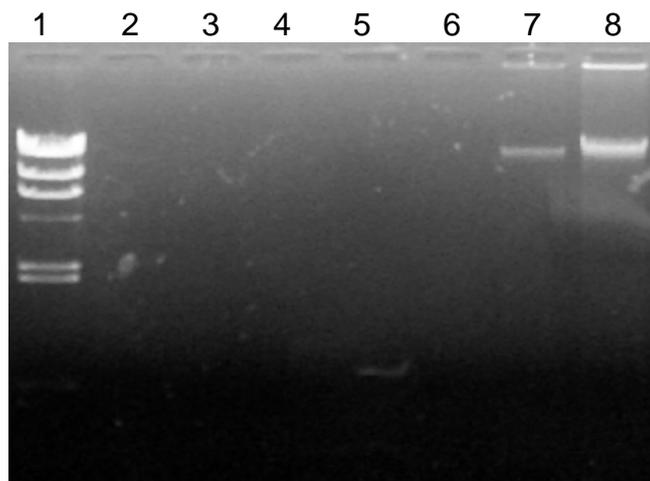


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, para avaliar a quantidade de DNA extraído de cada ponto das diluições. Coluna 1: marcador Lambda/Hind III (0,1 µg/µL); Coluna 2: 10^2 esporos/mL; Coluna 3: 10^3 esporos/mL; Coluna 4: 10^4 esporos/mL; Coluna 5: 10^5 esporos/mL; Coluna 6: 10^6 esporos/mL; Coluna 7: 10^7 esporos/mL; Coluna 8: 10^8 esporos/mL.

O DNA total extraído das diluições de esporos foi quantificado utilizando-se o equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (INVITROGEN) e os resultados podem ser visualizados na **Tabela 3**. Por meio da extração e posterior processo de eletroforese (**Figura 14**), foi possível visualizar apenas bandas nas colunas referentes às concentrações mais altas, de 10^7 e 10^8 esporos/mL. As extrações efetuadas nas diluições com concentrações de 10^6 esporos/mL e inferiores não apresentaram concentrações de DNA suficientes para visualização nessas condições. Entretanto essas mesmas amostras, quando submetidas à PCR, mostraram produtos em quantidade suficiente para visualização mesmo em concentrações mais baixas, conforme mostra a **Figura 15**. Nesta imagem pode-se ver que apenas a PCR efetuada na amostra contendo 10^2 esporos/mL não gerou produto suficiente para visualização por eletroforese, evidenciando que 10^3 esporos/mL, com concentração correspondente de 0,0144 ng/µL, é a quantidade mínima de DNA detectável

através deste procedimento. A quantidade mínima detectável de esporos é inferior à encontrada por Ruiz *et al.* (2011), que conseguiram determinar os níveis de bactérias e fungos em uma faixa de 10^4 a 10^{12} células/mL. Entretanto, o trabalho de Ruiz utilizou qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*), o fungo filamentoso *Hormoconis resinae* e diversas bactérias.

Tabela 3. Quantificação de DNA extraído de suspensões de esporos em concentrações crescentes utilizando-se Qubit 2.0 Fluorometer.

Conc. de esporos (esporos/mL)	Conc. de DNA (ng/ μ L)
10^2	0,0124
10^3	0,0144
10^4	0,0172
10^5	0,0556
10^6	0,0860
10^7	6,4200
10^8	60,120

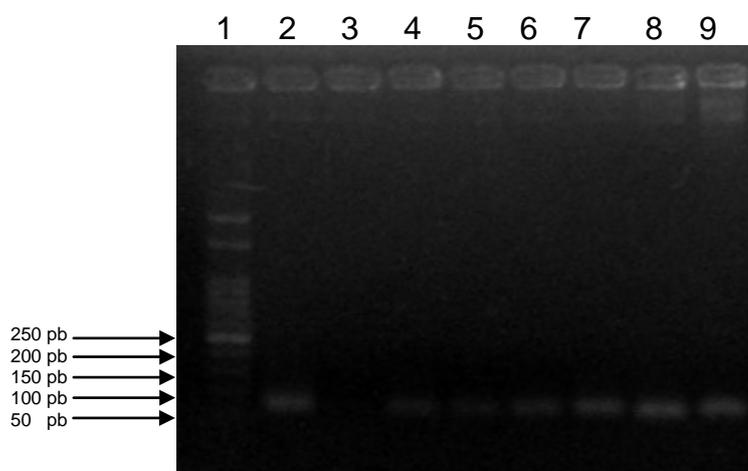


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, para avaliar a concentração de produtos de PCR obtidos a partir de DNA extraído de suspensões de esporos em concentrações crescentes. Coluna 1: ladder 50 pares de bases; Coluna 2: controle positivo (10 ng de DNA molde); Coluna 3: 10^2 esporos/mL; Coluna 4: 10^3 esporos/mL; Coluna 5: 10^4 esporos/mL; Coluna 6: 10^5 esporos/mL; Coluna 7: 10^6 esporos/mL; Coluna 8: 10^7 esporos/mL; Coluna 9: 10^8 esporos/mL.

5.3 Padronização e análise dos produtos de PCR

A padronização de uma técnica de biologia molecular *in house* permite aos pesquisadores adaptarem várias reações aos recursos disponíveis em cada laboratório bem como a determinadas condições da rotina laboratorial.

