

Copyright 2014, ABRACO

The work presented during INTERCORR 2014 in Fortaleza - Ceará in the month of May of 2014.

The information and opinions contained in this work are of the exclusive right of the author(s).

Estudo Comparativo entre as Técnicas do Número Mais Provável e PCR em Tempo Real para Quantificação de BRS (Bactérias Redutoras de Sulfato) em Amostras no Setor de Óleo e Gás.

^aDiogo Azevedo Coutinho; ^aLuana T. Albuquerque Guerreiro; ^aWalter Barreiro Cravo Junior; ^aMiriam Salete de Santana; ^aVitor Cordeiro Pereira; ^bGutemberg Pimenta; ^bMarcelo Araujo e ^aMarcia T. S Lutterbach.

Abstract

Corrosion is a phenomenon responsible for large economic losses in many industries, particularly oil. Microorganisms can induce or accelerate the corrosion process and in these cases is called microbiologically induced corrosion (MIC) or biocorrosion. The Most Probable Number technique (MPN) has been used as standard for quantification of bacteria in different farming systems and production of oil, however, molecular biology techniques are being increasingly used for observation of the presence of microorganisms and its quantification. The need to quickly diagnose the mechanism of biocorrosion in the oil industry to minimize the costs with biocides and other mitigating actions treatments have become decisive. The technique of Real Time PCR (qPCR) can be used as a tool for amplification, detection and quantification of the DNA in a single step. This reduction in the response time allows greater flexibility in the issue of results. In order to compare the two methods (MPN and qPCR), different samples of diesel and cultivation on selective media were used for quantification of sulfate-reducing bacteria. This approach will allow a better assessment of the use of complementary methods, such as qPCR, since only 0.1 - 10% of bacteria found in the environment are cultivated and can be quantified by the MPN technique

Keywords: Most Probable Number, Real Time PCR, Sulfate-Reducing Bacteria.

Resumo

A corrosão é um fenômeno responsável por grandes perdas econômicas em diversas indústrias, principalmente a petrolífera. A presença de microrganismos pode induzir ou acelerar os processos corrosivos sendo nesses casos denominados de biocorrosão ou corrosão microbiologicamente induzida (CMI). A técnica do Número Mais Provável (NMP) vem sendo utilizada como padrão para quantificação de bactérias presentes nos diferentes sistemas de exploração e produção de petróleo, no entanto, técnicas de biologia molecular estão sendo

^a Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação - Instituto Nacional de Tecnologia (INT/MCTI)

^b Petrobras

cada vez mais utilizadas para observação da presença de microrganismos, bem como, a sua quantificação. A necessidade de diagnosticar mais rapidamente o mecanismo de biocorrosão presente nos sistemas da indústria petrolífera, buscando minimizar os custos com tratamentos de biocidas e outras ações mitigadoras passou a ser determinante. Deste modo, a técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) pode ser utilizada como ferramenta para amplificação, detecção e quantificação em uma única etapa, reduzindo o tempo de resposta, possibilitando uma maior agilidade na emissão dos resultados. Com o objetivo de comparar as duas metodologias (NMP e qPCR), diferentes amostras de diesel e de cultivo em meios seletivos, foram utilizadas para a quantificação de bactérias redutoras de sulfato. Essa abordagem irá permitir uma melhor avaliação da utilização de metodologias complementares, como a qPCR, uma vez que apenas 0,1 – 10% das bactérias encontradas no ambiente são cultiváveis e podem ser quantificadas pela técnica do NMP.

Palavras chave: Número Mais Provável; PCR em Tempo Real; Bactérias Redutoras de Sulfato.

Introdução

A atuação dos microrganismos no processo de corrosão dos metais vem sendo estudado devido aos transtornos causados principalmente as indústrias, tubulações e vedações de tanques de armazenamento. Em ambientes naturais e antrópicos a corrosão ocorre quando metais puros ou ligas metálicas passam por modificações químicas saindo do estado estável para formas ionizadas. A corrosão é um processo eletroquímico que consiste em uma reação anódica envolvendo a ionização do metal e a reação catódica baseada na redução de uma espécie química, ou seja, a dissolução do metal em contato com outro meio (ar, água, etc.) (1).

