

INVESTIGAREA CANTITATIVĂ ȘI CALITATIVĂ A FUNGILOR CU ROL ÎN BIOCOROZIUNE

GYÖNGYVÉR MARA, ÉVA GYÖRGY, ISTVÁN MÁTHÉ, BEÁTA ÁBRAHÁM,
SZABOLCS LÁNYI

Universitatea Sapientia, Facultatea de Științe Tehnice și Sociale, 530104 P-ța Libertatii nr.1, Miercurea Ciuc,
România, e-mail: maragyongyver@sapientia.siculorum.ro

Abstract: *The paper presents semi-quantitative and semi-qualitative molecular methods for the investigation of the microbial influenced corrosion. Our protocols were elaborated on model systems based on pure culture of Aspergillus niger and sterilized sand seeded with a known amount of A. niger. The semi-quantitative analysis was based on the spectroscopic determination of the DNA concentration (A_{260}). In order to estimate the quantity of living cells from the corroding material a standard curve was proposed for the determination of living cells based on the quantity of total DNA. The isolated and quantified genetic material can be derived from a wide range of living microorganisms. In the microbial influenced corrosion process not only the quantitative data, but the determination of the microbial diversity is important. The proposed semi-qualitative method lies on the analysis of the rDNA sequences, so called ITS (internal transcribed spacer) regions. In order to obtain a polymorphic restriction profile, three restriction enzymes were used.*

Keywords: *microbial influenced corrosion, DNA quantification, PCR-RFLP, quantitative and qualitative evaluation methods.*

Introducere

Coroziunea influențată microbiologic se referă la influența microorganismelor asupra cineticii proceselor de coroziune a materialelor cauzat de către microorganisme care aderă suprafețelor (interfețelor) și formează biofilme. Aceste microorganisme sau prin influențarea mediului fizico-chimic sau prin activitatea lor metabolică joacă un rol crucial în procesul coroziunii [Beech și colab. 2000]. Xu și colab. [2001] consideră că aceste microorganisme au rol în 20% dintre cazurile de coroziune.

Datorită dezvoltării ale metodelor biologiei moleculare din ultimii ani, aceste tehnici au început să fie folosite și în studierea diversității microbiene respectiv distribuția acestora în diferite medii naturale. Metodele cele mai promițătoare în cercetările referitoare la coroziunea influențată microbiologic sunt tehnicile studierii ADN-lui microbial. Prin aceste tehnici pot fi studiate microorganismele dominante și proporția microorganismelor care influențează coroziunea, respectiv poate fi monitorizată procesul de corodare.

Procedura semi-cantitativă se bazează pe cuantificarea microorganismelor din probele de material de construcții, prin identificarea ADN-lui genomic. Determinarea propusă se bazează pe determinarea cantitativă a materialului genetic (ADN, ARN) din structura celulelor vii. În celulele moarte, chiar în prima fază de descompunere enzimele denumite endonucleaze clivează materialul genetic (ADN, ARN). Deci acest material genomic poate fi izolat numai din material viu, indiferent de formele de viață latente/active. Așadar materialul genetic identificat prin metode specifice va fi proporțional cu cantitatea de biomasă vie din materialul studiat.

Procedura semi-calitativă constă în determinarea microorganismelor din probele de material de construcții pe baza unor secvențe specifice. Aceste secvențe specifice a ADN-lui genomic cele mai frecvent folosite sunt din regiunea ADN-lui ribosomal. Regiunea ADN-lui ribosomal conține cele două subunități (18S, 28S), subunitatea 5.8S a ADN-lui ribosomal, respectiv două regiuni denumite internal transcribed spacer (ITS1, ITS2), care sunt secvențe variabile. Diferite secvențe ale ADN-lui ribosomal pot fi amplificate și analizați sau prin secvențiere [Bermont-Bouis și colab, 2007] sau prin folosirea enzimelor de restricție (metoda RFLP) [Jayarao și colab. 1992, Hijri și colab. 1999] în vederea determinării tulpinilor de fungi.

Așadar, în acest articol prezentăm o procedură semi-cantitativă și semi-calitative pentru evaluarea biocoroziunii, cu metodele biologiei moleculare.