De modo a garantir que as técnicas de PCR alcancem elevados níveis de sensibilidade e especificidade o protocolo deve ser padronizado de modo a evitar problemas de execução tais como o aparecimento de produtos inespecíficos, ausência de bandas na visualização do gel, contaminações e impureza nas amostras (Vieira *et al.*, 2002).

De longa data os pesquisadores já vem discutindo sobre a importância dos reagentes e das condições de reação da PCR (Ausubel *et al.*, 1994). As principais condições que influenciam o desempenho de uma reação de PCR são o desenho e concentração dos *primers*, as concentrações dos diferentes reagentes, em especial o tampão, desoxinucleotídeos (dNTPs) e o cloreto de magnésio ($MgCl_2$), o número de ciclos, as temperaturas de desnaturação e anelamento e a adição de co-solventes (Henegariu *et al.*, 1997).

A partir do procedimento descrito por Haugland *et al.* (2004) foram realizadas modificações nas condições de reação da PCR, visando uma adaptação para o método proposto neste trabalho. Foram feitas curvas de concentração de cloreto de magnésio, *primers* e dNTPs. Também foram testadas as temperaturas de anelamento e extensão de 56°C, 58°C, 60°C, 62°C e 64°C; para as reações foram usados 10 ng de DNA molde em cada reação.

O cloreto de magnésio funciona como cofator da enzima DNA polimerase podendo afetar as temperaturas de desnaturação das fitas de DNA e o anelamento dos *primers*. Além disso, altas concentrações desse reagente podem ser responsáveis pelo aparecimento de produtos inespecíficos formados pelo aumento excessivo da atividade enzimática e pela formação de dímeros de *primers*. A **Figura 16** mostra o resultado do teste referente à curva de concentração de cloreto de magnésio onde as bandas apresentam uma intensidade semelhante entre si, apesar da concentração crescente deste reagente. Com base neste resultado, foi escolhida a quantidade de 0,1 mM de cloreto de magnésio por reação para dar continuidade aos testes. Nesta figura é importante também observar que o fragmento amplificado situa-se entre os fragmentos de 50 e 100 pares de bases e pode ser observado em outras figuras, como nas **Figuras 17 e 18**. Isto sugere que o fragmento amplificado corresponde ao fragmento alvo deste trabalho, pois possui 73 pares de bases, situando-se muito próximo da zona central (que é de 75 pares de bases) entre 50 e 100 pares de bases.

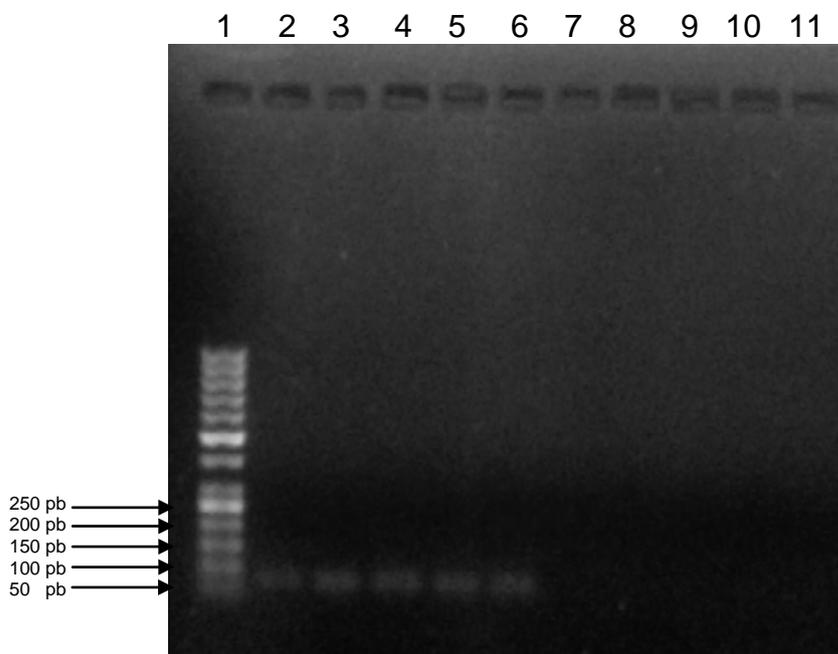


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, para avaliar o efeito de uma quantidade crescente de $MgCl_2$ na intensidade das bandas. Coluna 1: ladder 50 pares de bases; Colunas 2 a 6: $MgCl_2$ nas concentrações 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 μM por reação; Colunas 7 a 11: $MgCl_2$ nas concentrações 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 e 0,25 μM por reação, porém sem DNA molde (controle).

Na **Figura 17** pode-se observar o efeito que a diferença na quantidade de *primers* causa na reação. Com 12,5 pmoles de cada um dos *primers* por reação, apenas a banda alvo é visualizada. Com 25, 37,5, 50 e 62,5 pmoles de cada *primer* por reação, bandas inespecíficas já podem ser vistas; portanto para a visualização da banda alvo sem interferência de bandas inespecíficas a quantidade ideal de *primers* é 12,5 pmoles de cada *primer*. O mesmo resultado foi encontrado por Vieira *et al.* (2008), que testou uma faixa de 0,5 a 25 pmoles de cada *primer* (em um estudo com *Canis lupus familiaris*)

encontrando 12,5 pmoles como a quantidade ideal de cada *primer* a ser utilizada.

