

## Frações Proteicas de *Chromobacterium violaceum* em Interação com Esporos de *Colletotrichum* sp. Isolado de Guaranazeiro

Paula Cristina da Silva Angelo<sup>1</sup>  
José Cristino Abreu de Araujo<sup>2</sup>  
José Clério Rezende Pereira<sup>2</sup>  
Adriana Sotero-Martins<sup>3</sup>  
Antonia Maria Ramos Franco<sup>4</sup>  
Edmar V. de Andrade<sup>5</sup>  
Jorge Luis López Lozano<sup>6</sup>

*Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa de vida livre presente em ecossistemas tropicais e subtropicais, a qual é abundante nas margens do Rio Negro e tem sido estudada no Brasil nos últimos trinta anos. O genoma completo dessa bactéria foi sequenciado e anotado, e as sequências estão disponíveis para consulta pública no GenBank (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003). Entre os produtos do metabolismo da *C. violaceum* que apresentam atividade antimicrobiológica (DURAN & MENCK, 2000; MATZ et al., 2004) está a violaceína, que é um pigmento não difusível de estrutura dimérica formado pela condensação de duas moléculas modificadas de triptofano (AUGUST et al., 2000). A existência de um mecanismo de *quorum sensing* que regula a produção desse pigmento em culturas de *C. violaceum* tem sido relatada. Adicionalmente à síntese de pigmento, em resposta ao sinal de *quorum*, a molécula indutora (HHL) da síntese de violaceína ativa a produção de quitinases que apresentam atividade quitinolítica extracelular (CHERNIN et al., 1998). A atividade da quitinase

bruta extraída de *Trichoderma harzianum* sobre micélio do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi testada em experimentos conduzidos com micélios cultivados por 24 até 72 horas. Três períodos de tempo de interação com a enzima também foram avaliados. Anomalias na estrutura das hifas foram observadas a partir de 24 horas de interação, e a dissolução completa das hifas ou formação de estruturas semelhantes a pequenas vesículas foi observada após 72 horas de interação (SANDHYA et al., 2005). No entanto, além de violaceína e quitinases, podem existir outras proteínas e peptídeos expressos pela bactéria que apresentem atividade antifúngica.

O objetivo deste trabalho foi testar frações de extratos proteicos de *C. violaceum*, distintas quanto à solubilidade, com relação à atividade inibitória da protrusão de hifas dos esporos de *Colletotrichum* sp. isolado de folhas de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) com sintomas de antracnose.

<sup>1</sup>Bióloga, D.Sc. em Ciências Biológicas/Genética, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, paula.angelo@cpaa.embrapa.br

<sup>2</sup>Engenheiro agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, cristino.araujo@cpaa.embrapa.br

<sup>3</sup>Bióloga, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, AM.

<sup>4</sup>Bióloga, D.Sc. em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

<sup>5</sup>Biólogo, D.Sc. em Biologia Molecular, professor do Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

<sup>6</sup>Biólogo, D.Sc. em Biologia Molecular, pesquisador da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, AM.

Os esporos foram obtidos a partir do cultivo de *Colletotrichum* sp., isolado do filoplano de guaranazeiros, em meio de fubarina-ágar (20 g + 17 g), durante oito dias, com fotoperíodo de 24 horas, sob temperatura ambiente, no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Ocidental. Foram testadas quatro frações proteicas de *C. violaceum*, cepa ATCC12472. O fracionamento foi realizado por solubilizações sucessivas da proteína total intra ou extracelular liofilizada em água ultrapura (MilliQ) ou etanol absoluto, seguidas de sonicação e centrifugação para aproveitamento dos precipitados ou sobrenadantes. Para as frações A e B, foram realizadas duas extrações com etanol, e os precipitados foram ressuspensos em água ultrapura, novamente liofilizados e mantidos a -20 °C. As frações C (precipitado) e D (sobrenadante em etanol) foram obtidas dessa mesma maneira, com um passo adicional de passagem por filtro de *polyethersulfone* com poros de 0,22 µm. O etanol presente na fração D foi evaporado à temperatura ambiente. As extrações iniciais com etanol também foram úteis para reduzir a contaminação das frações por violaceína, na tentativa de minimizar possíveis efeitos desse composto sobre os esporos do fungo.

