

Copyright 2012, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2012, em Salvador/BA no mês de maio de 2012.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Avaliação de metodologia rápida para determinação de APS redutase:

Etapa II – Quantificação

Fatima V. Pereira-Meirelles^a, Ivani de Souza Bott^b, Monica de Oliveira Penna^c, Ana Carla Cruz de Albuquerque Barbosa^d

Abstract

It is well known that sulfate is the major form of sulfur available in nature and that the principal enzyme of sulfate reduction pathway is APS reductase. The sulfite formed in this pathway can be reduced to sulfides, such as iron sulfides or hydrogen sulfide, undesirable products that cause problems for the petroleum industry. It seems that as higher are APS reductase levels higher is H₂S production. The principal group of microorganisms involved with this process is called sulfate-reducing-bacteria, SRB. Thus, it is possible to suggest that APS reductase can be used as a biomarker for the presence of SRB and the determination of its activity can be, in the future, useful to quicker control the corrosion influenced by microorganisms, CIM. In a previous work several methods of protein extraction were tested with the aim of choosing an adequate one to lyse such bacterial culture in order to extract APS reductase. The second part, presented here, presents APS reductase activity levels in small amounts of SRB cells. The results show that APS reductase can be quantified in enriched SRB cultures obtained from field samples.

Keywords: Biocorrosion, BRS, APS reductase, protein, enzyme

Resumo

O íon sulfato é uma das principais formas de ocorrência do enxofre na natureza e a principal enzima de sua via de redução é a APS redutase. O sulfeto formado na via pode ser reduzido a sulfeto, formando sulfeto de ferro, insolúvel, ou sulfeto de hidrogênio, causando problemas nas indústrias de petróleo. Parece que células com altas atividades da APS redutase também apresentam maiores taxas de produção de H₂S. O principal grupo de micro-organismos envolvido neste processo é constituído de bactérias redutoras de sulfato, BRS. Esta observação sugere que a APS redutase pode ser utilizada como um biomarcador da presença de BRS em amostras ambientais e que a investigação da sua atividade permitirá, no futuro, um melhor controle da corrosão influenciada por micro-organismos, CIM. Em trabalho anterior, vários métodos de extração de proteínas foram testados com o objetivo de escolher o mais adequado para a extração da APS redutase. O presente trabalho apresenta os valores de atividade da APS redutase, segunda etapa deste estudo, obtidos em pequenas quantidades de células. Foi possível quantificar a APS redutase extraída de culturas enriquecidas de BRS obtidas de amostras de campo.

Palavras-chave: Biocorrosão, BRS, APS redutase, proteínas, enzimas

^a Doutor, Bioquímica – PUC-Rio

^b Doutor, Metalurgia - PUC-Rio

^c Mestre, Química Inorgânica - PETROBRAS S.A.

^d Mestre, Engenharia de Petróleo - PETROBRAS S.A.

Introdução

Bactérias redutoras de sulfato, BRS, são células extremamente importantes devido ao seu envolvimento nos processos de corrosão influenciada por micro-organismos, CIM (1). Por esta razão, 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.

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).

A literatura reporta que as vias de redução desassimilativa de sulfato e oxidação de sulfeto envolvem várias enzimas. Resumidamente pode-se dizer que o primeiro passo deste processo é a ativação do sulfato pela sua conversão a adenosina fosfosulfato (APS). Em seguida, APS é reduzido a sulfito e AMP e depois o sulfito é reduzido a sulfeto. A enzima chave deste processo é a APS redutase, uma enzima intracelular. Dzierzewicz e colaboradores (4) mostraram que cepas de *D.desulfuricans* possuindo altas atividades da APS redutase e da hidrogenase também apresentaram maiores taxas de produção de H₂S.

