

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EM BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

Aluno: Lucas Troia Machado Silva e Mayara Mendonça de Andrade

Orientador: Fatima V. Pereira Meirelles

Colaboradores: Walter B. Cravo Jr, Ivani, S. Bott, Maria Isabel P. da Silva, Monica de O. Penna

Introdução

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são microrganismos extremamente importantes devido ao seu envolvimento nos processos de corrosão influenciada por microrganismos – CIM (1).

Células de BRS são capazes de crescer em diferentes ambientes como poços, oleodutos e reservatórios de petróleo através da realização de uma seqüência de reações enzimáticas que resultam na formação de sulfetos que geram odor, toxicidade e corrosividade (2-3).

Uma das formas de controle do crescimento destas bactérias é a determinação das atividades enzimáticas importantes neste processo, e subsequentemente, de mecanismos de inibição destas enzimas. A enzima chave deste processo é a APS redutase, uma enzima intracelular envolvida no metabolismo do sulfato (4). A quantificação desta enzima torna-se portanto, uma ferramenta poderosa que poderá auxiliar no estabelecimento de estratégias a serem utilizadas para o controle da CIM

A localização intracelular da APS redutase dificulta a determinação de sua atividade. Assim, torna-se necessário o estabelecimento de uma metodologia adequada de ruptura celular, para exposição da enzima e posterior medida de sua atividade.

Devido a grande diversidade de microrganismos existentes e de suas diferentes características em função do meio onde se encontram, diversos métodos de ruptura para células bacterianas são encontrados na literatura: Basicamente podemos dividi-los em físicos, químicos e enzimáticos.

Os métodos físicos apresentam como vantagens os seguintes aspectos: i) não requerem a adição de outros agentes químicos que muitas vezes podem promover efeitos indesejáveis à amostra, ii) podem ser aplicados para diferentes organismos, o que é de grande valia quando se tem a presença de consórcios microbianos na amostra e iii) são adequados ao escalonamento por serem geralmente mais econômicos que os outros dois. Por outro lado, apresentam também desvantagens, entre as quais podemos citar: i) geram calor e devem ser usados com cuidado para não promover a desnaturação das enzimas de interesse, ii) formam espuma que também pode levar a desnaturação das enzimas, iii) se forem muito vigorosos podem formar partículas que podem ser carregados e processados, por serem de difícil separação e iv) liberam outras moléculas tais como ácidos nucléicos que geralmente têm que ser removidos para não causarem interferência nos métodos de dosagem subsequentes.

Os métodos químicos por sua vez, apesar de promoverem a ruptura eficiente do envoltório celular geralmente conferem ao sistema condições drásticas (altos valores de pH por exemplo) que podem levar à desnaturação das enzimas de interesse e comprometer os resultados. Quando for necessária a sua utilização deve ser feita com cuidado para que sejam minimizados os efeitos adversos.

Os métodos enzimáticos são mais caros e se tornam opção importante quando os demais tratamentos não fornecerem resultados satisfatórios.

Neste trabalho foram testados diferentes métodos físicos, químicos e enzimáticos e suas combinações.

Objetivos

Comparar diferentes metodologias de ruptura celular visando a extração de proteínas e a determinação qualitativa da atividade da enzima APS redutase.

Metodologia

Foram utilizadas células de BRS mesófilas provenientes de amostras de oleodutos. As células eram cultivadas em meio Postgate-E modificado e incubadas à 30°C por 48h. A cultura obtida foi utilizada como pré-inóculo de diferentes frascos de mesma composição. Periodicamente o conteúdo de dois frascos era filtrado para os ensaios subsequentes.

Para determinação do peso seco as células de uma alíquota do filtrado eram retidas em membrana de 0,22 µm e colocadas na estufa a 60°C para secagem até massa constante.

Para extração de proteínas o filtrado era centrifugado e as células submetidas a diferentes procedimentos de ruptura celular. Utilizou-se lisozima, ultra-som e agentes químicos em diferentes condições.

Após a ruptura da célula o teor de proteínas era determinado em cada fração pelo método de Lowry (5) e a medida qualitativa da atividade da APS redutase era determinada pelo método do ferricianeto de potássio (4).

Conclusões

Os resultados obtidos permitem verificar que todas as metodologias de ruptura celular testadas (temperatura, choque térmico, ultra-som, agente químico ou enzimático) foram eficientes para a extração de proteínas, pois permitiram um aumento dos teores de proteínas na fração intracelular solúvel.

A atividade da APS redutase só foi observada nas frações onde o método químico foi associado ao físico.

Os procedimentos apresentados aqui poderão ser utilizados para outras condições sempre que for necessária a extração de moléculas intracelulares e servirão de referência também para os trabalhos onde a ruptura não é desejada.

Referências

1 - DOWLING, N. J. E.; MITTELMAN, M. W.; WHITE, D. C. The role of consortia in microbially influenced corrosion. In: Zeikus, J. G. & Johnson, E. A. - **Mixed cultures in biotechnology**, McGraw-Hill, 1991.

2 - MCINERNEY, M I, WOFFORD, N Q and SUBLETTE, K L. Evaluation of microbial control of H₂S in a porous medium. **Appl. Biochem. Biotechnol**, 57/58, 933-944, 1996

3 - JENNEMAN GE., MCINERNEY MJ. and KNAPP RM. Effect of nitrate on biogenic sulfite production. **Appl. and Environ. Microbiol**, 51, 1205-1211, 1986

4 - DZIERZEWICZ, Z., CWALINA, B. CHODUREK, E.; WILCZOK, T. The relationship between microbial metabolic activity and biocorrosion of carbon steel. **Res. Microbiol**, 148, 785-793, 1997

5 - LOWRY O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; DAVIDSON, J. T. Protein determination with Folin Phenol Reagent. **J. Biol Chem**, 193, 265-275, 1951