



Quantificação de Proteínas Totais de Bactérias Diazotróficas Crescidas em Meio de Cultivo Semi-Sólido

Helma Ventura Guedes¹
Liamara Perin²
Verônica Massena Reis³
José Ivo Baldani³
Kátia Regina dos Santos Teixeira³

Introdução

A metodologia de determinação de proteínas totais por espectrofotometria é rotineiramente utilizada por profissionais, tanto ligados à indústria de alimentos e laboratórios de análises clínicas, como por pesquisadores de diversas áreas do conhecimento. Na agricultura, pode ser usada na quantificação de processos como a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) e produção de fitormônios.

Os métodos espectrofotométricos geralmente mais utilizados para determinação de proteínas totais são o do Biureto, Bradford e o de Lowry (ZAIA et al., 1998). Apesar da alta sensibilidade, estes métodos estão sujeitos a agentes interferentes e é necessário avaliar quais condições específicas serão utilizadas. Geralmente para quantificar a FBN relaciona-se a atividade da nitrogenase, medida através da técnica de redução de acetileno, com a dosagem de proteínas totais que é determinada a partir de bactérias crescendo em meio de cultura semi-sólido. Nesta condição, além das células bacterianas, estão presentes diferentes substâncias como por exemplo sais e ágar provenientes do meio de cultura, que podem provocar a formação de precipitados e interferir na reação. Para esta situação específica, foi adaptada a metodologia de quantificação de proteínas totais de culturas bacterianas puras em meio semi-sólido utilizando-se o método de Lowry (LOWRY et al., 1951), que mesmo após sua introdução na década de 80, ainda é atual (TEIXEIRA, 1991). O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente de Folin-Ciocalteu), que

sofre redução quando reage com proteínas na presença de cobre e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

Metodologia

1- Crescimento das culturas bacterianas:

Para este ensaio foram testadas as estirpes PAL5 (BR11281), PAL3 (BR11280), AF32 (BR11529), PRJ55 (BR11300) e PPe4 (BR11284) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e BR11340 de *B. brasilensis* e BR119119 de *B. silvatlantica*, obtidas da coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia.

Uma colônia característica de cada isolado foi inoculada em tubo de ensaio contendo 5 ml de meio de cultura líquido DYGS (BALDANI, 1996), permanecendo sob agitação constante de 150 rpm por 18 h a 30°C. Desta suspensão, 20 µl foi inoculado no meio do meio de cultura, em frascos com capacidade de 10 ml, contendo 5 ml de meio de cultura semi-sólido, em triplicata. Os meios de cultura, LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995) para *Gluconacetobacter diazotrophicus* e BMGM (ESTRADA DE LOS SANTOS, 2001) para *Burkholderia*, foram usados sem o corante azul de bromotimol e nitrogênio.

2- Dosagem de proteínas das culturas bacterianas:

Após o período de incubação os frascos foram submetidos ao agitador de mesa para tubos de ensaio, até a completa homogeneização da película e o meio de cultura.

¹ Doutoranda em Biotecnologia Vegetal, UFRJ-Embrapa Agrobiologia. Av. Carlos Chagas Filho, n. 373 – Cidade Universitária, 21941-902, Rio de Janeiro/RJ.

² Pós Doutoranda em Ciência do Solo, Embrapa Agrobiologia. BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, 23890-000 Seropédica, RJ. E-mail: liaperin@yahoo.com.br

³ Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, 23890-000 Seropédica, RJ – E-mails: veronica@cnpab.embrapa.br, ibaldani@cnpab.embrapa.br, katia@cnpab.embrapa.br

Uma alíquota de 100 µl da amostra homogeneizada da cultura crescida foi colocada em tubos de ensaio, contendo 400 µl de água destilada estéril, para diluir a amostra e 500 µl de NaOH 1M (40 g de NaOH em 1 L de água) para lisar as células. Os tubos foram submetidos ao agitador de mesa para tubos de ensaio, aquecidos por 5 minutos a 100°C, para extração das proteínas totais e desnaturação do ágar.