A localização intracelular da APS redutase dificulta a determinação de sua atividade. Devido a grande diversidade de micro-organismos existentes e de suas diferentes características em função do meio onde se encontram, diversos métodos de ruptura para células bacterianas são encontrados na literatura. Assim, tornou-se necessário o estabelecimento de uma metodologia adequada de ruptura celular (5), para exposição da APS redutase e posterior medida da sua atividade da APS redutase. A quantificação desta enzima torna-se portanto, uma ferramenta poderosa que poderá auxiliar no estabelecimento de estratégias a serem utilizadas para melhor controle da CIM.

Neste sentido, este trabalho apresenta os valores da atividade da APS redutase, resultados da segunda etapa deste estudo, obtidos com pequenas quantidades celulares. Foi possível quantificar a APS redutase extraída de culturas enriquecidas de BRS obtidas de amostras de campo.

Metodologia

Crescimento celular e produção da enzima

Células de BRS mesófilas, provenientes de amostra de oleodutos eram inoculadas em meio Postgate-E modificado e incubadas à 30°C por 48h, em duplicata. Após este tempo, um dos frascos era utilizado para determinação do peso seco e o outro como pré-inóculo para obtenção da curva de crescimento das BRS. De tempos em tempos, 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.

O crescimento celular era monitorado pela determinação do peso seco onde uma alíquota do filtrado F era passada através de uma membrana de 0,22 μm e as células retidas colocadas na estufa a 60°C para secagem até massa constante. Paralelamente, era realizada a contagem de células pelo método do número mais provável, NMP (6).

Ruptura celular e extração da enzima

O filtrado F, contendo células de BRS era submetido ao tratamento de extração como indicado em cada caso.

O teor de proteínas era determinado em cada fração extraída. Para isto, diferentes alíquotas dos sobrenadantes e dos precipitados obtidos no processo de extração eram colocadas em tubos de ensaio e o volume completado a 400 μL . Era adicionado o reagente A, descrito para o método de Lowry (7) e após 10 min à temperatura ambiente adicionava-se 200 μL do reagente de Folin-Ciocalteu. Decorridos mais 30 minutos a absorvância era lida a 750 nm e as leituras correlacionadas com as concentrações de proteínas, de acordo com Peterson (8). Vale ressaltar que os precipitados eram ressuspensos em água antes de serem dosados.

A tabela 1 resume os diferentes procedimentos de ruptura celular utilizados (5)

Dosagem da APS redutase

Após a extração da enzima, uma alíquota do sobrenadante ou do precipitado ressuspense era adicionada em um sistema contendo AMP e sulfito de sódio na presença de ferricianeto de potássio. A redução do ferricianeto (amarelo), acoplada à oxidação do AMP leva a formação de ferrocianeto (incolor). A variação de cor pode ser acompanhada qualitativa ou quantitativamente, sendo esta proporcional a atividade da enzima presente.

A tabela 2 mostra esquematicamente a variação da cor do padrão que será utilizada como referência para avaliação de todos os resultados aqui apresentados.

A avaliação qualitativa da presença da APS redutase foi conduzida na presença de tampão Tris-HCl, pH 7,6, sulfito de sódio, AMP e ferricianeto de potássio a 25°C, por diferentes intervalos de tempo.

Para quantificação da APS redutase foi construída inicialmente a curva padrão de ferricianeto de potássio. Em seguida, a atividade enzimática foi acompanhada pela adição do sobrenadante ou precipitado ao sistema reacional.

Uma unidade (U) de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de transformar um micromol de ferricianeto por minuto nas condições de reação.

Simultaneamente, a estabilidade do sistema reacional utilizado na dosagem da APS redutase foi investigada na presença das diferentes substâncias utilizadas nos testes de extração e de dosagem da APS redutase.

Resultados e discussão

Monitoramento do crescimento de BRS por diferentes métodos

A curva de crescimento de uma cultura mista de BRS foi construída. Os resultados são apresentados na figura 1 em NMP, peso seco e teor de proteínas.