Portanto, as frações testadas foram **A** – proteínas intracelulares hidrofílicas insolúveis (precipitado) em etanol absoluto, extraídas após cultivo em meio M9 (meio mínimo, MANIATIS, 1982); **B** – proteínas extracelulares hidrofílicas insolúveis em etanol extraídas do meio M9 recolhido após o cultivo; **C** – proteínas intracelulares hidrofílicas e **D** – proteínas intracelulares solúveis em etanol extraídas após cultivo em meio LB (meio enriquecido, MANIATIS, 1982).

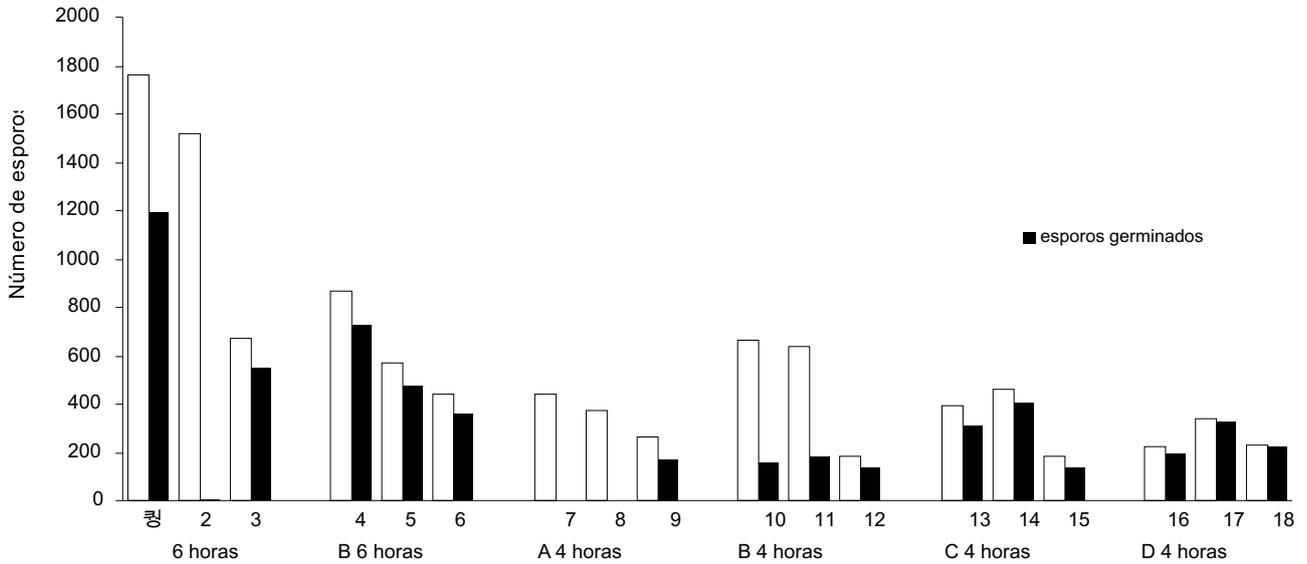
A concentração de proteínas contidas em cada fração (mg mL<sup>-1</sup>) foi estimada por espectrofotometria a 280 nm, utilizando BSA como padrão indireto. Para testar quantidades pequenas de cada fração, de modo a permitir que os experimentos fossem realizados com réplicas, as soluções de proteínas foram espalhadas sobre *plugs* de ágar a 1,5% em PBS (*phosphate buffered saline*), com 1,8 cm de diâmetro e 2 mm de espessura, utilizando alça de Drigalzký. Quantidades (µg) iguais das proteínas de cada fração foram depositadas sobre cada *plug*. Volumes iguais da suspensão de esporos de *Colletotrichum*, em diluição preparada para que estivessem presentes aproximadamente 50 esporos por campo do microscópio óptico, foram depositados sobre os *plugs* da mesma maneira. As frações proteicas foram ressuspensas em PBS com 4% de DMSO (*dimethylsulfoxide*). Para controle, foram realizados os mesmos procedimentos, com exceção da adição das proteínas liofilizadas ao PBS com DMSO. As frações proteicas foram testadas das seguintes maneiras:

Tratamento	Fração	Horas	µg de Proteínas
1	A	6	300
2	A	6	1.200
4	B	6	300
5	B	6	1.200
7	A	4	400
8	A	4	1.600
10	B	4	400
11	B	4	1.600
13	C	4	400
14	C	4	1.600
16	D	4	400
17	D	4	1.600