Os desoxinucleotídeos são fundamentais para a construção das novas cadeias a cada ciclo da PCR e devem estar presentes em iguais concentrações. Elevadas concentrações deste reagente podem afetar a especificidade dos *primers*. As concentrações de dNTPs testadas, no entanto, conforme visto na **Figura 17** levaram ao surgimento de bandas com intensidade semelhante entre si e sem bandas inespecíficas.

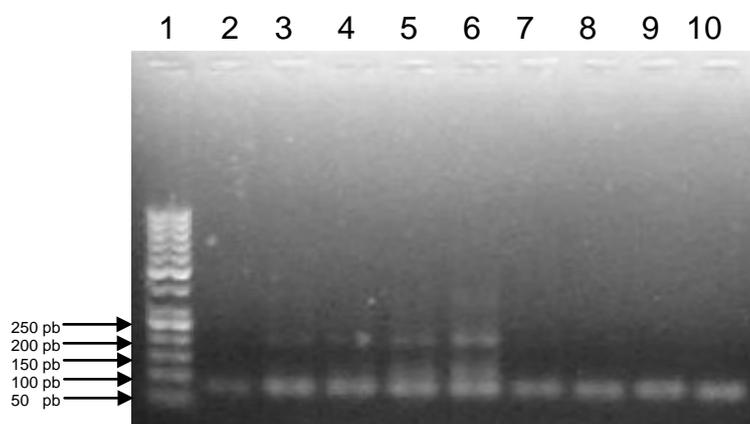


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, para avaliar o efeito de quantidades crescentes de *primers* e dNTPs na intensidade das bandas. Coluna 1: ladder 50 pares de bases; Colunas 2 a 6: *primers* nas quantidades de 12,5, 25, 37,5, 50 e 62,5 pmoles de cada *primer* por reação; Colunas 7 a 10: dNTPs nas quantidades de 50, 100, 150 e 200 µM de cada dNTP por reação.

As concentrações de cloreto de magnésio e de dNTPs testadas, conforme visto nas **Figuras 16 e 17**, não levaram a diferenças na intensidade das bandas; a concentração de *primers* que gerou apenas uma banda, sem o surgimento de bandas inespecíficas, foi 12,5 pmoles por reação. As bandas inespecíficas apresentadas nas colunas 3, 4, 5 e 6 podem ser dímeros de *primers* formados como consequência da sua alta concentração ou ainda

anelamento em posições indesejadas no DNA molde, também causado por excesso de *primers*. Com base nesses resultados, foram escolhidas as quantidades de 12,5 pmoles de cada *primer*, 1,0 μM de cloreto de magnésio e 50 μM de cada dNTP para testar diferentes temperaturas para anelamento e extensão. A **Figura 18** mostra que à temperatura de 56°C a banda referente ao fragmento amplificado é mais intensa sendo esta, portanto, a temperatura mais apropriada para a reação.

A especificidade dos *primers* a 56°C foi testada frente a *Pseudallescheria boydii* e *Aspergillus fumigatus*, em comparação com *P. variotii*. *P. boydii* e *A. fumigatus*, assim como *P. variotii*, também são fungos filamentosos e da mesma forma que *P. variotii*, também podem contaminar tanques de armazenagem de biodiesel e desenvolver-se nesse ambiente (Gaylarde *et al.*, 1999). A **Figura 19** mostra ausência de bandas na região onde está localizado o fragmento amplificado do *P. variotii*, mostrando que os *primers* utilizados, apesar de levarem à formação de bandas quando em contato com DNA de *P. boydii* e *A. fumigatus*, não amplificam fragmento na região do *P. variotii*. Resultado semelhante foi encontrado por Haugland *et al.* (2004), que também não observou reações inespecíficas utilizando estes *primers*.

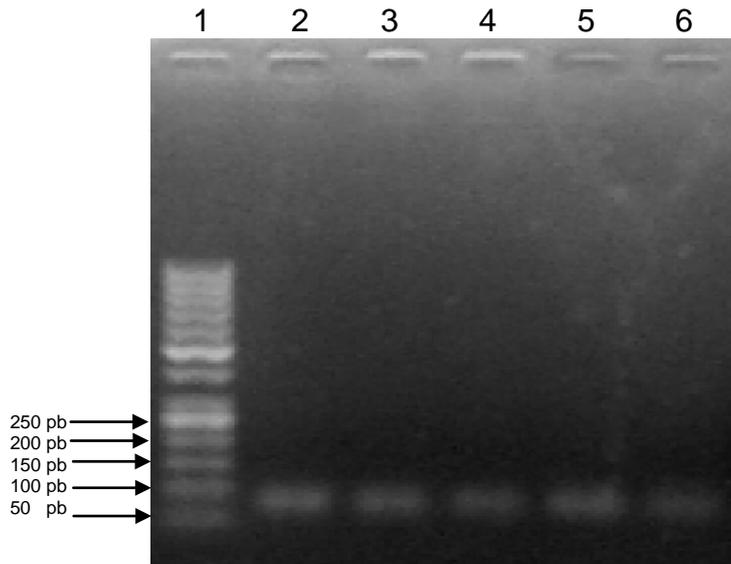


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, para avaliar o efeito da temperatura na intensidade das bandas. Coluna 1: ladder 50 pares de bases; Coluna 2: reação com temperatura de anelamento e extensão de 56°C; Coluna 3: temperatura de anelamento e extensão de 58°C; Coluna 4: temperatura de anelamento e extensão de 60°C; Coluna 5: temperatura de anelamento e extensão de 62°C; Coluna 6: temperatura de anelamento e extensão de 64°C.