Tehnica experimentală

Organismul și sistemul model

Specia *Aspergillus niger* a fost folosită ca organism model pentru a calcula cantitatea de ADN extractabil din hifele de fungi. S-a ales această specie deoarece este ușor de crescut și este totodată o specie de interes în studierea coroziunii influențate microbiologic. Specia *Aspergillus niger* a fost crescută pe mediu de cultură Czapek-Dox agarizat (Fluka). Mediile de cultură conținând sucroză ca sursă de carbon și nitrat ca sursă de nitrogen au fost însămânțate și incubate 5 zile la o temperatură de 30°C în incubator Memmert. Probele de țesut au fost luate din hifele crescute pe suprafața mediului de cultură.

Sistemul model beton a fost obținut prin autoclavarea la 121°C timp de 60 minute a nisipului. Acest nisip sterilizat (500 mg) a fost amestecat cu cantități bine definite de hife de *Aspergillus niger* (organism test).

Extracția și purificarea ADN-ului

Izolarea ADN-ului s-a realizat prin metoda clasică a extracției cu cloroform. Hifele de fungi se mojarază și se incubează la 40°C în 400μl soluție tampon TNES (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM acid etilenediamintetraacetic, 1% sodiu dodecil sulfat) și 10μl proteinază K (20mg/μl) timp de 2 ore. Proteinele sunt precipitate cu 250μl soluție de 2.6M NaCl, urmat de o purificare cu cloroform (500μl). Pentru precipitarea ADN-ului se folosește etanol 99%. ADN-ul se suspendează cu apă ultrapură.

Determinare spectrofotometrică

ADN-ul total extras a fost determinat prin spectrofotometrie UV-VIS (Varian) la 260 nm, și a fost convertită în valori de concentrație folosind ecuația Labmert-Beer.

Amplificare cu amorse specifice

Pentru a analiza regiunea ADN-ului ribosomal a probelor de fungi au fost folosite două perechi de amorse specifice: ITS 4 și ITS 5, respectiv NSI și NLB [Hijri și colab. 1999, Martin și Rygiewicz 2004]. Aceste amorse delimitează secvența de ADN 5.8 S ribosomal, respectiv conțin secvențe din regiunile ITS (internal transcriber spacer). Reacția de PCR (amplificarea enzimatică in vitro a ADN-ului) s-a decurs într-un volum de 25 μl, conținând 2.5 μl 10x tampon enzimă (0,1 M tris-HCl, pH=8.3, 0,5 M KCl, Promega), 2.5 μl din 0,025 M MgCl₂ (Promega), 0.5 μl din 0,01M dNTP (Promega), 1-1 μl amorsă ITS sau NSL (Biosearch Technologies), 1 unitate de polimerază Taq (Promega) și 2 μl ADN țintă. Programul de amplificare: denaturare 3 minute la 95°C, urmate de 33 cicluri de amplificare care au cuprins: denaturare de 30 secunde la 95°C, annealing primeri de 30 secunde la 54°C, extensia primerilor de 1 minut și 20 secunde la 72°C; în final s-a efectuat o extensie finală de 10 minute la 72°C.

Digestia produsilor cu diferite enzime de restricție

În vederea obținerii unor diferențe în mărimea produsilor de restricție, s-au folosit mai multe enzime de restricție, care prezintă secvențe rare de clivare, precum *Eco RI*, *TaqI* și *ApaI*. Aceste enzime de restricție recunosc o anumită secvență în structura ADN-ului bicatenar, și clivează aceasta. Amestecul de reacție având o cantitate de 20μl a cuprins următorii reactivi: 10X RE buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, Promega), BSA acilat 2 μg (Promega), și 5 unități enzimă de restricție/ 20μl amestec de reacție (Promega) și ADN țintă. Digestia enzimatică s-a efectuat prin incubarea amestecului de reacție 3h la 37°C.

