INTERCORR2008_101

Copyright 2008, ABRACO
Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2008, em Recife/PE, no mês de maio de 2008.
As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Avaliação de metodologias rápidas para quantificação de APS redutase: Etapa I - Extração de Proteínas

Fatima V. Pereira-Meirelles[1], Ivani, S. Bott[2], Lucas T. M. Silva[3], Maria Isabel P. da Silva[4], Mayara M.de Andrade[3] Monica de O. Penna[5]

Abstract

The metabolic activity of sulfate reducing bacteria (SRB) leads to sulfate formation. The sulfates produced present odor and they are also toxic and corrosive. This production is dependent on several enzyme activities. Adenylyl sulfate reductase - APS reductase is the central enzyme in this metabolic pathway. In order to protect life and the environment, control of SRB growth is necessary. The literature suggests a correlation between APS reductase activity and H_2S levels. To establish the real correlation between these two parameters is necessary to extract APS reductase, an intracellular enzyme and measure its activity. This paper presents the first part of this study, in which several methods of extraction were tested with the aim of choosing an adequate and practical method to lyse bacterial culture and detect intracellular protein content. Initially, enriched SRB cultures obtained from the field were used. Physical, chemical and enzymatic methods of cell rupture in the presence of different substances were tested. The results suggest that sonication is the most appropriated method for these cultures. The procedure present here can be tested with other systems and optimized for different SRB cultures when cell lyses are desired or to serve as a reference when it is not. Moreover, APS reductase activity, correlated with SRB growth can be used, in the future, as a biomarker of corrosion influenced by microorganisms (CIM).

Resumo

A atividade metabólica das bactérias redutoras de sulfato (BRS) leva a formação de sulfetos e depende da ação de enzimas, como por exemplo a APS redutase. Os sulfetos produzidos causam sérios problemas como odor, toxicidade e corrosividade. Portanto, a formação destes compostos deve ser minimizada, para prevenir corrosão, proteger tanto a vida como o ambiente e reduzir custos de manutenção. Verifica-se na literatura que existe uma correlação entre os níveis da APS redutase e de H_2S. Para que esta correlação seja estabelecida, é de primordial importância que se faça a extração da APS redutase que é intracelular. A utilização de um método eficaz de ruptura celular é indispensável para a exposição da enzima e assim o estabelecimento da correlação entre o crescimento das BRS e o teor das enzimas, que poderão servir, no futuro, como biomarcadores da CIM. O presente trabalho apresenta os resultados da primeira etapa deste estudo que teve por objetivo estabelecer uma metodologia apropriada para obtenção de proteínas e enzimas intracelulares de interesse. Foram utilizadas culturas

[1] Doutor, Bioquimica – PUC-Rio
[2] Doutor, Metalurgia - PUC-Rio
[3] Aluno de Graduação – PUC-Rio
[4] Doutor, Eng.Química – PUC-Rio
[5] Mestre, Química Inorgânica - PETROBRAS S.A.

enriquecidas de BRS obtidas de amostras de campo. Foram testados métodos físicos, químicos e enzimáticos de ruptura celular, bem como suas combinações, na presença de diferentes substâncias. Os resultados sugerem que o uso de ultra-som é o método mais adequado para ruptura das células de BRS, nos sistemas de interesse. Os procedimentos apresentados aqui poderão ser utilizados para outras condições sempre que for necessária a extração de moléculas intracelulares podendo servir de referência também para os trabalhos onde a ruptura não é desejada.