Posteriormente foi adicionado 2,5 mL do reagente de Lowry, pH 7,0, contendo uma mistura de vários reagentes nas seguintes proporções e ordem descritas a seguir:

- 50 mL de solução de carbonato de sódio (50 g de Na₂CO₃ em 1 L de água),
- 1 mL de solução de tartarato de sódio e potássio (20 g de tartarato duplo de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆. 4H₂O em 1 L de água)
- 1 mL de solução de sulfato de cobre (10 g CuSO₄.5H₂O em 1 L de água).

A seguir, os tubos foram agitados e incubados por 10 minutos no escuro. Em seguida foi adicionado 500 µl do reagente de Folin-Ciocalteu 1M, diluído na proporção de 1 porção de reagente para 2 porções de água, e incubados no escuro por 30 minutos. Após incubação foi lida a absorbância a 750 nm em espectrofotômetro. Para zerar o aparelho, foram utilizadas como branco amostras contendo 100 µl de meio de cultivo semi-sólido (BMGM ou LGI-P), submetidos ao mesmo tratamento como descrito acima.

A concentração de proteínas foi determinada usando-se a curva padrão obtida pelos valores de absorbância das quantidades conhecidas da proteína Albumina Bovina.

3- Curva padrão:

- Aqueceu-se 100 µl do meio de cultivo semi-sólido (BMGM ou LGI-P) contendo 500 µl de NaOH 1M e 400 µl de água destilada estéril, durante 5 min à 100°C.
- Dissolveu-se a solução estoque de Albumina de Soro Bovina (BSA ou Bovine Serum Albumin) (0,3 mg/ml) no meio de cultivo previamente fervido nas seguintes concentrações: 7,5 µg/ml, 15 µg/ml, 22,5 µg/ml, 30 µg/ml, 45 µg/ml, 60 µg/ml, 75 µg/ml, 90 µg/ml, 120 µg/ml e 150 µg/ml.

Posteriormente seguiu-se as etapas de determinação da proteína total pelo método de Lowry como descrito no item 2.

Resultados e discussão

Curva de calibração padrão para o meio LGI-P

A partir dos valores da absorbância para concentrações conhecidas de BSA, obtidas em espectrofotômetro (Tabela 1) foi calculada a curva de calibração padrão (Figura 1). Pelo resultado obtido para o meio LGI-P, pode-se observar uma boa correlação linear ($R^2 = 0,9907$) na faixa entre 7,5 a 150 µg/mL. Com a equação da reta obtida, foi possível determinar a concentração de proteínas (mg/mL) provenientes das células, medindo a absorbância da amostra no comprimento de onda ótimo: 750 nm.

Tabela 1 – Valores de absorbância para concentrações conhecidas de BSA diluídas em meio LGI-P, medidas à 750 nm. Média de três repetições.

Concentração (mg/mL)	Absorbância (750 nm)
0,0075	0,021
0,015	0,068
0,0225	0,088
0,03	0,162
0,045	0,184
0,06	0,226
0,075	0,287
0,09	0,336
0,12	0,448
0,15	0,536

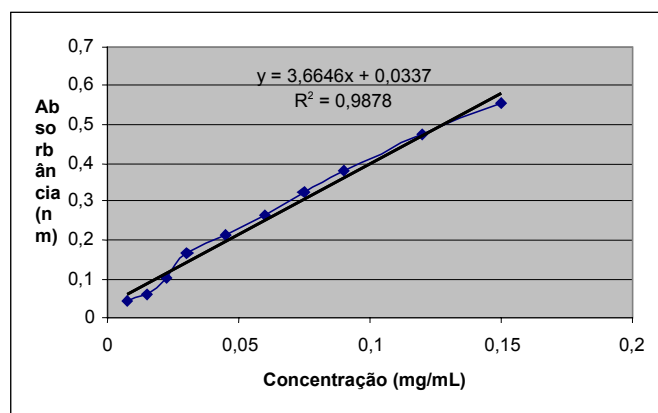


Figura 1 - Curva de calibração padrão da concentração de proteína (BSA) em mg/mL no meio semi-sólido LGI-P; Absorbância medida à 750 nm.