Electroforeza în gel de agaroză

Verificarea amplificării s-a făcut prin electroforeză în gel de agaroză 1.5% colorat cu bromură de etidiu (Sigma), vizualizat și fotografiat sub lumina UV (Transiluminator

Rezultate și discuții

Metoda semi-cantitativă

Obiectivul determinării concentrației de ADN total, a constituit realizarea curbei etalon. Pentru aceasta, s-a folosit ADN-ul izolat din țetusturile fungice etalon, pe baza căruia s-au luat diferite cantități de țesut în procesul de izolare. ADN-ul total extras a fost determinat prin spectrofotometrie UV-VIS (Varian) la 260 nm, și a fost convertită în valori de concentrație folosind ecuația Labmert-Beer.

ADN-ul a fost izolat și purificat în total din 12 probe de țesut de *Aspergillus niger*, iar cantitățile de țesut au avut valori între 0.3 mg și 3.9 mg. Prin spectrofotometrie, folosind un spectrofotometru UV-Vis Varian Cary 50 Conc, s-a determinat valorile absorbțiilor la 260 nm cu programul RNA-DNA Cary Win Estimation Application. Pentru a se putea calcula cantitatea de țesut viu, pe baza datelor de ADN izolat din diferite probe, s-a întocmit dreapta de regresie (datele nu sunt prezentate) și s-a calculat ecuația de regresie ($y=1.2534*x$) a dreptei.

Însă se cunoaște din literatura de specialitate, că din probele de mediu eficiența recuperării biomasei de microorganisme variază. În cazul probelor de sol, pentru particulele de sol trebuie să fie eliminate ceea ce se poate realiza prin centrifugare după o prealabilă tratare a solului cu amestecul de liză celulară [Yeates și colab. 1998]. Eficiența recuperării biomasei de fungi s-a dovedit a fi între 4.3%-52.8% folosind diferite metode [Kabir și colab. 2003]. Așadar în vederea estimării eficacității izolării ADN-lui din materiale de construcție s-au realizat probe model, conținând atât material viu cât și material de construcție.

Sistemul model beton a fost obținut prin autoclavarea la 121°C timp de 60 minute a nisipului. Acest nisip sterilizat (500 mg) a fost amestecat cu cantități bine definite de hife de *Aspergillus niger* (organism test). Acest amestec a fost omogenizat, după care a fost supus procedurii de izolare de ADN. Izolarea ADN-lui s-a realizat prin metoda clasică a extracției cu cloroform. Pentru analiza cantitativă a ADN-lui izolat s-a folosit metoda spectrofotometrică.

Obiectivul determinării concentrației de ADN total a constituit determinarea cantității de ADN pierdute în urma izolării din probe de mediu. ADN-ul a fost izolat și purificat în total din 12 probe model, prezentând cantități de țesut de *Aspergillus niger* între 0.4 mg și 4.9 mg și o cantitate de nisip sterilizat (500 mg).

Pentru estimări ulterioare privind cantitatea de țesut viu în materialele de construcție, pe baza datelor de ADN izolat din diferite probe model, s-a realizat graficul curbei etalon. Pe baza graficului, s-a trasat dreapta de regresie și s-a calculat ecuația de regresie ($y=0.688*x$) a dreptei (Fig. 1.).

Folosind ecuația calculată pentru probele de țesut fungic ($y=1.2534*x$) am calculat valorile cantităților de ADN care teoretic trebuia obținut din cantitățile de țesut folosite în probele model. Cantitatea de ADN obținut din probele model (nisip și fungi) s-a dovedit a fi mai scăzută. Aceste valori estimate și cele obținute au fost comparate prin testul Chi pătrat (Microsoft Excel 2007). Testul Chi pătrat a arătat că similitudinea este de 75.75%. Deci cantitatea recuperată este aprox. 75% din cantitatea de ADN izolat în condiții normale.

