VALÉRIA KARLA DE BRITO VIEIRA

ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE MUTANTES DE
***Chromobacterium violaceum* E SUA CARACTERIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção
de Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientador:
Profa. Dra. Lucymara Fassarella Agnez Lima

São Paulo

2010

RESUMO

VIEIRA, V. K. B. **Obtenção e caracterização de mutantes de *Chromobacterium violaceum***. 95 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Chromobacterium violaceum é uma bactéria gram-negativa encontrada nas águas e margens do Rio Negro-AM, e tem sido muito estudada a fim de explorar seu potencial biotecnológico. A capacidade de degradação de fenol tem interesse para aplicação em biorremediação. O pigmento violaceína tem potencial como componente terapêutico em produtos dermatológicos e por sua atividade antimicrobiana. Apesar de importantes atividades biológicas já terem sido descritas, pouco se sabe sobre a real função desse pigmento para a fisiologia bacteriana. Neste trabalho procurou-se determinar estratégias para obter mutantes de *C. violaceum*, como também, fazer o estudo da caracterização dos mutantes. Linhagens mutantes foram obtidas por transposição com o mini-Tn5 e por recombinação homóloga (mutantes *vioB* e *ubiB*), ambas estratégias confirmadas por *Southern Blot*. A linhagem *vioB* não expressa a violaceína e a linhagem *ubiB* não expressa a enzima fenol monoxigenase. O mutante *vioB* em fase estacionária demonstrou ser mais resistente aos sais metálicos FeCl_2 e CdCl_2 em diferentes concentrações. Quando exposta a radiações ultravioleta UVA e UVB não foi observada diferença significativa na resistência da linhagem mutante *vioB* tanto na fase exponencial como estacionária. Entretanto, esta linhagem mostrou ser mais sensível a UVC na fase estacionária. Não houve uma diferença significativa entre as taxas de sobrevivência exibidas pela linhagem *vioB* na presença de H_2O_2 . Análise por microscopia demonstrou maior agregação das células do mutante *vioB* frente à linhagem selvagem e ao mutante de *quorum sensing* CV026, bem como apresentou maior formação de biofilme em ensaio quantitativo em todas as fases de crescimento. O mutante *ubiB* apresentou crescimento deficiente na presença de 0.4 mg/mL de fenol após 120 horas. Esse resultado indica que o gene *ubiB* faz parte da via de degradação de compostos fenólicos e a interrupção do gene *ubiB* promoveu a perda da capacidade de metabolizar fenol.

Palavras-chave: *Chromobacterium violaceum*. Violaceína. Biologia Molecular. Mutação. Genética Bacteriana. Biotecnologia.

ABSTRACT

VIEIRA, V. K. B. **Strategies for obtaining mutant strains of *Chromobacterium violaceum* and their characterization.** 95 f. Thesis (Doctoral in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Chromobacterium violaceum is a Gram-negative bacterium found in the water and shore of Rio Negro-AM, and it has been extensively studied for its biotechnological potential. The ability of degrading phenol is interesting for its application in bioremediation. The violacein pigment has potential as a therapeutic component in dermatological products and by its antimicrobial activity. Even though important biological activities had already been described, little is known about the real function of this pigment to bacterial physiology. In this work, we have sought to determine strategies to obtain mutants of *C. violaceum*, as well as characterize the obtained mutants. Mutant strains were obtained by mini-Tn5 transposition or by homologous recombination (*vioB* and *ubiB*), which were confirmed by *Southern blotting*. The *vioB* strain did not express violacein and the *ubiB* strain did not express phenol monooxygenase. The mutant strain *vioB* was shown to be more resistant to metallic salts FeCl₂ and CdCl₂ in various concentrations at stationary phase. When exposed to UVA and UVB radiation, we could not observe significant differences between the resistance levels of the wild type and the *vioB* mutant, both in exponential and stationary phases. However, the mutant strain was more resistant to UVC radiation at stationary phase. There was no significant difference between the survival rates of the wild type and the *vioB* mutant strain in the presence of H₂O₂. Microscopy analyses demonstrated that the *vioB* strain presents a higher cell aggregation when compared to the wild type and the *quorum sensing* mutant CV026, and *vioB* presented a higher formation of biofilm in quantitative assays in all growth phases. The *ubiB* mutant presented a growth defect in the presence of 0.4 mg/mL phenol after 120 hours. This result indicates that the *ubiB* gene belongs to a pathway of phenolic compounds degradation, and that the disruption of this gene causes loss of the ability to metabolize phenol.