Observa-se que as curvas tem a mesma tendência, sugerindo que é possível monitorar o crescimento bacteriano desta cultura por qualquer um dos 3 métodos. O valor mais elevado de proteína no tempo de 2 horas pode ser decorrente da proteína residual no meio de cultura.

Medida da atividade da APS redutase em células de BRS

A - Estabilidade dos Reagentes

Inicialmente foi necessário realizar experimentos controles com intuito de detectar qualquer interferência (reação paralela) dos componentes das amostras na reação enzimática de interesse, pois estas reações poderiam fornecer resultados conhecidos como falso positivos. Assim, a estabilidade do reagente de cor na presença das diferentes substâncias utilizadas nos testes de extração foi acompanhada.

A figura 2 apresenta os resultados obtidos para a absorvância do sistema reacional utilizado para determinação da atividade da APS redutase que foi monitorada inicialmente por 15 minutos na presença (curva superior) ou ausência (curva inferior) de células ou enzima.

Observa-se na curva inferior que a absorvância se manteve constante durante este tempo de incubação, ou seja, não houve oxidação espontânea do sulfito, o que nos permite dizer que podemos realizar os experimentos futuros em pelo menos 15 minutos de reação. A estabilidade dos reagentes a tempos maiores será mostrada mais adiante.

Quando adicionou-se uma cultura mista de BRS aos reagentes anteriormente mencionados, não observou-se diminuição da concentração de ferricianeto, uma vez que não houve variação de cor, o que nos permite confirmar a idéia inicial de que não é possível detectar atividade da APS redutase no tempo indicado, na cultura íntegra. A queda observada (curva superior) na figura 2 foi devida à sedimentação da cultura durante o ensaio, confirmando assim a necessidade de ruptura da célula para exposição da enzima à presença do reagente.

A tabela 3 mostra os resultados obtidos quando o mesmo sistema reacional é incubado na presença das diferentes espécies utilizadas no procedimento de extração.

Os resultados da tabela 3 permitem dizer que a mistura reagente a ser utilizada no ensaio da APS redutase se mostrou estável na presença de todos os componentes do sistema de extração, por pelo menos 24h. A maioria se manteve estável até 120h.

A tabela 4 mostra os resultados do teste de estabilidade para todos os reagentes envolvidos no ensaio da APS redutase, em diferentes combinações.

Verifica-se que, nas condições de ensaio na ausência da enzima, todos os reagentes mantiveram sua coloração original por pelo menos 2 horas. Com 24h de incubação nota-se variação da coloração na presença de AMP (TAF e TAFSU). A queda de 5+ para 4+ é devida à diluição da solução.

B - Atividade da APS redutase: análise qualitativa

Devido ao grande número de amostras provenientes dos testes de extração (5), inicialmente foram realizados ensaios qualitativos onde o desaparecimento da coloração do reagente contendo ferricianeto foi acompanhado visualmente por diferentes intervalos de tempo. As tabelas 5 e 6 mostram os resultados obtidos com os sobrenadantes e com os precipitados dos diferentes procedimentos de extração.

Observa-se pelos resultados apresentados variação de cor a partir de 19h de incubação em todas as amostras submetidas aos procedimentos de extração I, II e III. Nas mesmas condições verifica-se que esta variação é decorrente da reação não enzimática ou da perda de estabilidade do reagente após este tempo (TAF e TAFSU, tabela 4). Pode-se dizer então que os procedimentos I, II e III de extração não foram tão adequados quanto os demais, para a exposição da enzima de forma a permitir a determinação qualitativa da APS redutase nas amostras em questão.

Por outro lado, os procedimentos IV e V forneceram resultados promissores. O procedimento IV parece ser melhor do que os três anteriores, uma vez que em menos de 2h nota-se uma diferença significativa de coloração nas amostras extraídas com ultra-som (XOU5 e XU5). Na presença de NaOH (XOU5) o efeito é mais rápido, ou seja, uma maior atividade enzimática é detectada. O tratamento descontínuo de extração (Procedimento V) também parece fornecer resultados satisfatórios, já que em 30 minutos nota-se a variação de coloração do sistema reacional, ainda que em menor extensão que o anterior (XOU5).