Palavras-chave: Biocorrosão, BRS, ruptura, extração, proteínas, enzimas

Introdução

A corrosão influenciada por microrganismos (CIM), problema reconhecido desde o século passado, é o resultado das reações oxidativas iniciadas ou mantidas pelas atividades dos microrganismos. Estes produzem metabólitos corrosivos, tais como ácidos orgânicos e inorgânicos incompatíveis com a estabilidade de vários materiais e nos metais geram células eletrolíticas com sítios catódicos ou anódicos com destruição oxidativa deste último **(1).**

A destruição do metal ocorre em um sistema altamente heterogêneo com microgradientes de oxigênio, nutrientes orgânicos e inorgânicos, e outros produtos da corrosão, porém os mecanismos não são conhecidos em detalhes. Alguns microrganismos aeróbios foram identificados como responsáveis por diferentes tipos de corrosão dos metais; contudo os que têm causado problemas, economicamente mais importantes, são as bactérias redutoras de sulfato (BRS), anaeróbias estritas **(1-4).**

Bactérias redutoras de sulfato desenvolvem uma série de reações que resultam no acúmulo de sulfito e/ou na liberação de H_2. Várias são as enzimas envolvidas nestas reações. Sabe-se que a atividade destas enzimas está diretamente relacionada a atividade metabólica da cultura e, conseqüentemente, ao processo corrosivo desencadeado pelas BRS. Assim, a dosagem de diferentes atividades enzimáticas, torna-se uma ferramenta poderosa que poderá auxiliar no estabelecimento de estratégias a serem utilizadas para o controle da CIM.**(5)**

Para que seja possível determinar a atividade destas enzimas, intracelulares é necessário que se estabeleça uma metodologia adequada de ruptura celular. Após a ruptura do envoltório celular as enzimas de interesse, expostas, poderão ser quantificadas. A literatura menciona diversos métodos de ruptura para células bacterianas. Face às inúmeras possibilidades, este trabalho apresenta os resultados da primeira etapa deste estudo que teve por objetivo estabelecer uma metodologia apropriada para obtenção de proteínas intracelulares. Foram utilizadas culturas enriquecidas de BRS obtidas de amostras de campo. Foram testados métodos físicos, químicos e enzimáticos de ruptura celular, bem como suas combinações, na presença de diferentes substâncias.

Estado da Arte

Dentre as atividades industriais atingidas por processos de corrosão, a petrolífera ocupa um lugar de destaque. Sanders & Hamilton **(6)** citam dezoito situações onde os microrganismos estão envolvidos nesta atividade. A corrosão pode atingir os sistemas de perfuração, recuperação, transporte e armazenamento. As tubulações e os reservatórios metálicos utilizados entram em contato com vários agentes de corrosão (água do mar, atmosfera corrosiva contendo, CO_2, SO_2, H_2S, etc.) principalmente do tipo eletroquímico, que podem dar início a processos de deterioração externos e/ou internos, em meios oxidados ou reduzidos.

Um dos maiores problemas é a geração de sulfetos pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS) que habitualmente estão presentes em ambientes anóxicos, tanto como microrganismos planctônicos, como na forma de biofilmes. Estes organismos reduzem sulfato a sulfeto ao mesmo tempo que oxidam o hidrogênio e uma grande diversidade de doadores (orgânicos) de elétrons **(7).** Os sulfetos gerados pelo metabolismo das BRS causam sérios problemas como odor, toxicidade, corrosividade e formação de produtos insolúveis como sulfeto ferroso, que precipita e incorpora a matriz do óleo, estabilizando indesejáveis emulsões óleo-água **(8).** Assim, o desenvolvimento de processos para controlar a produção de sulfetos e outras formas de atuação das BRS é fundamental tanto economicamente, pois pode prevenir futuros gastos com a corrosão, quanto na proteção à vida e ao ambiente **(9).**

O controle da geração biogênica de H_2S na indústria do petróleo tem motivado o desenvolvimento de pesquisas que têm como objetivo o aprimoramento de metodologias existentes e o desenvolvimento de novas técnicas. Algumas abordagens envolvem a adição de biocidas e a biorremediação.