A corrosão induzida por microrganismos (CIM) é aquela onde a corrosão do material metálico se processa sob a influência de microrganismos, mais frequentemente bactérias. Dada a variedade de ambientes que podem proporcionar seu desenvolvimento, muitos são os equipamentos e sistemas industriais que podem sofrer CIM (2). Além de ocorrer no ambiente, é comum encontrar a CIM em diversos setores da economia, como no de produção de óleo e gás, dutos subterrâneos e locais de processamento químico (3).

As bactérias redutoras de sulfato (BRS), estão associadas a corrosão do metal em meios contendo sulfato e são particularmente relevantes em ambientes marinhos pela alta concentração deste ânion na água do mar. Estas bactérias são consideradas as principais envolvidas na CIM (4). As BRS podem aumentar a velocidade e severidade da corrosão utilizando hidrogênio para reduzir sulfato a sulfito ou usando o sulfito para precipitar anodicamente os íons de ferro como FeS (5).

Em laboratório, a determinação do número de BRS é usualmente realizada pela técnica de Número mais Provável (NMP) e considerada o padrão ouro para tal. Porém, o cultivo de microrganismos em laboratório não reflete as reais condições ambientais, pois apenas 0,1 a 10% das bactérias são cultiváveis (6, 7, 8). Além disso, o tempo para obtenção dos resultados através do NMP é de 28 dias, devido as dificuldades de adaptação desses microrganismos as condições laboratoriais. Deste modo, é importante que sejam utilizadas metodologias como as de biologia molecular que forneçam resultados mais rápidos, precisos e que não estejam necessariamente vinculadas a cultivos.

Através da técnica de Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR), que faz a amplificação de regiões específicas do DNA, é possível quantificar o número de células em uma amostra. Destacam-se nessa técnica o tempo de resposta (um a dois dias), quantificação de bactérias não cultiváveis e detecção das que estão mortas, apresentando assim um retrato mais fiel do que ocorre no ambiente.

Esse trabalho teve como objetivo comparar as metodologias de NMP e qPCR na quantificação de BRS em água de fundo de tanque e cultura mista, o que poderia sugerir trabalhá-las em associação, construindo assim uma ferramenta de diagnóstico mais completa e eficiente.

Materiais e Métodos

Amostras de água de fundo de tanque de diesel (registradas como A e B) e cultura mista de BRS foram processadas e analisadas pelo Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação (LABIO/INT) entre julho e dezembro de 2013 (Tabela 1). Semanalmente, foi retirada uma alíquota de cada amostra A e B, totalizando cinco pontos de coleta. Uma réplica foi direcionada para realização da técnica do NMP e outra para extração de DNA e posterior qPCR.

Tabela 1 - Amostras utilizadas para realização do NMP e qPCR.

Tipo	Origem
Água de Fundo de Tanque de Diesel	Terminal
Cultivo de BRS	Cultura Mista de BRS

Para os ensaios microbiológicos, cada amostra foi inoculada em meio de cultura Postgate E (9) para a quantificação das BRS pela técnica de NMP. As alíquotas utilizadas para quantificação por biologia molecular passaram pelo processo de extração de DNA, quantificação e qPCR (Figura 1).