Tendo sido verificado que o sistema reacional nas condições testadas permitiu a verificação da atividade da APS redutase em pelo menos duas situações, utilizou-se as mesmas condições nos ensaios quantitativos.

C - Atividade da APS redutase: análise quantitativa

Para a determinação quantitativa da atividade da APS redutase, as absorvâncias de cada ensaio foram acompanhadas por uma hora. A figura 3 mostra a curva típica do decaimento da cor do ferricianeto de potássio nos tempos iniciais do ensaio com o sobrenadante .

Sabendo-se que *1 unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de gerar 1 μmol de ferrocianeto em um minuto de reação nas condições de ensaio* pôde-se determinar a atividade enzimática em cada fração através da correlação entre a absorvância e a concentração de ferricianeto de uma curva padrão previamente construída.

A tabela 7 apresenta as atividades enzimáticas obtidas em cada uma das frações analisadas. Verifica-se que a enzima foi extraída e manteve-se ativa em todas as condições testadas, porém, os procedimentos IV e V, envolvendo a combinação de métodos físicos e químicos de extração, forneceram resultados muito superiores aos demais.

Como não houve precipitado após a extração pelo procedimento V, não foi realizada a análise quantitativa para estas frações.

Comparando-se os valores máximos de atividade da APS redutase encontrados nos sobrenadantes e nos precipitados verificamos que estes são muito diferentes. Verificamos assim, que a APS redutase foi realmente extraída nas condições dos testes e que a enzima se manteve estável durante todas as etapas, podendo ser dosada.

Conclusões

Para o estudo de extração de proteínas em células bacterianas APS redutase, a literatura reporta diversos métodos de ruptura celular. Basicamente podemos dividi-los em três grupos: físicos, químicos e enzimáticos. Neste trabalho reportamos os resultados obtidos com os dois primeiros. Após a ruptura celular utilizando cinco diferentes procedimentos (Tabela 1) os sobrenadantes e os precipitados das amostras obtidas foram submetidos à incubação nas condições de reação para determinação da atividade da APS redutase.

Do ponto de vista qualitativo (tabela 5), os procedimentos de extração por incubação a 37°C por 1h (Procedimento I), choque com nitrogênio líquido (Procedimento II) ou choque com ultra-som e gelo (Procedimento III) não permitiram a verificação da atividade enzimática. Por outro lado, os procedimentos IV e V parecem ser os mais adequados para a detecção da atividade da APS redutase, ou seja: a técnica envolvendo a extração com NaOH associado ao ultra-som pode ser utilizada para determinação da atividade da APS redutase com sucesso.

Os resultados das análises quantitativas apresentados na tabela 6 mostra que é possível determinar a atividade da APS redutase nas amostras cultivadas, ainda que estejam presentes pequenas quantidades de proteínas. A análise quantitativa foi possível mesmo para as amostras extraídas pelos procedimentos I, II e III onde, qualitativamente não foi possível sua visualização.

Como fase posterior, a metodologia será aplicada na realização de estudos cinéticos e na avaliação da concentração de células de BRS em amostras de campo, reduzindo o tempo de sua quantificação. Espera-se estabelecer uma correlação entre a atividade da APS redutase, o crescimento das BRS e a CIM.

Referências bibliográficas

(1) 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

(2) 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.