A adição de produtos biocidas tem sido uma alternativa utilizada no combate ao "souring" em sistemas de exploração de petróleo. Porém, a obtenção de resultados satisfatórios é freqüentemente limitada em termos de efetividade e duração dos biocidas. Além disso, certos produtos biocidas podem causar grandes prejuízos ao meio ambiente **(10).**

A biorremediação é uma alternativa menos agressiva e ambientalmente correta. Baseia na competição gerada entre células de BRS e bactérias redutoras de nitrato (BRN) favorecida pela adição de nitrato e/ou nitrito à água de injeção **(11).** A redução do nitrato não só pode inibir a produção de sulfeto, assim como, a atividade de BRN pode remover o sulfeto presente na água produzida. O sucesso da adição de nitrato para o controle da produção de sulfeto dependerá da presença de uma população ativa de BRN.

Sabe-se que a maioria das cepas de BRS pode reduzir sulfato usando hidrogênio gasoso como doador de e^- e que cepas de *D.desulfuricans*, possuindo altas atividades da APS redutase, também apresentam maiores taxas de produção de H_2S. Estes estudos sugerem que a corrosão sob condições naturais pode ser estimulada pela atividade metabólica das bactérias presente em vários ambientes, e que esta atividade, dependente de suas diversas enzimas, é um dos fatores que contribui para a agressividade da corrosão por bactérias, incluindo resistência a vários agentes tóxicos **(10)**.

A despeito das várias teorias que têm sido propostas para explicar a CIM, parece claro que certas cepas são mais corrosivas do que outras. Considera-se **(11)** que a formação de íons H^+ dependerá da maneira pela qual a bactéria metabolisa o hidrogênio e que a natureza do composto de enxofre tem um papel no mecanismo de regulação do pH no ambiente local **(11, 16).**

O primeiro passo da via de redução desassimilativa de sulfato é sua ativação pela conversão à adenosina fosfosulfato (APS). Em seguida, APS é reduzido a sulfito e AMP e depois o sulfito é reduzido a sulfeto. Dzierzewicz e colaboradores **(10)** mostraram que cepas de *D.desulfuricans* possuindo altas atividades da APS redutase e da hidrogenase também apresentaram maiores taxas de produção de H_2S.

Considerando estes fatores, torna-se interessante examinar a idéia de que alguns aspectos da atividade metabólica das BRS devem estar correlacionados com a taxa de CIM, e que, os teores de determinadas enzimas participantes do metabolismo do enxofre e do hidrogênio são alguns destes fatores. Para isto, metodologias de ruptura celular e posterior quantificação destas enzimas devem ser testadas.

Materiais e Métodos

Cultivo de células de BRS e extração de proteínas

Células de BRS mesófilas, provenientes de amostras de oleodutos coletadas no terminal de Barra do Furado, eram cultivadas em meio Postgate-E modificado. Cerca de 100 mL de cultura eram filtrados em duas membranas de diferentes porosidades, para remoção do precipitado de sulfeto de ferro. O Filtrado F obtido, contendo células e isento de precipitado de sulfeto de ferro, era reservado para os estudos subseqüentes.

1 – Determinação do peso seco

Uma porção do filtrado F era filtrada em membrana de 0,22 µm e as células retidas eram colocadas na estufa a 60ºC para secagem até massa constante.

2 - Extração de proteínas em culturas de BRS.

As células de BRS eram centrifugadas e submetidas a diferentes procedimentos de ruptura celular para extração e dosagem das proteínas intracelulares. Utilizou-se lisozima, ultra-som e agentes químicos em diferentes condições como detalhado na Tabela I

3 - Dosagem de Proteínas

O teor de proteínas era determinado em cada fração obtida da extração pelo método de Lowry **(17).** Diferentes alíquotas dos sobrenadantes e dos precipitados eram utilizadas. As concentrações de proteínas eram calculadas de acordo com Peterson **(18)**.

Resultados

Resultados comparativos dos procedimentos de extração: métodos físicos, químicos e enzimático

Tendo em vista o fato de que cada procedimento foi realizado com uma amostra diferente contendo espécies e massas distintas, os resultados serão apresentados em porcentagem de extração, onde o valor de 100% corresponde à soma dos valores absolutos encontrados para as duas frações (sobrenadante - S e precipitado - P) em cada teste. A eficiência do método de extração foi medida pela quantidade de proteínas presente no sobrenadante. A Tabela II apresenta as características das amostras.