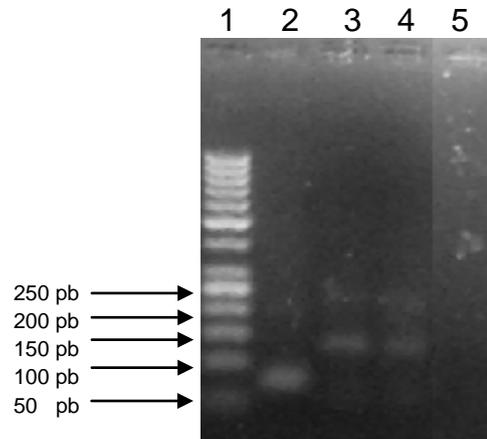


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, para avaliar a especificidade dos *primers*. Coluna 1: ladder 50 pares de bases; Coluna 2: *P. variotii*; Coluna 3: *P. boydii*; Coluna 4: *A. fumigatus*; Coluna 5: controle de reação.

5.4 Detecção de *Paecilomyces variotii* por PCR

Durante os períodos de 7, 14, 21, 28, 42 e 60 dias, bem como no primeiro dia do experimento (tempo 0), foi retirada uma alíquota da fase aquosa do sistema; esta alíquota passou por um processo de extração de DNA, conforme descrito em 4.2.2, com posterior análise por PCR e eletroforese em gel de agarose para detecção do micro-organismo.

As Figuras 20, 21 e 22 mostram o resultado dos procedimentos nos três tipos de combustíveis testados no primeiro dia do experimento (tempo 0). A ausência de bandas nas colunas-teste (colunas 3 a 11) representa um nível indetectável de amplificação a partir do DNA extraído de *P. variotii* pelo método testado.

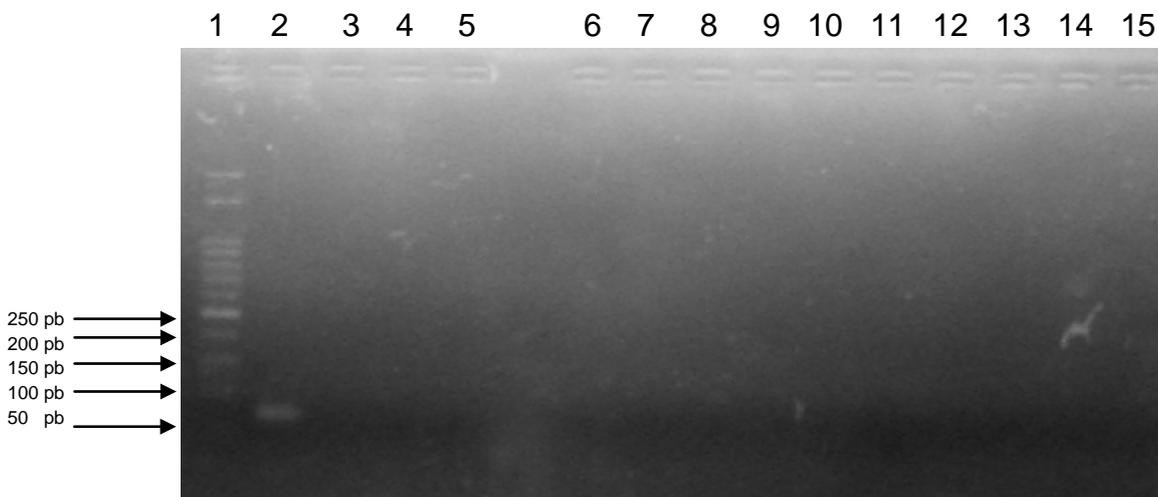


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, para detectar *P. variotii* em **B0** no tempo **0**. Coluna 1: ladder 50 pares de bases; Coluna 2: controle positivo (10 ng de DNA molde de *P. variotii*); Colunas 3 a 5: frascos contendo 10^2 esporos/mL; Colunas 6 a 8: frascos contendo 10^4 esporos/mL; Colunas 9 a 11: frascos contendo 10^6 esporos/mL; Colunas 12 a 14: frascos controle (sem inóculo); Coluna 15: controle de reação.