Keywords: *Chromobacterium violaceum*. Violacein. Molecular Biology. Mutation. Bacterial Genetics. Biotechnology.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Características da *Chromobacterium violaceum*

A bactéria *Chromobacterium violaceum* pertence ao grupo das β -proteobactérias da família *Neisseriaceae* (GARRITY; WINTERS; SEALES, 2001). Descrita no final do século XIX (BOISBAUDRAN, 1882), é uma dentre várias espécies de microorganismos de vida livre que povoam regiões de clima tropical e subtropical ao redor do mundo (RICHARD, 1993), podendo ser encontrada tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres (BOONE e CASTENHOLZ, 2001). Muitos destes ambientes são pobres em nutrientes, apresentando condições adversas como altas temperaturas, exposição à radiação ultravioleta (UV) e acidez (HUNGRIA et al., 2004). No Brasil, as colônias de *C. violaceum* são encontradas em abundância, principalmente nas águas escuras e nos bancos de areia do Rio Negro, na região Amazônica (DIAS et al., 2002).

Anaeróbica facultativa e saprófita (GARRITY; WINTERS; SEALES, 2001), *C. violaceum* normalmente é considerada não patogênica para humanos (SNEATH, 1984). No entanto, pode agir como patógeno oportunista para o homem e animais (DURÁN e MENCK, 2001; CROSSE et al., 2006), causando lesões na pele, abscessos no fígado e pulmão (RICHARD, 1993, SIRINAVIN et al., 2005; MANJUNATH, 2007), e em raríssimos casos, uma septicemia fatal (PERERA et al., 2003; CHEN e KUO, 1993; TEOH et al., 2006; MARTINEZ e MATTAR, 2007).

1.2 Potencial biotecnológico

Várias características observadas em *C. violaceum* sugerem um grande potencial biotecnológico (DURÁN e MENCK, 2001). A violaceína, um pigmento na cor violeta que confere sua coloração característica, tem sido estudado como um composto com propriedades terapêuticas (DURÁN, 1990; DE SOUZA et al., 1999; MELO et al., 2000; LEON et al., 2001; DURÁN e MENCK, 2001). Esta bactéria é um dos raros microorganismos que conseguem sintetizar homopolímero 3-hidroxivalerato (polihidroxivalerato ou PHV), bem como outros tipos de polihidroxialcanoatos (PHA's) – polímeros orgânicos com características físico-químicas muito semelhantes às do polietileno e polipropileno. Esses compostos são de grande interesse industrial e

ambiental devido à possibilidade de serem utilizados na produção de plásticos biodegradáveis (LEE; ODOM; BUCHANAN, 1998; KOLIBACHUK; MILLER; DENNIS, 1999; DURÁN e MENCK, 2001; VASCONCELOS et al., 2003; STEPHENS, 2004).

Esta bactéria mostra-se ainda eficiente no biocontrole agrícola contra insetos, fungos e nematóides devido sua capacidade de produção de quitinases extracelulares. Essas quitinases provavelmente sejam responsáveis pela habilidade que *C. violaceum* possui para sobreviver utilizando quitina como fonte de carbono e nitrogênio (CHERNIN et al., 1998; VASCONCELOS et al., 2003). Outra potencialidade biotecnológica deste microorganismo seria o seu emprego na biorremediação de metais pesados, agindo como biodespoluente e/ou bioindicador. Um bom exemplo é sua capacidade de solubilizar ouro por processos livres de mercúrio (CAMPBELL et al., 2001; KITA; NISHIKAWA; TAKEMOTO, 2006) e seu uso na biodegradação de fenol (PERPETUO et al., 2009), evitando a contaminação ambiental.

Visto o potencial biotecnológico de *C. violaceum*, este microorganismo foi o primeiro a ter seu genoma seqüenciado pela Rede Nacional de Seqüenciamento Nucleotídico (Projeto Genoma Brasileiro - CNPq). O genoma completo de *C. violaceum* consiste de um cromossomo circular de 4.751.080 pb, cujo conteúdo GC é de 64,83%. Das 4.431 ORFs (Open Reading Frame), cerca de 40% foram anotadas como hipotéticas conservadas ou hipotéticas (VASCONCELOS et al., 2003), indicando que grande parte do patrimônio genético desta espécie ainda não foi caracterizado, sendo possível que exista uma série de novos genes com potencial biotecnológico, e que precisam ser investigados.

A comparação das ORFs de *C. violaceum* com a de outros organismos revelou similaridades com bactérias como *Ralstonia solanacearum*, *Neisseria meningitidis* e *Pseudomonas aeruginosa* (SALANOUBT et al., 2000; PARKHILL et al., 2000; STOVER et al., 2000). A maior parte dos genes de *C. violaceum* que apresentam maior similaridade com genes de *R. solanacearum* são relacionadas com a mobilidade celular, modificações pós-transcricionais, transporte de íons inorgânicos e biossíntese de metabólitos secundários (VASCONCELOS et al., 2003). O genoma de *C. violaceum* contém uma grande proporção de ORFs que se apresentam especificamente relacionadas à habilidade dessa bactéria em interagir e responder ao ambiente, o que garante grande adaptabilidade e versatilidade a este microorganismo (VASCONCELOS et al., 2003). É capaz de explorar uma gama extensiva de fontes de energia usando

apropriadamente oxidases e redutases, o que favorece o seu desenvolvimento em ambientes aeróbios e anaeróbios (HUNGRIA et al., 2004). Outras ORFs codificam proteínas que podem responder a condições restritivas, como condições de estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2003).