1 - Efeito do aquecimento a 37°C por 1hora

Utilizando o Procedimento I (Tabela I) obteve-se os resultados apresentados na Tabela III.

Na Tabela III verificamos leve efeito positivo do EDTA na extração na ausência de NaCl (XTE), enquanto sacarose (XTS) e NaCl (XTN) mostraram-se estabilizadores, dificultando a extração.

No caso de XTPN (Tabela III) verificam-se valores elevados no sobrenadante, que podem ser decorrente da turbidez gerada pela não solubilização completa da espermidina ou sua não incorporação total pela população bacteriana.

2 - Efeito do choque com N_2 líquido

Os teores de proteínas encontrados após o procedimento II (Tabela I) de extração são apresentados na Tabela IV.

Durante o choque osmótico os valores mais elevados para concentração de proteínas no sobrenadante foram obtidos em XTNS (86%), sendo seguido por XTNSE (82%).

NaCl parece dificultar a extração (protege a célula). EDTA (XTNE) parece reverter um pouco o efeito do NaCl (XTN) na ausência de sacarose.

Valores altos no sobrenadante também são encontrados em XTP, mas, como mencionado anteriormente para o procedimento I, estes valores devem ser decorrentes da turbidez da espermidina e não da extração de proteínas.

3 - Efeito do choque com ultra-som e gelo, na presença de diferentes agentes químicos

Os teores de proteínas encontrados após o procedimento III (Tabela I) de extração são apresentados na Tabela V.

A presença de NaCl não foi suficiente para proteger a célula da ruptura durante o choque já que os valores obtidos para XTN foram superiores aos obtidos para XT.

O EDTA parece, mais uma vez, reverter o efeito do NaCl , como podemos confirmar pela comparação entre XTNE (83%) e XTN (77%).

A presença de espermidina (XTP) altera a turbidez.

4 - Efeito do tratamento contínuo com ultra-som na presença de NaOH

Os teores de proteínas encontrados após o procedimento IV de extração são apresentados na Tabela VI.

Não foi observada diferença significativa entre o método físico (ultra-som) e o físico-químico (ultra-som e NaOH). Ambos se mostraram adequados para a ruptura celular.

5 - Efeito do tratamento descontínuo com ultra-som na presença de NaOH

Os teores de proteínas medidos após o procedimento V (Tabela I) de extração são apresentados na Tabela VII.

Verificamos neste caso, que a presença de NaOH (XOU1) auxiliou na eficiência do método físico (XU1).

A comparação dos resultados das Tabelas VI e VII sugere que o tratamento descontínuo (XOU1) foi melhor do que o contínuo (XOU5) pois levou a total liberação das proteínas no SBN.

Podemos assim sugerir que o tratamento com NaOH e ultra-som produz um resultado melhor do que apenas o uso de ultra-som. Além disso, o tratamento descontínuo (3 pulsos de 30 segundos) é mais eficaz do que o contínuo (5 minutos consecutivos).

6 - Efeito do tratamento descontínuo com ultra-som na presença de NaOH ou lisozima

Os teores de proteínas encontrados após o procedimento VI (Tabela I) de extração são apresentados na Tabela VIII.

Não houve diferença significativa entre os procedimentos enzimático (XT_LLU1) e químico (XT_LU1).