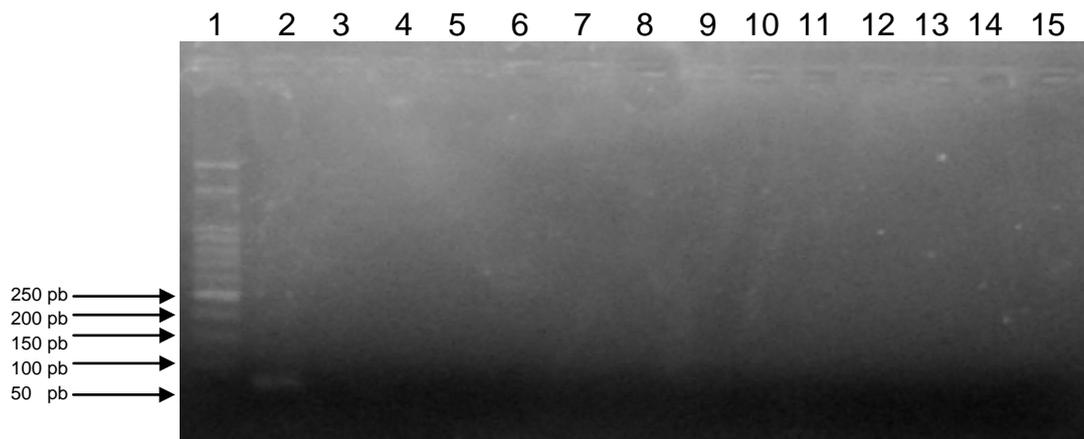


Figura 21: Eletroforese em gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, para detectar *P. variotii* em **B7** no tempo **0**. Coluna 1: ladder 50 pares de bases; Coluna 2: controle positivo (10 ng de DNA molde de *P. variotii*); Colunas 3 a 5: frascos contendo 10^2 esporos/mL; Colunas 6 a 8: frascos contendo 10^4 esporos/mL; Colunas 9 a 11: frascos contendo 10^6 esporos/mL; Colunas 12 a 14: frascos controle (sem inóculo); Coluna 15: controle de reação.

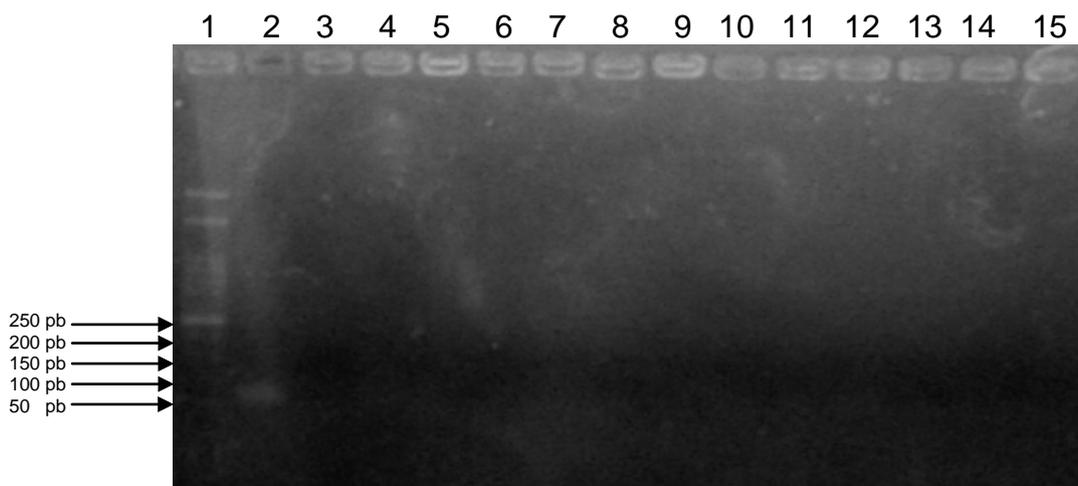


Figura 22: Eletroforese em gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, para detectar *P. variotii* em **B100** no tempo **0**. Coluna 1: ladder 50 pares de bases; Coluna 2: controle positivo (10 ng de DNA molde de *P. variotii*); Colunas 3 a 5: frascos contendo 10^2 esporos/mL; Colunas 6 a 8: frascos contendo 10^4 esporos/mL; Colunas 9 a 11: frascos contendo 10^6 esporos/mL; Colunas 12 a 14: frascos controle (sem inóculo); Coluna 15: controle de reação.

Aos 28 dias do experimento o micro-organismo já havia formado uma biomassa de mais de 30 mg com o inóculo contendo 10^6 esporos/mL em B0 (**Anexo 9.3**); em B7 e B100 o inóculo com a mesma quantidade de esporos já havia levado à formação de uma biomassa de 120 mg (**Anexos 9.4 e 9.5**).

Mesmo assim, nas condições utilizadas neste estudo a técnica de PCR mostrou-se ineficaz para detectar o fungo em quaisquer dessas situações.

Ao final dos experimentos todos os inóculos utilizados em B0 já haviam desenvolvido uma biomassa superior a 40 mg, enquanto em B7 e B100 todos os inóculos já haviam levado à formação de biomassa superior a 100 mg. O inóculo contendo 10^6 esporos/mL, neste ponto, já havia formado mais de 200 mg de biomassa; ainda assim não foi possível visualizar as bandas referentes ao micro-organismo em quaisquer tipos de combustível, independentemente da quantidade de esporos inoculada e da biomassa formada.

A alta sensibilidade da técnica de PCR tem sido historicamente uma das principais vantagens do método. A ausência de bandas nos géis referentes às amostras processadas principalmente quando a biomassa já atingia altas concentrações, evidencia uma dificuldade a ser superada. As possibilidades mais prováveis são interferência do meio (diesel/biodiesel) na reação de PCR ou uma ineficaz extração de DNA das alíquotas retiradas para análise.