(3) CORD-RUWISCH R., KLEINITZ W. and WIDDEL F. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. **Journal of Petroleum Technology** 39, 97-106 1987

-
- (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) PEREIRA-MEIRELLES, F.V., BOTT, I.S., SILVA, L.T.M., DA SILVA, M.I.P., ANDRADE, M.M. e PENNA, M.O., Avaliação de metodologias rápidas para quantificação de APS redutase: Etapa I - Extração de Proteínas In: INTERCORR2008, Recife INTERCORR_101 2008.
- (6) POSTGATE, J. R. In: **The sulfate reducing bacteria**. 2ed. Cambridge: University Press, 209p 1984
- (7) LOWRY O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; DAVIDSON, J.T. Protein determination with Folin Phenol Reagent **Journal of Biological Chemistry**, 193, 265-275, 1951
- (8) PETERSON G.L., Determination of total protein In: **Methods in Enzymology**, 91, 95-111 1983.
- (9) PECK Jr., H.D., DEACON, T.E. e DAVIDSON, J.T. Studies on adenosine 5'-phosphosulfate reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* e *Thiobacillus thioparus*" **Biochimica et Biophysica Acta** 96, 429-446 1965"

Tabela 1 - Procedimentos de ruptura de células de BRS utilizados para avaliação da atividade da APS redutase

Procedimento	Condições
I	Incubação à 37°C, por 1 hora.
II	Choque com nitrogênio líquido e banho a 37°C.
III	Choque com ultra-som e gelo.
IV	Tratamento contínuo com NaOH e ultra-som por 5 minuto.
V	Tratamento descontínuo com NaOH e ultra-som em pulsos de 1 minuto.

Tabela 2 - Escala de cor do padrão de ferricianeto de potássio (reagente de cor para o teste da APS redutase)

Reagente de cor	Perda gradativa da cor decorrente do progresso da reação				
5+	4+	3+	2+	1+	0
Padrão					Branco

Quanto mais rápida for a perda de cor, maior a atividade da enzima.

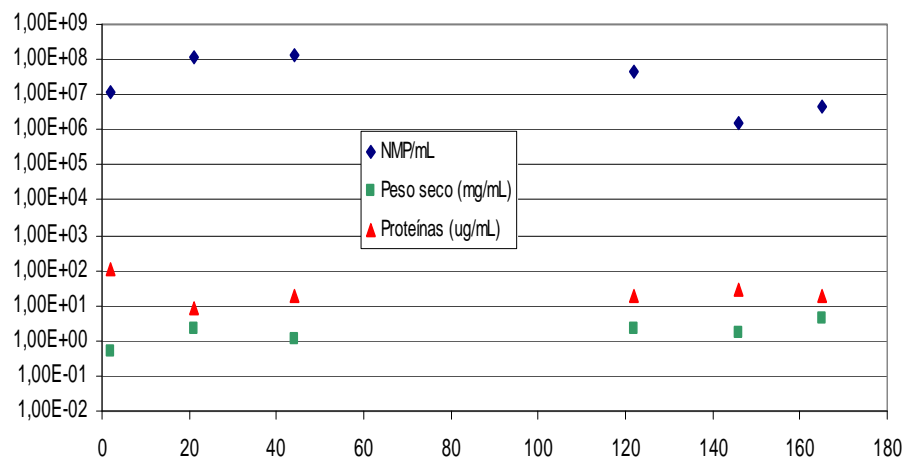


Figura 1 – Crescimento de uma cultura mista de BRS em função do tempo. (♦) NMP/mL, (■) Peso seco (mg/mL), (▲) [Proteína] (mg/mL). Tempo em horas.