Conclusões

Os resultados obtidos com culturas de células de BRS mesófilas, provenientes de amostras de oleodutos nos permitem dizer que:

- A permeabilização da célula para exposição e quantificação de uma molécula intracelular pode ser alcançada através de diferentes métodos: físico, químico e/ou enzimático.
- Os efeitos do NaCl e da sacarose variam de acordo com o procedimento, devendo ser investigados após a escolha do procedimento adequado, se for de interesse:
  - **NaCl** dificultou a extração a 37°C tanto durante a incubação por 1h (Procedimento I) quanto durante o choque osmótico (Procedimento II) .
  - **Sacarose** dificultou a extração durante a incubação prolongada (37°C/1h), mas não durante o choque com N_2 líquido (Procedimento II) onde, na presença de NaCl, observou-se a maior eficiência de extração
- **EDTA** parece reverter o efeito protetor do NaCl nos procedimentos I (37°C/1h), II (N_2(*l*) /gelo) e III (US/gelo).
- **Espermidina** promoveu forte turvação na amostra interferindo nas análises espectrofotométricas.
- Os tratamentos com ultra-som e gelo (Procedimentos IV e V) realmente favorecem a ruptura da célula. A comparação dos resultados das Tabelas VI e VII sugere que o tratamento descontínuo (XOU1) foi melhor do que o contínuo (XOU5) pois levou a total liberação das proteínas no sobrenadante. Desta forma podemos afirmar que o tratamento com NaOH e ultra-som seria melhor do que apenas o uso de ultra-som e que o tratamento descontínuo (3 pulsos de 30 segundos) é mais eficaz do que o contínuo (5 minutos consecutivos).
- Durante o choque com ultra-som e gelo, não se observou efeito positivo da lisozima nas condições testadas, em comparação com o método químico (Tabela VIII).
- Para as condições testadas, a eficácia do processo de extração cresce na seguinte ordem:

I.XTE(70%) < **III**.XTNE (83%)< **II**.XTNS = **VI.** XT_LLU1 (89%) < **IV**.XOU5 (96%) <**V**.XOU1(100%)

Sugere-se que a determinação de um método de extração adequado de proteínas permitirá a quantificação de determinadas atividades enzimáticas, diretamente relacionadas ao crescimento de células de BRS podendo nos levar ao estabelecimento de estratégias mais sensíveis, rápidas e reprodutivas de **monitoramento** da presença de **BRS** nos sistemas de

interesse. Associados aos **controles** já realizados, estes resultados permitirão também o melhor controle do processo de CIM.

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

Referências bibliográficas

1 - DOWLING, N. J. E.; MITTELMAN, M. W.; WHITE, D. C. The role of consortia in Microbially influenced corrosion. In: MIXED CULTURES IN BIOTECHNOLOGY, Zeikus, J. G. & Johnson, E. A. - McGraw-Hill, 1991.

2 STARKEY, R. L. Anaerobic corrosion – perspectives about causes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICALLY INDUCED CORROSION, Gaythersburg, **Biologically Induced Corrosion: Proceedings**, Houston: NACE, 363 p., 1986.

3 WILLIAMS, R.E; ZIOMEK, E., MARTIN, W.G. Surface stmulated increases in hidrogenase production by sulfate reduzing bacteria: consequenses in corrosion. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICALLY INDUCED CORROSION, Gaythersburg, **Biologically Induced Corrosion:Proceedings**, Houston: NACE, 363 p., 1986.

4 WIDDEL, F. Microbiology and ecology of sulfate and sulfur reducing bacteria. In: BIOLOGY OF ANAEROBIC MICROORGANISMOS. Ed. Zehnder, A. J. B., John Wiley & Sons, p. 469-585, 1988.

5 LINO, R.; FEIO, M.J.; FRANCO, R.; PEREIRA, A..; PINTO, C.; REIS, A.M.; BEECH, I.; LEGALL, J.; MOURA, J.J.G. The role of APS reductase, hydrogenase and sulfite reductase in biocorrosion promoted by sulphate reducing bacteria, **Journal of Inorganic Biochemistry,** 51(1-2)192, 1993

6 SANDERS, P. F. & HAMILTON, W. A. Biological and corrosion activities of sulphate-reducing bacteria in industrial process plant. In: In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICALLY INDUCED CORROSION, Gaythersburg, **Biologically Induced Corrosion: Proceedings**, Houston: NACE, 363 p., 1986