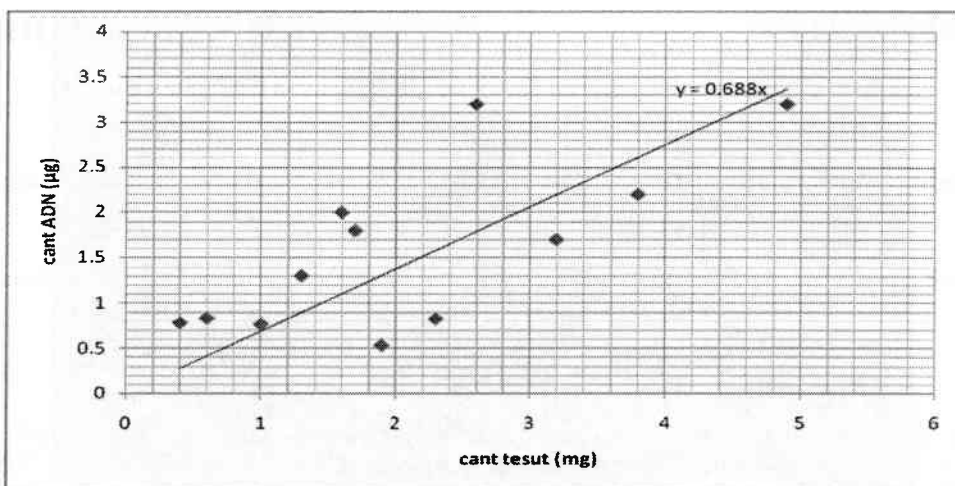


Fig.1. Curba etalon realizată din probe model, pentru determinarea cantităţii de ţesut (în mg) cunoscând valorile de ADN din probă

Metoda semi-calitativă

Materialul genetic poate proveni de la orice microorganism (alge, bacterii, fungi), care în proesele coroziunii influenţate microbiologic au efecte diferite. Datele calitative, respectiv determinările la nivel de specii sau gen a microorganismelor sunt necesare în vederea determinării rolului acestora în procesul coroziunii, respectiv în vederea predicţiei efectului acestora asupra materialului corodat.

Ampliconii ITS4-ITS5 rezultaţi în urma reacţiei de polimerază (PCR) au o mărime de aprox. 600 pb şi cuprind regiunea 5.8S ADN ribosomal. O regiune mai mare a ADN-lui ribosomal a fost amplificată cu perechea de amorse NSI I-NLB4 care a rezultat un amplicon de 900 pb.

Aceşti produşi de 600 respectiv de 900 de perechi de baze au fost digeraţi cu diferite enzime de restricţie în vederea obţinerii unor diferenţe în genomul diferitor specii/genuri de fungi. Ca rezultat al digestiei enzimatice cu enzima *EcoRI* nu se observă polimorfism. Deoarece enzima *EcoRI* nu s-a dovedit a fi o enzimă specifică, folosibilă în determinarea moleculară unor tulpini de fungi, s-au ales alte enzime de restricţie (*ApaI*, *TaqI*). Pe imaginea gelului de agaroză se observă polimorfism accentuat atât în cazul enzimei de restricţie *ApaI* cât şi în cazul enzimei de restricţie *TaqI* (Fig 2.).

Probele 1.1. şi 1.3 provin din hife de fungi aparţinând genului *Penicilium sp.*, şi au fost determinate microscopic. Pe figura 2 (săgeţi de culoare închisă) se observă secvenţe de ADN de mărimi diferite, care au fost obţinute în urma digestiei ampliconilor ITS cu enzima *ApaI*. Proba 1.1. prezintă două benzi accentuate în intervalul 100-300 pb (respectiv 280, 180 pb), iar proba 1.3. prezintă secvenţe de ADN mai mari, între 420-280 perechi de baze.

Însă aceste date referitoare la analiza produşilor obţinute în urma digestiei cu o enzimă sunt insuficiente. Metoda RFLP are la bază diferenţierea produşilor obţinute în urma digestiei enzimatice, însă impune folosirea a mai multor enzime, respectiv două probe sunt considerate a fi diferite în cazul în care ADN-ul ţintă este digerat diferit de către 2 enzime. A doua enzimă folosită în studiul de faţă a fost enzima *TaqI*.