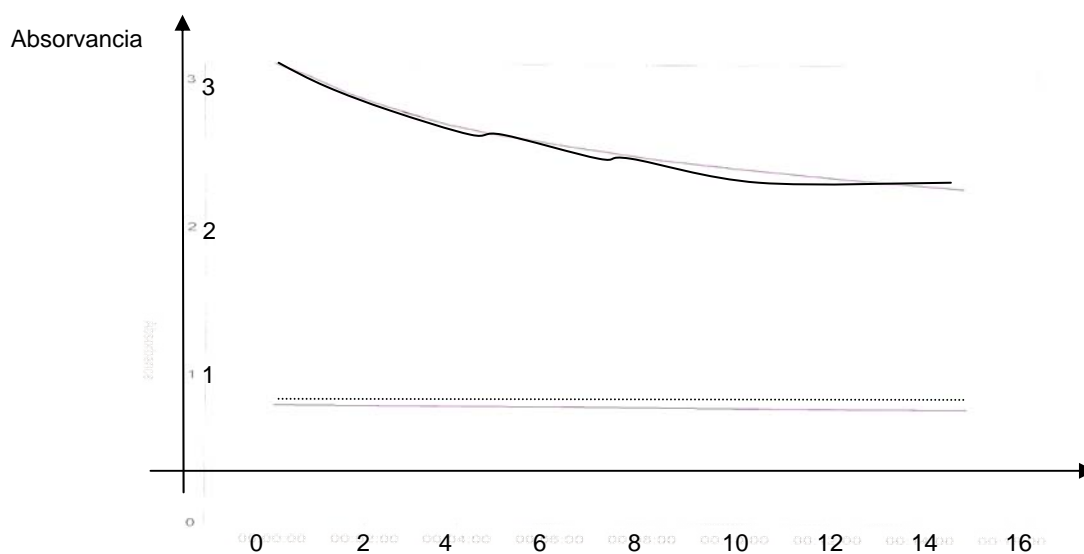


Figura 2 – Estabilidade da solução de ferricianeto de potássio na presença de sulfito de sódio e AMP na ausência (curva inferior) ou presença (curva superior) de BRS

Tabela 3 – Estabilidade do reagente de cor do teste da APS redutase na presença de diferentes componentes do sistema de extração

Aditivos	Tempo de observação				
	0h	0,5h	2h	24h	120h
+T	4+	4+	4+	4+	4+
+N	4+	4+	4+	4+	4+
+E	4+	4+	4+	4+	4+
+P	4+	4+	4+	4+	0
+S	4+	4+	4+	4+	4+

T= Tris-HCl, N = NaCl, E = EDTA, P = espermidina, S = sacarose

Tabela 4 – Estabilidade dos reagentes utilizados no ensaio da APS redutase

	Tempo de observação			
	0h	0,5h	2h	24h
T	0	0	0	0
TF	5+	5+	5+	5+
TSU	0	0	0	0
TAF	4+	4+	4+	2+
TFSU	0	0	0	0
TAFSU	4+	4+	4+	2+

T= Tris-HCl, A = AMP, F = ferricianeto de potássio, SU = Sulfito de sódio,

Tabela 5 – Detecção da atividade da APS redutase nos sobrenadantes obtidos após diferentes procedimentos e ruptura celular.

Procedimento	Amostra	Intensidade de cor após ~h							
		0	0,5	0,8	1,0	1,5	2,0	19	21,0
Controles	TAF	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+
	TAFSU	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	T	0	0	0	0	0	0	0	0
	TFSU	0	0	0	0	0	0	0	0
	TF	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
	TSU	0	0	0	0	0	0	0	0
I	XTamb	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XT	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTN	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTS	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTNS	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTNE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTSE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	TNSE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
II	XTamb	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XT	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTN	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTS	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTNS	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTNE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTSE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XNSE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
III	XTamb	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XT	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTN	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTS	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTNS	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTNE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	XTSE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
	TNSE	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
IV	XOU5	4+	4+	1+	1+	0	ND	ND	ND
	XU5	4+	4+	4+	4+	2+	1+	ND	ND
	X5	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
V	XOU1	4+	3+	3+	3+	ND	ND	0	ND
	XU1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	ND
	X1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	ND

Tabela 6 – Detecção da atividade da APS redutase nos precipitados obtidos após diferentes procedimentos e ruptura celular.