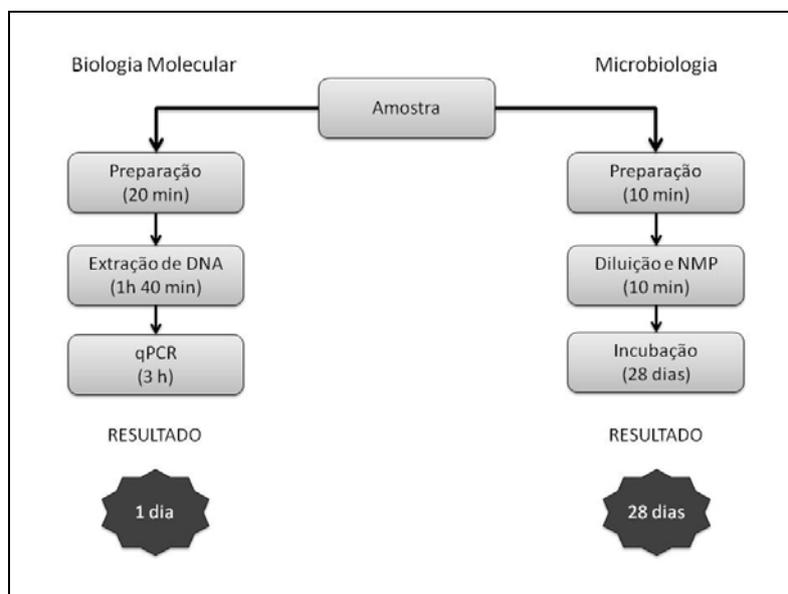


Figura 1 - Esquematização das técnicas de biologia molecular e microbiologia para quantificação de BRS.

^a Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação - Instituto Nacional de Tecnologia (INT/MCTI)

^b Petrobras

Resultados e Discussão

Cultura Mista

Por possuírem um grande número de células, uma amostra de cultura mista foi utilizada para padronizar o processo de extração de DNA e quantificação de BRS. Foi possível quantificar 10^{10} bactérias/ml de amostra, enquanto que através do NMP estimou-se cerca de 10^7 bactérias/ml (Figura 2).

Esse resultado demonstrou que a técnica de qPCR permite quantificação acurada de células em amostras onde ocorram grande concentração de microrganismos/ml, sendo mais sensível e preciso que o NMP.

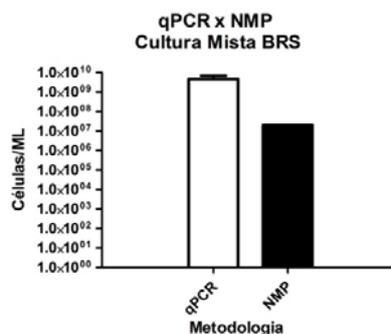


Figura 2 - Quantificação de BRS em cultura mista por qPCR e NMP.

Amostra de Água de Fundo de Tanque de Diesel

Para a amostra de diesel “A”, a quantificação de BRS por qPCR ficou entre 10^6 e 10^7 células/ml, enquanto o NMP apresentou entre 10 e 10^3 células/mL (Figura 3A). Para o grupo “B”, a quantificação por biologia molecular obteve 10^6 células/mL, enquanto pelo NMP variou de 10^3 a 10^5 (Figura 3B). Esses resultados demonstraram que, em amostras ambientais, apesar de existirem substâncias como contaminantes orgânicos, metais, quelantes e ácidos húmicos, que costumam inibir a reação de PCR (10), adaptações no processo de extração de DNA associada à padronização da qPCR foram capazes de gerar dados reprodutíveis.

A

B

^a Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação - Instituto Nacional de Tecnologia (INT/MCTI)

^b Petrobras

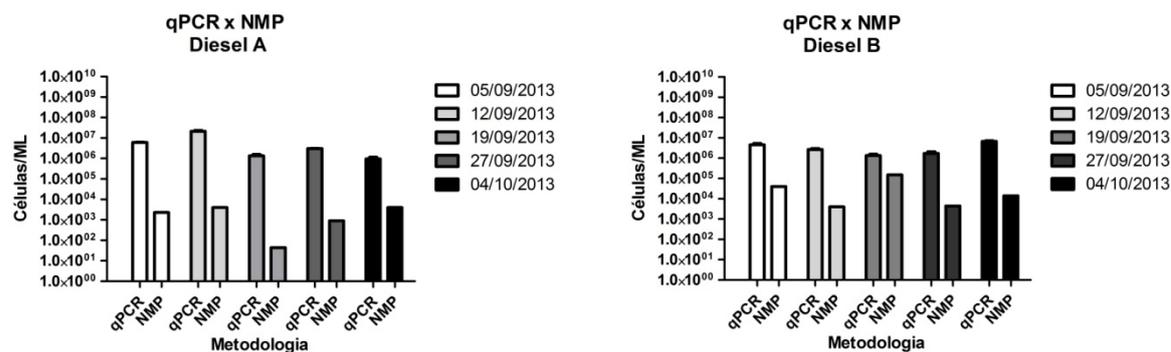


Figura 3 - Quantificação de BRS em amostra de diesel por qPCR e NMP.