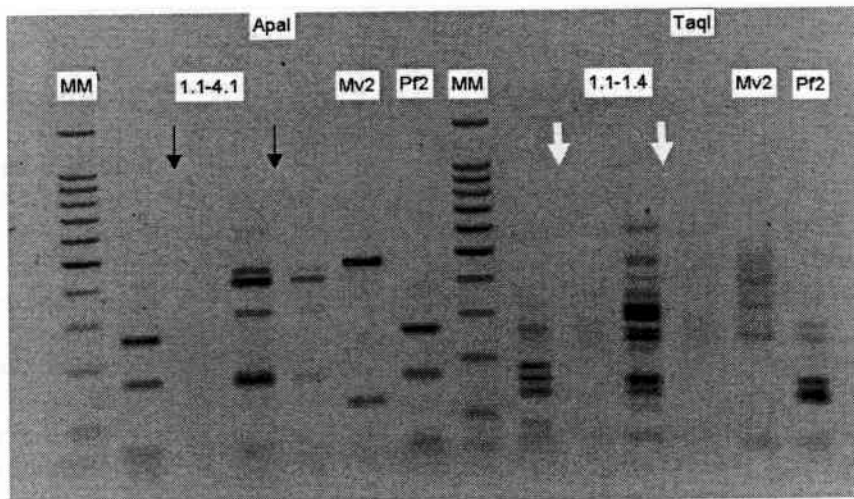


Fig. 2. Imaginea gelului de agaroză a produșilor de RFLP cu enzimele *Apal*, *TaqI*. Benzile obținute se compară cu marker molecular 100 pb (MM).

Pe figura 2 (săgeți de culoare deschisă) se observă secvențe de ADN de mărimi diferite. Pe gel, în cazul probei 1.1. se observă benzi accentuate între 100-200 perechi de baze (200, 180, 160 pb), iar proba 1.3. prezintă atât secvențe mici, prezente în cazul probei 1.1. (160, 180 pb) cât și secvențe mai mari în domeniul 300-320 pb și 260-280 pb.

Aceste două probe, 1.1. și 1.3. deci prezintă diferențe în produșii obținuți în urma analizei RAPD. Deci probele 1.1. și 1.3 reprezintă diferite tulpini de *Penicilium sp.*

Concluzii

S-au elaborat două metode, una semi-cantitativă și alta semi-calitativă bazată pe metodele biologiei moleculare pentru studierea coroziunii influențate microbiologic. Protocoalele de lucru au fost elaborate pe sisteme model. Metoda semi-cantitativă bazată pe analiza spectrofotometrică a ADN-lui este o metodă adecvată în analiza biomasei microorganismelor din probe de material corodat. Metoda semi-calitativă se bazează pe analiza secvențelor de ADN ribosomal fungic, prin metoda RFLP. Secvența ADN-lui ribosomal și enzimele de restricție folosite (*TaqI* și *Apal*) s-au dovedit a fi utile în studierea diferitor tulpini de fungi cu rol în biocoroziune.

Mulțumiri

Autorii mulțumesc M. Ed. C. pentru finanțarea cercetărilor prin programele CEEEX, în special al proiectului DIRECTOR prin care această lucrare a fost realizată.

Bibliografie

- I.Beech, A.Bergel, A.Mollica, H.C.Flemming, V.Scotto, W.Sand. Microbially Influenced Corrosion of Industrial Materials. Brite-Euram III Thematic Network. 2000: 1-28.
- D.Bermont-Bouis, M.Janvier, P.A.D.Grimont, I.Dupont, T.Vallaes. Journal of Applied Microbiology 2007. 102:161-168.
- B.M.Jayarao, J.J.E.Dore, S.P. Oliver. Journal of Clinical Microbiology. 1992. 30(9): 2235-2240.
- M.Hijri, M.Hosny, D.van Tuinen, H.Dulieu, Fungal Genetics and Biology 1999. 26: 141-151.
- S.Kabir, N.Rajendran, T.Amemiya, K.Itoh. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2003. 96 (4): 337-343.
- K.J.Martin, P.T. Rygiewicz. BMC Microbiology. 2005. 18(1):28.
- W-T.Xu, K-L Huang, A-K.Deng, Z.Liang, Z-B. Luo. Food Control. 2007. 18: 1300-1306.