Tratamentos identificados com os números 3, 6, 9, 12, 15 e 18 são controles (não houve adição de frações proteicas). Experimentos de interação e tratamentos controle com duração de duas horas também foram realizados. A temperatura de 28 °C foi mantida durante o período de interação. A variável analisada foi a razão entre o número de esporos para os quais foi observada a protrusão de hifas, passadas as quatro ou seis horas de interação com as frações proteicas, e o número total de esporos contados. A contagem dos esporos foi realizada em 10 campos do microscópio sobre cada *plug*, utilizando aumento de 40x, com um mínimo de um *plug* e 10 campos por tratamento. Cada campo contado foi considerado uma repetição. Para as frações A e B foram avaliados 19 *plugs*, ou seja, 190 repetições. Para a fração C foram avaliados 3 *plugs* e para a fração D foram avaliados 2 *plugs*. Os resultados foram analisados pelo teste Z para proporções (FOX et al., 1985), ao nível de significância de 5%.

Para o gel bidimensional foi utilizado o extrato não fracionado de proteínas intracelulares de *C. violaceum*. O cultivo das bactérias, em M9, por sete horas, foi realizado na FIOCRUZ; e a extração das proteínas, no Laboratório de Preparo de Amostras/Tecnologia de DNA da UFAM. Foram utilizados 125 g de proteína, ressuspensos em 0,5% de IPG *buffer em Rehydration DeStreak solution* (GE Life Sciences) por gel. A eletrofocalização foi realizada em fita de pH 3 11 NL, com um total de 28.500 Vh. A segunda dimensão da eletroforese foi realizada em gel de acrilamida/bisacrilamida a 12%, 50 mA por gel, durante três horas, em tampão TRIS-glicina.

Não foi observada protrusão de hifas nas observações com duas horas de duração. Foram contados 10.230 esporos, incluídos todos os demais experimentos, distribuídos em seis tratamentos e controles (Fig. 1). Em média foram contados 33 ± 21 esporos por campo de observação do microscópio.

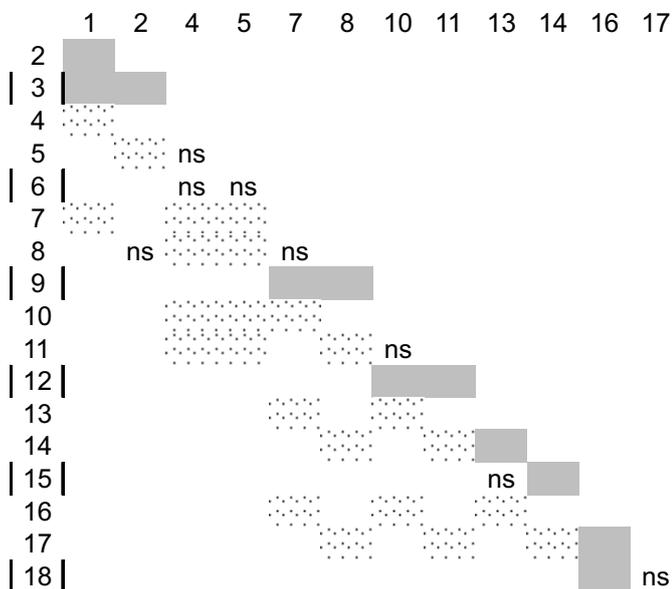


**Fig. 1.** Esporos de *Colletotrichum* sp. isolado em guaranaizeiro contados em experimentos de interação com frações proteicas de *Chromobacterium violaceum*. Barras brancas representam o total de esporos. Barras pretas representam esporos que apresentaram protrusão de hifas. Os tratamentos são indicados sob as barras. **A, B, C e D** são as denominações das frações, conforme Material e Métodos. **1 e 4:** 300 g de proteínas; **2 e 5:** 1.200 g de proteínas; **7, 10, 13 e 16:** 400 g de proteínas; **8, 11, 14 e 17:** 1.600 g de proteínas; **3, 6, 9, 12, 15 e 18** controles (EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 2006).

De maneira geral, nos ensaios com as frações A e B, os tratamentos com maiores quantidades de proteína reunidos apresentaram-se mais efetivos do que os tratamentos com menores quantidades. No entanto, o número de horas também teve efeito significativo, sendo os tratamentos de interação por quatro horas mais efetivos que aqueles realizados por seis horas. Além disso, a fração intracelular apresentou mais atividade que a fração extracelular.