Já foi descrito na literatura que a diferença entre a quantificação de células, quando comparadas à técnica de NMP e qPCR, fica em torno de 100 vezes mais bactérias para a metodologia que emprega a biologia molecular (11). Fato esse que ocorre devido às características com relação ao alvo que cada um dos experimentos possui intrinsecamente (tabela 2). A qPCR busca amplificar um gene específico, ou seja, DNA. Já o NMP, por ser uma técnica de microbiologia, possibilita a contagem das células metabolicamente ativas, em condições controladas de laboratório. Por isso, a ferramenta de qPCR é capaz de detectar todas as bactérias da amostra que possuem o gene alvo, enquanto a de microbiologia detecta apenas os organismos que são cultiváveis. Tão importante quanto os pontos já citados, é o da viabilidade das células no momento que o experimento é realizado, isto é, a capacidade de detectar os organismos que estão vivos, em processo de morte celular e os que já estão mortos. Com a PCR em tempo real, é possível detectar as células que estão nesses três estágios, enquanto o NMP apenas os viáveis e os que são cultiváveis.

Tabela 2 – Comparação entre os alvos da qPCR e NMP.

	PCR em Tempo Real	NMP
Alvo do Experimento	DNA	Células
Detecta	DNA Presente	Cultiváveis
Viabilidade Celular	Viáveis, Em Processo de Morte Celular e Não-Viáveis	Viáveis

Para verificar a concentração de células realizadas pelas duas metodologias nas amostras de óleo diesel “A” e “B”, foram analisadas as médias das réplicas para cada

^a Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação - Instituto Nacional de Tecnologia (INT/MCTI)

^b Petrobras

dia de processamento das amostras por qPCR e NMP. Seus valores foram plotados em um gráfico de dispersão (Figura 4). O resultado foi semelhante nas duas amostras. Para o Diesel “A” o desvio padrão para a qPCR foi de 2,8 e 4,79E+01 para NMP (Figura 4 A). Já no “B” os desvios foram de 1,06E+01 para a técnica de biologia molecular e 1,60E+03 para a de microbiologia (Figura 4 B). Por ser um ensaio que estima o número de células, a variabilidade maior observada no Número mais Provável é inerente a técnica em si, que pode ocorrer no momento de preparação do experimento ou na subjetividade da leitura dos crescimentos em cada tubo de ensaio. Visto isso, possivelmente a automatização do processo de PCR em Tempo Real pode estar sendo o determinante para um desvio padrão menor observado nesta técnica.

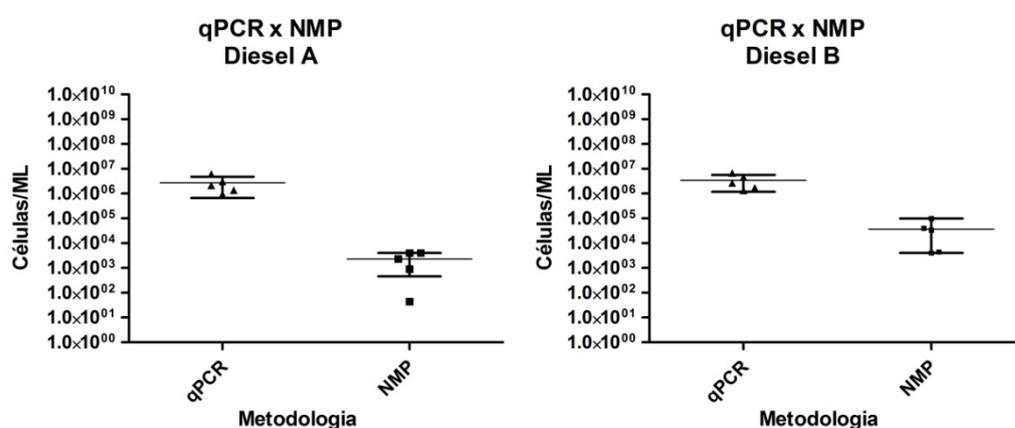


Figura 4 – Desvios padrão das réplicas utilizadas na qPCR e das quantificações por NMP.