7 STURMAN, P.J.; GOERES, D.M. control of hydrogen sulfide in oil and gás wells with nitrite injection. society of petroleum engineers **SPE** 56772. p 1 – 7

8 CORD-RUWISCH R., KLEINITZ W. and WIDDEL F. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. **J. Petrol. Technology** 39, 97-106, 1987

9 JENNEMAN G.E.; MCINERNEY M.J.; KNAPP R.M. Effect of nitrate on biogenic sulfite production. **Appl. and Environ. Microbiol**. 51, 1205-1211, 1986

10 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

11 CROLET, J.L. From biology and corrosion to biocorrosion **Oceanologica Acta**. 15, 87-94, 1992

12 POSTGATE, J. R. The sulphate-reducing bacterial Cambridge University Press, Cambridge, 1979,.

13 HITZMAN, D.O.; SPERL, G.T.; SNADBECK, K.A.method for reducing the amount of and preventing the formation of hydrogen sulfide in an aqueous system", US Patent 5,405,531. US Patent and Trademark Office, Washington, DC, 6 pp. ,1995

14 HITZMAN, D.O.; SPERL, G.T.; SNADBECK, K.A.. Composition for reducing the amount of and preventing the formation of hydrogen sulfide in an aqueous system,

particularly in an aqueous system used in oil field applications, US Patent 5,750,392. US Patent and Trademark Office, Washington, DC, 7 pp., 1998

15 JENNEMAN, G.E.; GEVERTZ, D.,Sulfide –oxidizing bacteria". US Patent 5,686,293. US Patent and Trademark Office, Washington, DC, 9 pp., 1997

16 DAUMAS, S.; MARGOT, M.; CROLET, J.L. Measurement of the net production of acidity by a sulphate reducing bacterium:experimental checking of theoretical models of microbially influenced corrosion , **Res.Microbiol**., 144, 327-332, 1993

17 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

18 PETERSON G.L., In METHODS IN ENZYMOLOGY 91, 95-111, 1983.

Tabela I – Condições de extração de proteínas de células de uma cultura de BRS

PROCE-DIMENTO	CÓDIGO	CÉLULA	AGENTE QUÍMICO	US	GELO	N_2 LÍQUIDO	37^oC	ENZIMA	TEMPO
I	XT	+	T	-	-	-	+	-	1h
	XTN	+	T, N	-	-	-	+	-	1h
	XTE	+	T, E	-	-	-	+	-	1h
	XTS	+	T, S	-	-	-	+	-	1h
	XTPN	+	T, P, N	-	-	-	+	-	1h
II	XT	+	T	-	-	+	+	-	30s x 30s (3X)
	XTNE	+	T, N, E	-	-	+	+	-	30s x 30s (3X)
	XTNS	+	T, N, S	-	-	+	+	-	30s x 30s (3X)
	XTNSE	+	T, N, S, E	-	-	+	+	-	30s x 30s (3X)
	XTP	+	T, P	-	-	+	+	-	30s x 30s (3X)
	XTN	+	T, N	-	-	+	+	-	30s x 30s (3X)
III	XT	+	T	+	+	-	-	-	30s x 30s (3X)
	XTNE	+	T, N, E	+	+	-	-	-	30s x 30s (3X)
	XTP	+	T, P	+	+	-	-	-	30s x 30s (3X)
	XTN	+	T, N	+	+	-	-	-	30s x 30s (3X)
IV	XU5	+	-	+	-	-	-	-	5 min
	XOU5	+	O	+	-	-	-	-	5 min
V	XU1	+	-	+	+	-	-	-	60s/60s (3X)
	XOU1	+	O	+	+	-	-	-	60s/60s (3X)
VI	XT_LOU1	+	T_L O	+	+	-	-	-	60s/60s (3X)
	XT_LU1	+	T_L	+	+	-	-	-	60s/60s (3X)
	XT_LLU1	+	T_L	+	+	-	-	L	60s/60s (3X)
	XT_LBLU1	+	T_L	+	+	-	-	L, B	60s/60s (3X)

+ = presença, - = ausência, X = célula, T= Tris-HCl, T_L= T+S+P+N, N = NaCl, E = EDTA, S = sacarose, P = espermidina, O=NaOH, B= benzonase, L = lisozima

Tabela II – Características das amostras utilizadas nos procedimentos de extração.