A fração A, proteínas intracelulares hidrofílicas insolúveis em álcool, gerou resultados significativamente diferentes dos controles nos experimentos realizados com 300 µg e 1.200 µg de proteínas, por seis horas e naqueles realizados com

400 µg e 1.600 µg de proteínas, por quatro horas. Além disso, 300 µg e 1.200 µg (tratamentos 1 e 2) de proteína diferiram significativamente e 1.200 µg foram mais efetivos do que 300 µg quanto à inibição da germinação dos esporos de *Colletotrichum*. Uma vez que 400 µg não diferiram de 1.600 µg (tratamentos 7 e 8), pode ser que a partir de 400 µg o componente ativo dessa fração proteica tenha sido efetivo independente do tempo de reação. A diferença entre 300 µg e 400 µg (tratamentos 1 e 7) de proteínas favorece essa possibilidade. Ademais, essa fração apresentou mais atividade do que a fração extracelular (B), nas mesmas concentrações e tempos de reação (Fig. 2).



**Fig. 2.** Resultados do teste Z aplicado à proporção de esporos que apresentaram protrusão de hifas no número total de esporos de *Colletotrichum* sp. isolado de guaranaizeiro expostos à interação com frações proteicas de *Chromobacterium violaceum*. **1 a 3** fração A, seis horas, **4 a 6** fração B, seis horas, **7 a 9** fração A, quatro horas, **10 a 12** fração B, quatro horas, **13 a 15** fração C, quatro horas, **16 a 18** fração D, quatro horas. **1 e 4** - 300 g de proteínas; **2 e 5** - 1.200 g de proteínas; **7, 10, 13 e 16** - 400 g de proteínas; **8, 11, 14 e 17** - 1.600 g de proteínas. **3, 6, 9, 12, 15 e 18** controles (nenhuma interação com frações proteicas). Quadrículas preenchidas em cinza representam diferenças significativas obtidas para experimentos com quantidades diferentes e controles de cada fração. Quadrículas pontilhadas representam diferenças significativas entre testes com frações diferentes. ns = diferença não significativa (EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 2006).

A atividade antagônica da fração B, proteína extracelular hidrofílica insolúvel em álcool, só foi diferente do controle quando observada com quatro horas de experimentação. Uma hipótese para explicar esses resultados é que a atividade das proteínas presentes nessa fração reduziu-se ao longo do tempo de observação por perda de conformação ou por interação com outros componentes proteicos. A quitinase bruta extraída de *Trichoderma harzianum* reteve apenas 48% da atividade depois de incubada por 40 minutos a 40 °C (SANDHYA et al., 2005). E, ao contrário do que foi verificado nos testes com a fração A, nos experimentos com quatro horas de duração não houve diferença entre quantidades das proteínas utilizadas nos experimentos (tratamentos 10 e 11), então supõe-se que, para essa fração, o tempo de interação seja uma variável mais influente sobre os resultados do que as concentrações. Essa hipótese também se apoia na efetividade da menor concentração das proteínas no extrato (400 µg, tratamento 10) quando houve interação por quatro horas do que da concentração de 1.200 µg durante seis horas de interação (tratamento 4).

Entre as proteínas que são expressas por *C. violaceum* e que podem ter efeito antagônico sobre *Colletotrichum* estão as quitinases. São propostas para explicar a ação antifúngica das quitinases: a interferência com a germinação dos esporos, lise das hifas já desenvolvidas, como já foi citado, e a degradação do ápice das hifas (SANDHYA et al., 2005). Quitinases de mamão produzidas por expressão heteróloga causaram a inibição da germinação de esporos de *Alternaria brassicola*, in vitro (CHEN et al., 2007). Essas enzimas são extracelulares, e se estivessem bem representadas na fração B, esta fração poderia ter inibido a protrusão de hifas de uma proporção maior de esporos do que a fração A. No entanto, não se sabe qual o efeito do próprio meio sobre as proteínas secretadas pela bactéria. No genoma de *C. violaceum* existem diversos genes que codificam endo e exoquitinases, com diferentes padrões de expressão, pontos isoelétricos, pHs ótimos de atividade e afinidades pelos substratos. Além disso, essas proteínas podem ter ficado retidas no espaço intracelular ou periplasmático durante o trânsito para a secreção e, por isso, terem sido incluídas na fração A ou, ainda, terem tido expressão reduzida, uma vez que as bactérias foram cultivadas em meio M9 por apenas sete horas, condição em que a produção de violaceína, indicador da ativação dos mecanismos de *quorum sensing* que é comum para violaceína e quitinases (CHERNIN et al., 1998), também foi menor (REDE PROTEÔMICA DO ESTADO DO AMAZONAS, resultados não publicados). Hipótese adicional para a ocorrência de atividade biológica mais pronunciada da fração A pode ser a presença de proteínas antagônicas diferentes das quitinases nessa fração.