Considerando que a qPCR é capaz de detectar tanto bactérias viáveis quanto não-viáveis, esta técnica pode estar superestimando o número de microrganismos metabolicamente ativos em uma determinada amostra. Visto isso, para quantificar apenas bactérias redutoras de sulfato ativas no momento da coleta, foi implementada a quantificação de bactérias através da utilização de moléculas de RNA mensageiro ao invés de DNA. Essa nova abordagem de análise da expressão gênica das BRS auxiliará no maior entendimento da participação desse grupo de microrganismo na corrosão microbiológica.

O surgimento de novas tecnologias faz com que os diagnósticos sejam cada vez mais rápidos e sensíveis. Fato esse que não está sendo diferente na área de biocorrosão. A especificidade de meios de cultura, as análises por microscopia confocal e eletrônica, PCR, além do estudo da diversidade microbiana (sequenciamento de DNA e DGGE);

^a Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação - Instituto Nacional de Tecnologia (INT/MCTI)

^b Petrobras

todas essas técnicas, quanto trabalhadas juntas, enriquecem as análises e se tornam uma ferramenta poderosa para diagnóstico ambiental.

Conclusões

- » A quantificação de bactérias redutoras de sulfato pela técnica de número mais provável e qPCR possibilitou que um resultado mais consistente fosse gerado;
- » Corroborando com o descrito na literatura, a diferença na contagem de células entre a qPCR e o NMP ficou em duas ordens de grandeza para quantificação das bactérias redutoras de sulfato;
- » A qPCR mostrou reprodutibilidade como método de quantificação.

Referências Bibliográficas

- (1) COETSER, S. E., e T. E. CLOETE. "Biofouling and biocorrosion in industrial water systems." **Critical Reviews in Microbiology (Routledge)**, 2005. v. 31:213-232.
- (2) GENTIL, V. **Corrosão**. 4a ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2003.
- (3) LEE AK, NEWMAN DK. Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003. v. 62:134-139.
- (4) BAK, F.; CYPINKA, H.A. Novel type of energy metabolism involving fermentation of inorganic sulfur compounds. **Nature**, 1987. v. 326: 891-892.
- (5) JAVAHERDASHTI, R. A review of some characteristics of MIC caused by sulfate-reducing bacteria: past, present and future. **Anti-Corrosion Methods and Materials**, 1999. v.46, n.3, p. 173-180.
- (6) AMANN, R.I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol Rev**, 1995. v. 59: 143-169.
- (7) OSBURNE, M. S.; GRIOSMAN, T. H.; AUGUST, P. R.; MACNEIL, I. A. Tapping into microbial diversity for natural products drug discovery. **ASM News**, 2000. v. 66, p. 411-417.
- (8) TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria **Applied Environmental Microbiology**, 1990. v. 56, n. 3, p. 782-787.
- (9) POSTGATE, JR. **The sulfate reducing bacteria**, 2ª edição. Cambridge: Cambridge University Press.
- (10) STULTS, J.R., SNOEYEENBOS-West, O.,METHE, B., LOVELY, D.R.,CHANDLER, P.D. Application of the 5' fluorogenic exonuclease assay (TaqMan) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, 2001. v.67,n3, p.2781-2789.
- (11) BEN-DOV, E., BRENNER, E., KASHMARO, A. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes. **Microbial Ecology**, 2007. v.54, p.439-451.

^a Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação - Instituto Nacional de Tecnologia (INT/MCTI)

^b Petrobras