Procedimento	Amostra	Intensidade de cor após ~h					
		0	0,5	0,8	1,0	17,5	18,5
Controles	TAF	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	TAFSU	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	T	0	0	0	0	0	0
	TFSU	0	0	0	0	0	0
	TF	5+	5+	5+	5+	5+	5+
	TSU	0	0	0	0	0	0
I	XTamb	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XT	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTN	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTS	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTNS	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTNE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTSE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	TNSE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
II	XTamb	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XT	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTN	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTS	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTNS	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTNE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTSE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XNSE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
III	XTamb	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XT	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTN	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTS	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTNS	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTNE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	XTSE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	TNSE	4+	4+	4+	4+	3+	3+
IV	XOU5	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	XU5	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	X5	4+	4+	4+	4+	4+	4+
V	XOU1	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	XU1	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	X1	4+	4+	4+	4+	4+	4+

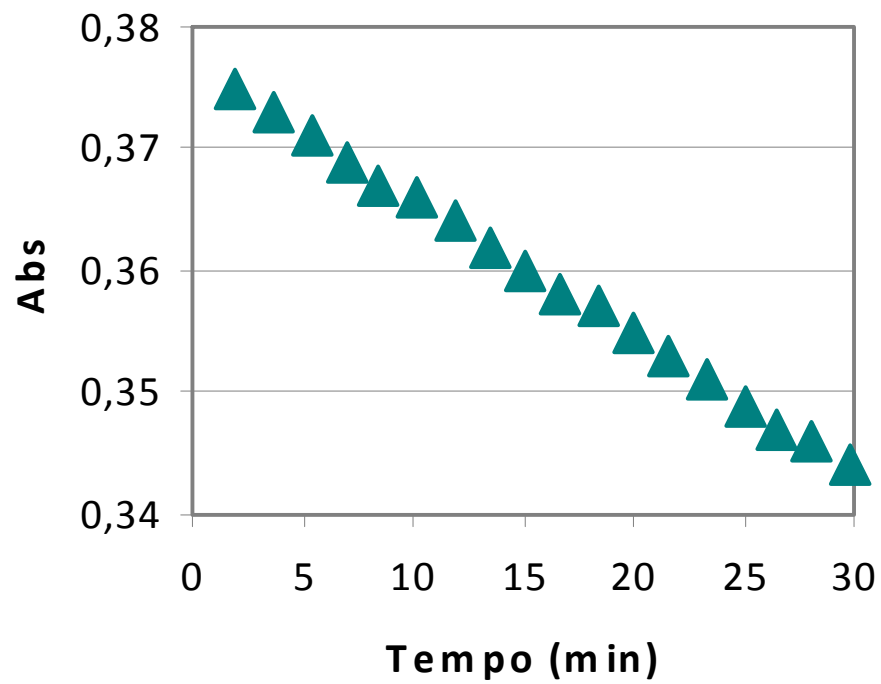


Figura 3 – Curva típica do progresso da reação enzimática da APS redutase. Sobrenadantes obtidos após a ruptura de células de BRS. O decaimento da Abs é diretamente proporcional à atividade da APS redutase

Tabela 7– Quantificação da APS redutase em células de BRS submetidas a diferentes procedimentos de extração.

Procedimento	Atividade →	PP (U/L)	SBN (U/L)
CONTROLE		0	0
I	XTamb	162	192
	XT	236	206
	XTN	162	206
	XTE	74	309
	XTS	162	192
	XTNS	162	309
	XTNE	15	162
	XTSE	88	177
	TNSE	133	251
II	XTamb	236	206
	XT	309	177
	XTN	280	162
	XTE	295	309
	XTS	295	251
	XTNS	251	265
	XTNE	177	265
	XTSE	147	15
	XNSE	236	177
III	XTamb	118	192
	XT	280	177
	XTN	177	177
	XTE	221	309
	XTS	221	236
	XTNS	368	295
	XTNE	59	295
	XTSE	221	177
	TNSE	251	236
IV	XOU5	575	2166
	XU5	206	44
	X5	221	206
V	XOU1	Nd	2844
	XU1	Nd	13
	X1	Nd	147

X = célula, T= Tris-HCl, N = NaCl, E = EDTA, S = sacarose, O=NaOH, ND =não determinado