Nos ensaios de interação por quatro horas, a fração A foi mais efetiva que todas as outras em maior ou menor quantidade de proteínas e a fração B foi mais efetiva que C e D. As frações C e D apresentaram resultados de difícil interpretação e foram, ao mesmo tempo, menos ativas do que todas as outras. A fração C só diferiu do controle em maior quantidade, observando-se um número proporcional maior de germinações após a interação do que no controle, e a fração D diferiu do controle apenas na menor concentração. Uma vez que o fracionamento foi muito similar àquele utilizado para obtenção da fração A, com exceção da utilização de filtragem, é possível que a utilização de um filtro com afinidade por proteínas tenha eliminado parte dos componentes ativos. Pode ser também que os resultados estejam refletindo as alterações nos padrões de expressão de proteínas causadas pelo cultivo em meio LB, porque a fração A foi obtida de bactérias cultivadas em M9 e as frações C e D, de bactérias cultivadas em LB.

Outrossim, enzimas, como a quitinase, apresentam geralmente conformação globular, e os aminoácidos carregados em pH fisiológico são mantidos no exterior das moléculas (STRYER, 1988) quando estão em conformação nativa. Por isso, deveriam ter mais afinidade pela fração aquosa dos extratos (A e B), que é mais polar, e não estariam presentes nas frações etanólicas (D), a menos que tenham perdido a conformação ao longo da extração e provavelmente a atividade. Isso pode ser parte da explicação para a baixa atividade biológica identificada para as proteínas nessa fração.

O fracionamento das proteínas intra e extracelulares de *C. violaceum* resulta em frações menos complexas que valorizam os resultados de bioensaios, no sentido de indicar para que frações a análise espectrométrica dos componentes será proveitosa para a identificação de componentes bioativos. Também, pode-se considerar que a identificação de cada *specimen* presente em um conjunto menor de proteínas, nos géis bidimensionais, pode ser mais fácil do que em géis de proteína total (Fig. 3). A partir dos resultados desses experimentos, pode-se concluir que a fração B deveria ter os componentes identificados. A fração A é ainda muito complexa e talvez possa ser fracionada novamente, utilizando-se outros solventes ou outros critérios de discriminação, antes do isolamento de *spots* em géis bi-dimensionais para identificação dos peptídeos por espectrometria.