Sugere-se que durante a extração de DNA uma pequena fração de combustível tenha ficado aderida ao ácido nucléico interferindo na reação de PCR, inibindo-a. O processo de extração de DNA não conta com um procedimento específico para remoção deste tipo de interferente, podendo ocasionar problemas em etapas posteriores.

Ao final dos experimentos, não tendo sido possível detectar o micro-organismo nas amostras, outros métodos de extração foram testados: foram utilizadas pérolas de vidro com agitação (*bead beating*), ultrassom,

homogeneizador de tecidos, congelamento com nitrogênio líquido e, por fim, choque térmico com banho termostático fervente e nitrogênio líquido, tudo com o objetivo de romper as estruturas fúngicas para extração do DNA, porém sem sucesso. Ruiz *et al.* (2011) obteve sucesso extraindo DNA fúngico de um sistema contendo 50% meio mineral e 50% combustível de aviação, porém o micro-organismo utilizado em seu experimento foi *Hormoconis resiniae*. Costa (2008) testou 4 tipos de extração de DNA em óleo, inclusive utilizando CTAB, e obteve sucesso apenas em apenas um deles com uso do kit comercial *Nucleospin food kit*.

É possível também que o combustível tenha atuado como lubrificante na etapa de maceração do centrifugado com pistilo, “lubrificando” as estruturas fúngicas prejudicando o atrito do pistilo que deveria romper esporos e micélio. Por isso foram feitas tentativas de remover esse diesel/biodiesel adicionando-se uma etapa de lavagem com o tampão CTAB, que atua como detergente, logo após centrifugar a alíquota recém retirada do frasco de amostra. Foi utilizado também papel-filtro para absorver o combustível residual durante a etapa de secagem a 50°C e, por fim, foi utilizado o kit comercial Power Soil (MO BIO Laboratories), porém todas tentativas sem sucesso.

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento significativo de biomassa em todos os combustíveis testados (B0, B7 e B100) demonstra a capacidade do *P. variotii* de se desenvolver nestas condições. Os altos valores de biomassa formada pelo crescimento em B7 e B100 refletem a afinidade do micro-organismo por biodiesel, sugerindo que a presença de biodiesel nas misturas testadas aumenta a suscetibilidade do combustível à contaminação e crescimento microbiano.

Foi possível desenvolver um protocolo para realização de uma PCR sensível e específica para detectar o fungo filamentosso *P. variotii*, quando foi feita uma diluição seriada de esporos em água. A concentração mínima de DNA detectável foi a extraída de 10^3 esporos/mL, correspondendo a 0,0144 ng/ μ L.

7. PERSPECTIVAS

Testar outras formas de extração do DNA da biomassa retirada de misturas diesel/biodiesel, na tentativa de remover todo o combustível residual durante a extração de DNA para evitar uma possível interferência durante a PCR, testando kits comerciais (por exemplo, *Nucleospin food kit*).

Padronizar a técnica de *real time* PCR para detectar e quantificar *P. variotii*, possibilitando a classificação do nível de contaminação da amostra através da quantificação dos micro-organismos.

Desenvolver uma técnica de PCR multiplex para detectar outros micro-organismos contaminantes que podem estar presentes em tanques de armazenagem.

Desenvolver um método imunológico para detecção deste fungo, como por exemplo, imunocromatografia por ser de mais fácil e rápida execução.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP).
Portaria nº 255 ANP, 2003.

ARRIEL, N.H.C.; UNÊDA-TREVISOLI, S.H.; CAPELATO, A.; DI MAURO, S.M.Z.; DI MAURO, A.O. Análise comparativa de quatro protocolos de extração de DNA genômico em *Sesamum indicum*. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.6, p. 525-535, 2002.

ATKINS, S.D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a minireview. **J Appl Genet.** 45:3-15. 2004.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiol. Rev.** 45:180–209, 1981.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. "The Polimerase Chain Reaction", p.15.1.1-15.1.4. Em: Janssen, K. "Current Protocols in Molecular Biology", vol 2. Greene Publishing Associates and John Wiley & sons. New York, 1994.

BAILEY, C.A.; MAI, M.E. Evaluation of microbiological test kits for hydrocarbon fuel systems. **Appl. Environ. Microbiol.** 37:871-877, 1979.

BARNETT, H.H. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 2. Ed. Burgess Publishing Company, 1960, 225 p.

BENTO, F.M.; GAYLARDE, C.C. Microbial contamination of stored diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 3, p. 71-75. 1996.

BENTO, F.M. *et al.* Micro-organismos e o armazenamento de óleo diesel. **Revista Petro & Química**, Rio de Janeiro, v.211, p. 70-77, 1999.

BENTO, F. M.; GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 47, n.2, p. 107-112, 2001.

BENTO, F.M. *et al.* Degradation and corrosive activities off ungi in a diesel-mild steel-aqueous system. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Oxford, v.21, n.2, p.135-142, 2005.

BENTO, F.M. *et al.* Suscetibilidade do óleo diesel com 2 e 5% de biodiesel a contaminação microbiana durante a estocagem. **Revista Biodiesel**, São Paulo, v.4, p. 24-26, 2006.

BIODIESEL: Handling and Use Guidelines. U.S. Department of Energy Efficiency and Renewable Energy – DOE; GO – 102004 – 1999. Out. 2004, 60 p.

BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.119-130. 1999.

BRANDÃO, A.B.M., FUCHS S.C., SILVA M.A.A., EMER L.F. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão de literatura. **Pan Am J Public Health** 2001;9(3):161-8.

BREUKER, M.; MC NAMARA, C.; YOUNG, L.; PERRY, T.; YOUNG, A.; MITCHELL, R. Fungal growth on synthetic cloth from Apollo space suits. **Ann. Microbiol.** 53:47-54. 2003.

BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N.A.; ROESCH, L.F.; JACQUES, R.J.S.; PERALBA, M.C.R; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration and Biodegradation** v.65, n.1, p.172–178, 2011.

BUSH, U; NITSCHKO, H. Methods for differentiation of microorganisms. **Journal of Chromatography**, v.722, p.263-278. 1999.

CHESNEAU, H.L. The silent fuel killers (Stability and Microbiologicals). In. **Proceedings of 2000 International Joint Power Generation Conference.** Miami Beach, Florida. Jul 23-26. p. 1-8. 2000.

CONIDIA BIOSCIENCES LTD. www.conidia.com Acessado em 03 de mar. 2012.

DOGGETT, M. S. Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system. **Appl. Environ. Microbiol.** 66:1249-1251, 2000.

ECHA MICROBIOLOGY. www.echamicrobiology.co.uk Acessado em 03 de mar. 2012.

EDMONDS, P.; COONEY, J.J.; Identification of Microorganisms Isolated from Jet Fuel Systems. **Appl. Environ. Microbiol.** 15:411-416, 1967.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2^a edição. Brasília: EmbrapaCenargen, 1996, PP. 220, Documento 20.

FUNDAÇÃO ANDRE TOSELLO. www.fat.com.br. Acessado em 03 de mar. 2012.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento** 3:12-16. 2000.

GAYLARDE, C.C.; BENTO, F.M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**. v.30, n.1, p. 1-10, 1999.

GERPEN, J.V. *et al.* **Biodiesel Analytical Methods**. National Renewable Energy Laboratory. Cole Boulevard, Golden, Colorado. Jul. 2004. 96 pg.

HAUGLAND, R.A.; VARMA, M.; WYMER, L.J.; VESPER, S.J. Quantitative PCR of Selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* Species. **Systematic and Applied Microbiology**. 27:198-210. 2004.

HAYNES, K. A., WESTERNENG, T. J., FELL, J. W. & MOENS, W. (1995). Detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. **J Med Vet Mycol** 33, 319-325, 1995.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, G.H.; VANCE, G.; VOGT, P.H."Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol". **Biotechniques**, 23:504-511; 1997.

HILL, E.C.; HILL, G.C. Microbiological problems in distilled fuels. **Trans. Inst. Marine Eng.**, 104: 119-130, 1993.

HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; RICO-MUNOZ, E.; JOHNSON, S.; SAMSON, R.A. Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssochlamys spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*). **Appl. Environ. Microbiol.** 74:1613-1619, 2008.

HOUBRAKEN, J.; VERWEIJ, P.E.; RIJS, A.J.; BORMAN, A.M.; SAMSON, R. A. Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings. **J. Clin. Microbiol.** 48:2754-61, 2010.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 1466p. 2001.

LIGNELL, U.; MEKLIN, T.; RINTALA, H.; HYVÄRINEN, A.; VEPSÄLÄINEN, A.; PEKKANEN, J.; NEVALAINEN, A.: Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage of the house. **Letters in Applied Microbiology**. 47:303-8. 2008.

LOPES, P.T.C; GAYLARDE, C.C. Use of immunofluorescence to detect *Hormoconis resinae* in aviation kerosine. **Internat. Biodeter. Biodeg.**, 37:37-40, 1996.

LUDWIG BIOTEC. www.ludwigbiotec.com.br. Acessado em 03 de mar. 2012.

MACEDO, G.A.; MACEDO, J.A. Biodiesel – Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 32, pg. 38-46. 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. in **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1983.

MARCHETTI, J.M.; MIGUEL V.U.; ERRAZU A.F. Possible Methods for Biodiesel Production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Colorado, v.11, n.6, p.1300 – 1311, 2007.

MARQUES, S.A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical and treatment update. **An Bras Dermatol** 2003; 78:135-150.

MIRANDA, R. C. *et al.* Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco – Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasil, v. 50, n. 1, p. 147-152, 2007.

MURUGESAN, A. *et al.* Biodiesel as an alternative fuel for diesel engines – A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Colorado, v.13, n.3, p.653 – 662, 2009, a.

MURUGESAN, A. *et al.* Production and analysis of biodiesel from non-edible oils – A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Colorado, v.13, n.4, p.825 – 834, 2009, b.

PASSMANN, F.; DOBRANIC, J.K. Relative Biodegradability of B100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: **International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, 9., Espanha, set. 18-22, 2005.

PIÁ, J.A. Perspectivas do Biodiesel no Brasil. **Indic. Econ. FEE**, Porto Alegre, v.30, n. 2, p.170-190, 2002.

RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.44, n. 2-3, p. 93-100, 1999.

ROBERTS, W.T.; DAVIDSON, P.M. Growth characteristics of selected fungi on polyvinyl chloride film. **Appl. Environ. Microbiol.** 54:99-103, 1986.