Curva de calibração padrão para o meio BMGM

A partir dos valores da absorbância para concentrações conhecidas de BSA, obtidas em espectrofotômetro (Tabela 2) foi calculada a curva de calibração padrão (Figura 2). Pelo resultado obtido para o meio BMGM, pode-se observar uma boa correlação linear ($R^2 = 0,9878$) na faixa entre 7,5 a 150 $\mu\text{g/mL}$. Com a equação da reta obtida, foi possível determinar a concentração de proteínas (mg/mL) provenientes das células, medindo a absorbância da amostra no comprimento de onda ótimo: 750nm.

Tabela 2- Valores de absorbância para concentrações conhecidas de BSA diluídas em meio BMGM, medidas à 750 nm. Média de três repetições.

Concentração (mg/mL)	Absorbância (750 nm)
0,0075	0,044
0,015	0,060
0,0225	0,105
0,03	0,165
0,045	0,214
0,06	0,266
0,075	0,323
0,09	0,382
0,12	0,471
0,15	0,557

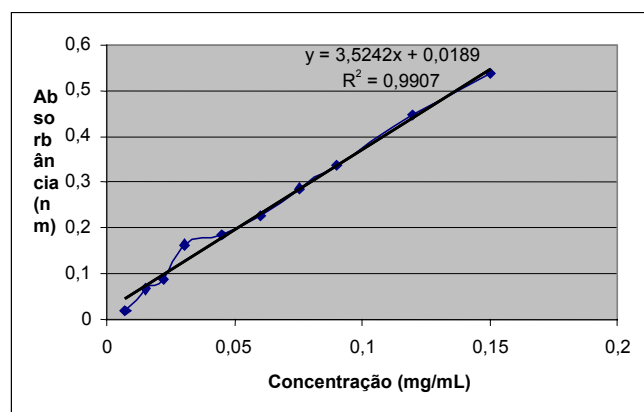


Figura 2 – Curva de calibração padrão da concentração de proteína (BSA) em mg/mL no meio semi-sólido BMGM; Absorbância medida à 750nm.

Quantificação de proteínas totais das amostras de culturas bacterianas em meio semi-sólido

A partir da leitura em espectrofotômetro no comprimento de 750 nm foram obtidos valores absorbância para as células crescidas nos respectivos meios de cultura (Tabela 3). A concentração de proteínas totais foi determinada a partir da equação da reta calculada pela curva padrão correspondente aos meios LGI-P e BMGM.

Tabela 3 - Quantificação de proteínas totais das amostras de culturas bacterianas crescidas em diferentes meios.

Espécie	Estirpe	Meio de Cultivo	Média da absorbância (750 nm)	Erro padrão	Concentração de proteínas totais (mg/ml) em 100 μL de amostra
<i>G. diazotrophicus</i>	PAL5	LGI-P	0,685	0,089	0,189
<i>G. diazotrophicus</i>	PAL3	LGI-P	0,631	0,054	0,173
<i>G. diazotrophicus</i>	AF32	LGI-P	0,620	0,053	0,170
<i>G. diazotrophicus</i>	PRJ55	LGI-P	0,648	0,080	0,178
<i>G. diazotrophicus</i>	PPe4	LGI-P	0,731	0,088	0,202
<i>B. brasiliensis</i>	BR11340	BMGM	0,572	0,010	0,146
<i>B. silvatlantica</i>	BR11919	BMGM	0,477	0,009	0,120

Conclusão

A metodologia descrita mostrou-se apropriada para determinar a concentração de proteínas totais provenientes das células crescidas nos meios semi-sólidos LGI-P e BMGM, não sendo observado nenhum efeito de eventuais agentes interferentes, como ágar e diversos sais, para as condições utilizadas.

Referências Bibliográficas

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996. 238 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas.** Brasília, DF: Embrapa-SPI; Itaguaí, RJ: Embrapa Agrobiologia, 1995. 60 p.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 183, p. 265-275, 1951.

TEIXEIRA, K. R. dos S. **Isolamento e caracterização do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae* Z78.** 1991. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

Comunicado Técnico, 95

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia
BR465 – km 7
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2007): 50 exemplares



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Gustavo Ribeiro Xavier e Jean Luiz Simões Araújo
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.