PROCEDIMENTO	AMOSTRA BRS-M	PESO SECO (mg/mL)
I (37°C/1h)	PCE-1 Ponto A Fluido	1,28
II (N2 (l)/37ºC - 3 x 30 s)	PCE-1 Ponto A Fluido	1,47
III (US/gelo - 3 x 30 s)	PGP-1 Ponto A Resíduo	1,58
IV (NaOH + US - 5min)	PGP-1 Ponto A Fluido	2,29
V (NaOH + US - 3 x 1min)	PGP-1 Ponto A Fluido	2,29
VI (LISOZIMA +US/gelo - 3 x 1 minuto)	PGP-1 Ponto A Resíduo	Nd

Tabela III – Teor de proteínas em BRS submetidas à incubação a 37°C, por 1 hora na presença de diferentes agentes químicos (Procedimento I).

CÓDIGO	S(%)	P(%)
XT	66	34
XTN	56	44
XTE	70	30
XTS	39	61
XTPN	82	18

S: Sobrenadante (fração solúvel), P: precipitado (fração insolúvel)
X = célula, T= Tris-HCl, N = NaCl, E = EDTA, S = sacarose, P = espermidina,

Tabela IV – Teor de proteínas em BRS submetidas ao choque com nitrogênio líquido e banho a 37ºC na presença de diferentes agentes químicos (Procedimento II).

CÓDIGO	S(%)	P(%)
XT	61	39
XTNE	63	37
XTNS	86	14
XTNSE	82	18
XTP	76	24
XTN	57	43

S: Sobrenadante (fração solúvel), P: precipitado (fração insolúvel)
X = célula, T= Tris-HCl, N = NaCl, E = EDTA, S = sacarose, P = espermidina,

Tabela V – Teor de proteínas em BRS submetidas à choque com ultra-som e gelo, na presença de diferentes agentes químicos (Procedimento III).

CÓDIGO	S(%)	P(%)
XT	68	32
XTNE	83	17
XTP	80	20
XTN	77	23

S: Sobrenadante (fração solúvel), P: precipitado (fração insolúvel)
X = célula, T= Tris-HCl, N = NaCl, E = EDTA, S = sacarose, P = espermidina

Tabela VI – Teor de proteínas em BRS submetidas ao tratamento contínuo com ultra-som na presença de NaOH (Procedimento IV).

CÓDIGO	S(%)	P(%)
XU5	93	7
XOU5	96	4

S: Sobrenadante (fração solúvel), P: precipitado (fração insolúvel)
U: ultra-som, O: NaOH, 5: 5 minutos, X = célula.

Tabela VII – Teor de proteínas em BRS submetidas ao tratamento descontínuo com ultra-som na presença de NaOH (Procedimento V).

CÓDIGO	S(%)	P(%)
XU1	95	5
XOU1	100	0

S: Sobrenadante (fração solúvel), P: precipitado (fração insolúvel)
U: ultra-som, O: NaOH, 1: 1 minuto1, X = célula.

Tabela VIII – Teor de proteínas em BRS submetidas ao tratamento descontínuo com ultra-som e gelo na presença de NaOH ou lisozima (Procedimento IV).

CÓDIGO	S(%)	P(%)
XT_LOU1	89	11
XT_LU1	89	11
XT_LLU1	86	14
XT_LBLU1	86	14

S: Sobrenadante (fração solúvel), P: precipitado (fração insolúvel)
X = célula, T_L= T+S+P+N, N = NaCl, S = sacarose, P = espermidina,
O=NaOH, B= benzonase, L = lisozima, U: ultra-som, 1: 1 minuto