RUIZ, O.N.; BROWN, N.A. Advances in microbial mitigation of aviation fuels: characterization of the antimicrobial activity of DIEGME in fuel by quantitative Real-Time PCR. In: **Proceedings of the 12th International conference on stability, handling and use of liquid fuels**. Sarasota, Florida, EUA. 16-20 Outubro, 2011.

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. **Studies in Mycology** 6:1 –119, 1974.

SHARMA, Y.C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S.N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. **Fuel**, Nottingham, v.87, n.12, p.2355-2373, 2008.

SUGITA, T., NISHIKAWA, A., IKEDA, R., SHINODA, T. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. **J. Clin. Microbiol.** 37, 1985–1993, 1999.

VANITTANAKOM, N.; VANITTANAKOM, P.; HAY, R. J. Rapid identification of *Penicillium marneffe* by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene. **J. Clin. Microbiol.** 40:1739-1742. 2002.

VAZ, F. S. **Bactérias Degradadoras de Biodiesel, Diesel e Misturas em Tanques de Armazenamento.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2010.

VIEIRA, D.P. “Técnicas de PCR: Aplicações e padronização de reações”. 2002. Disponível em <<http://www.imt.usp.br/portal/stories/dmdocuments/aula2.pdf>>. Acessado em 03 mar. 2012.

VIEIRA, J.; TEIXEIRA, A.B.; NOGUEIRA, M.F.G. Especificidade e sensibilidade dos *primers* para seqüência genômica de β -actina na Reação em Cadeia da Polimerase para *Canis lupus familiaris* (2008). Disponível em <http://fio.edu.br/cic/anais/2008_vii_cic/Artigos/Ciencias_Biologicas/023-ESPECI.pdf>. Acessado em 03 de mar. 2012.

WHITE T.J., BRUN T., LEE S., TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, Em: **PCR Protocols. A guide to methods and applications.** (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds.). Academic Press, San Diego, USA: 315-320. 1990.

9. ANEXOS

9.1 Meios de cultura utilizados

9.1.1 Meio mínimo mineral

Macronutrientes

KCl	0,7 g/L			
KH ₂ PO ₄	2,0 g/L	ou	K ₂ HPO ₄	1,55 g/L
Na ₂ HPO ₄	3,0 g/L	ou	NaH ₂ PO ₄	2,9 g/L
NH ₄ NO ₃	1,0 g/L			

Micronutrientes

MgSO ₄	4,0 g/L
FeSO ₄	2,0 g/L
MnCl ₂	0,2 g/L
CaCl ₂	0,2 g/L

pH 7,2

9.1.2 Ágar malte

Extrato de malte	20 g/L
Ágar	15 g/L

pH 6,5

9.1.3 Caldo malte

Extrato de malte 20 g/L

pH 6,5

9.2 Peso seco

Curvas de crescimento com os fungos filamentosos

Cálculo para o acompanhamento do crescimento fúngico através da medida do peso seco em função do tempo de imersão no sistema fase aquosa/óleo diesel.

$$\text{Peso inicial} - \text{Peso final} = \text{Variação de massa (mg)}$$

A técnica utilizada de peso seco para o monitoramento do crescimento fúngico em sistemas com óleo diesel exige alguns cuidados que são brevemente apresentados. É importante a observação dos passos utilizados na obtenção do valor final da biomassa quantificada, pois alguns fatores podem interferir, tais como:

- Incorporação de frações de diesel á biomassa quantificada decorrente da composição do biodiesel, podendo ficar retida e causar desvios na determinação. Por esta razão, após a filtragem, a biomassa foi lavada com 15 mL de hexano.

- Dificuldade de homogeneização decorrente da existência, nas diversas etapas de cultivo, de frações de hidrocarbonetos não degradada ou degradada

parcialmente e da presença de longas hifas na fase oleosa e de conidiosporos na fase aquosa.

9.3 Tabela referente à curva de crescimento de *P. variotii* em B0

Crescimento de *P. variotii* em B0. O experimento foi realizado em triplicata. Os números representam a média das determinações da biomassa formada (em mg).

Inóculo	Tempo (dias)						
	0	7	14	21	28	42	60
	Biomassa formada (mg)						
10^2	0	5	9	20	27	41	46
10^4	0	8	11	22	26	43	46
10^6	0	11	15	31	37	47	52

9.4 Tabela referente à curva de crescimento de *P. variotii* em B7

Crescimento de *P. variotii* em B7. O experimento foi realizado em triplicata. Os números representam a média das determinações da biomassa formada (em mg).

Inóculo	Tempo (dias)						
	0	7	14	21	28	42	60
	Biomassa formada (mg)						
10^2	0	5	15	30	61	89	113
10^4	0	7	28	49	98	117	213
10^6	0	15	45	108	120	176	248

9.5 Tabela referente à curva de crescimento de *P. variotii* em B100

Crescimento de *P. variotii* em B100. O experimento foi realizado em triplicata. Os números representam a média das determinações da biomassa formada (em mg).

Inóculo	Tempo (dias)						
	0	7	14	21	28	42	60
	Biomassa formada (mg)						
10^2	0	15	19	44	47	102	167
10^4	0	14	28	54	101	141	192
10^6	0	24	46	105	120	141	222