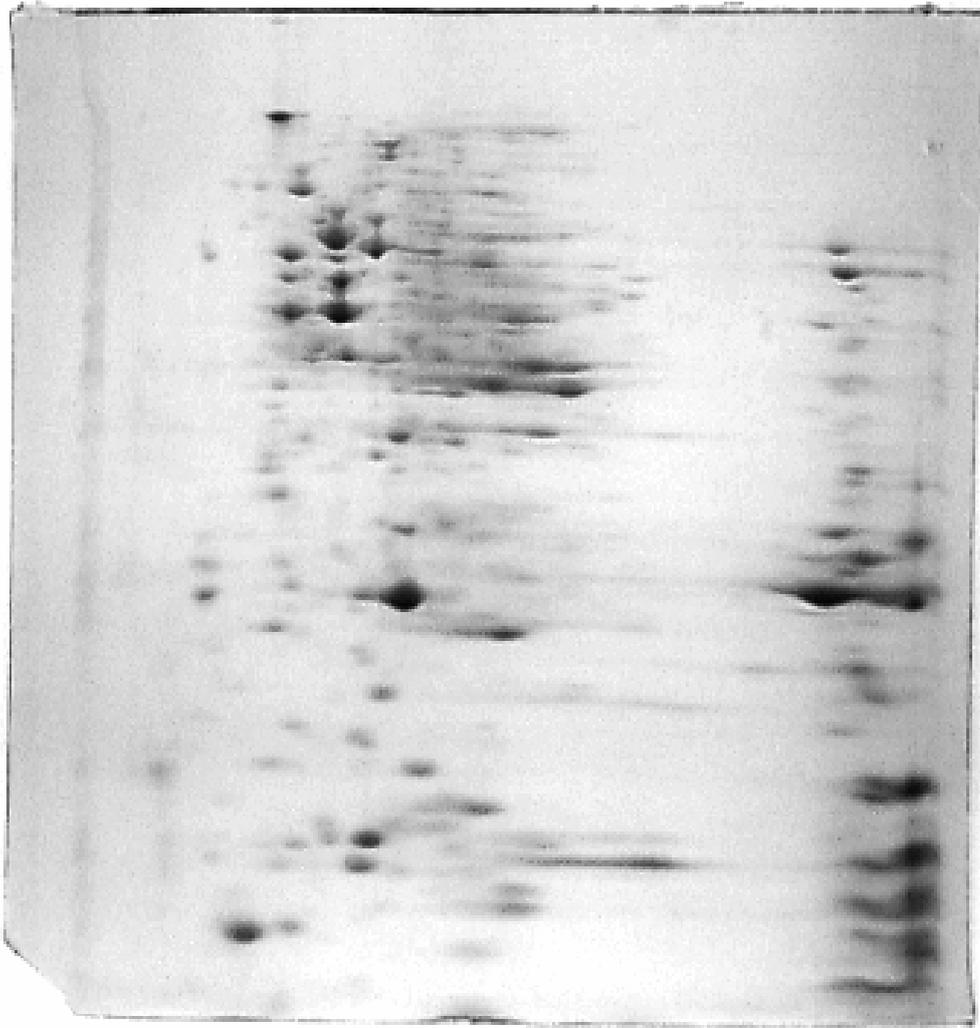


Fig. 3. Gel bidimensional de proteínas totais intracelulares de *Chromobacterium violaceum*, cultivada por sete horas em meio LB (EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 200, 2007).

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas/Financiadora de Estudos e Projetos (Fapeam/Finep), pelo financiamento dos projetos da Rede Proteômica do Amazonas. Ao Assistente de Pesquisa Jeferson Chagas da Cruz, Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, pela contagem dos esporos.

## Referências

AUGUST, P. R. et al. Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, n. 2, v. 4, p. 513-519, 2000.

Brazilian National Genome Project Consortium. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **PNAS**, v. 110, n. 20, p. 11660-11665, 2003.

CHEN, Y.-T. et al. Gene cloning and characterization of a novel recombinant antifungal chitinase from papaya (*Carica papaya*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 714-722, 2007.

CHERNIN, L. S. et al. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4435-4441, 1998.

DURAN, N.; MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201-222, 2000.

MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. v. 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. p. 68.

MATZ, C. et al. Impact of violacein producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70, n. 3, p. 1593-1599, 2004.

SANDHYA, C. et al. Microbial synthesis of chitinase in solid cultures and its potential as a biocontrol agent against phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 127, n. 1, p. 1-15, 2005.

STRYER, L. **Biochemistry**. USA: Ed. Freeman, 1988. p. 15-42.

### Comunicado Técnico, 69

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
Embrapa Amazônia Ocidental  
Endereço: Rodovia AM 010, Km 29 - Estrada  
Manaus/Itacoatiara  
Fone: (92) 3303-7800  
Fax: (92) 3303-7820  
<http://www.cpaa.embrapa.br>

1ª edição  
1ª impressão (2009): 300 exemplares

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



### Comitê de Publicações

**Presidente:** Celso Paulo de Azevedo  
**Secretária:** Gleise Maria Teles de Oliveira  
**Membros:** Aparecida das Graças Claret de Souza, José Ricardo Pupo Gonçalves, Lucinda Carneiro Garcia, Luis Antonio Kioshi Inoue, Maria Augusta Abtíbol Brito, Maria Perpétua Beleza Pereira, Paulo César Teixeira, Raimundo Nonato Vieira da Cunha, Ricardo Lopes, Ronaldo Ribeiro de Moraes.

### Expediente

**Revisão de texto:** Maria Perpétua Beleza Pereira  
**Normalização bibliográfica:** Maria Augusta Abtíbol Brito  
**Editoração eletrônica:** Gleise Maria Teles de Oliveira