Outros genes de grande interesse são aqueles potencialmente aplicáveis em estratégias de biorremediação de metais pesados. O mais importante achado são os transportadores de metais pesados, os quais permitem a exploração dessa bactéria para biorremediação (DURÁN e MENCK, 2001; VASCONCELOS et al., 2003). Os metais pesados figuram entre os principais agentes responsáveis pela poluição ambiental, estando envolvidos com citotoxicidade, genotoxicidade e carcinogênese (WAISBERG et al., 2003; DESOIZE, 2003). Além disto, a presença deste complexo aparato de transporte, talvez seja um importante fator que faz dessa bactéria um microorganismo dominante em diversos ambientes em ecossistemas de regiões tropicais e subtropicais. Vale salientar, que no genoma de *C. violaceum* existem dez genes identificados como provavelmente associados à complexação e a processos de descontaminação de metais pesados (VASCONCELOS et al., 2003).

Os compostos fenólicos também se configuram como grandes poluentes no meio ambiente. Eles têm baixa solubilidade em água e tendem a ser fortemente sorvidos ao solo e, portanto, são menos biodegradados. Como resultado, são persistentes no ambiente e podem estar envolvidos com carcinogênese (LIN e LIANG, 2000).

O gene *ubiB* é um ortólogo da flavina redutase que pode estar envolvido diretamente com a biodegradação de compostos fenólicos por *C. violaceum*. Foi visto em *Pseudomonas stuartii* que o gene *ubiB* é requerido no primeiro passo para biossíntese da ubiquinona (POON et al., 2000), uma coenzima importante na cadeia respiratória de transporte de elétrons encontrada na membrana interna mitocondrial nos eucariotos, e na membrana plasmática dos procariotos. (BRANDT e TRUMPOWER, 1994) Em *Escherichia coli* foi visto que a flavina redutase está diretamente envolvida no primeiro passo da monoxigenase na biossíntese da ubiquinona, e que ocorre um acúmulo de octaprenilfenol na linhagem mutada (POON et al., 2000).

Atualmente, os altos níveis de poluição das águas vêm sendo atribuídos ao desordenado crescimento das cidades e modernização tecnológica das indústrias, que produzem uma grande quantidade de efluentes provenientes de seus processos e estes vem sendo lançados em rios com tratamentos ineficientes ou ausentes, sujeitando assim o ecossistema aquático e a população, que se utilizam deste de forma extrativista ou de

lazer, a diferentes tipos de poluentes que podem interagir de forma maléfica levando a alterações em diferentes níveis de organização biológica (THEODORASKIS et al.; 2000). Os compostos fenólicos e seus derivados têm se tornado abundante em efluentes de diferentes indústrias, porém sua concentração deve ser limitada por causa dos efeitos deletérios em diferentes organismos. Muitos microorganismos são capazes de utilizar os compostos aromáticos como fonte primária de carbono e energia, transformando-os em produtos menos tóxicos.

Neste cenário, a utilização de microorganismos como biodespoluentes e/ou bioindicadores ambientais surge como uma importante ferramenta no tratamento de áreas contaminadas com metais, visto que as bactérias estão envolvidas em inúmeros ciclos biogeoquímicos e muitas apresentam mecanismos para suportar condições de elevadas concentrações de metal, podendo até mesmo transformar formas tóxicas de metais em formas menos tóxicas (MUKHOPADHYAY et al., 2002). Sendo assim, cada vez mais estudos com bactérias isoladas de sedimentos e águas de regiões contaminadas com metais estão sendo realizados (BHADRA; NANDA; CHAKRABORTY, 2006; BALL et al, 2007; ABOU-SHANAB; VAN BERKUM; ANGLE, 2007), visando à descoberta de microorganismos que apresentem potencial à utilização como ferramenta biológica na descontaminação de tais ambientes.

Com relação a esses microorganismos, sabe-se que os metais são de extrema importância em processos vitais à sua sobrevivência. Alguns metais como zinco (Zn), ferro (Fe), cobre (Cu), níquel (Ni) e manganês (Mg) são requeridos em baixas concentrações, enquanto outros, como chumbo (Pb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e prata (Ag) não apresentam papéis biológicos (BHADRA; NANDA; CHAKRABORTY, 2006). Em geral, a resistência a metais é determinada por plasmídeos (SILVER e MISTRA, 1988), mas, segundo SMITH (1967) e NAKAHARA et al (1977) esta também pode ser determinada pelo cromossomo. O complexo conjunto de substâncias transportadoras em *C. violaceum* é um fator importante que permite que essa bactéria seja dominante em uma variedade de ecossistemas de regiões tropical e subtropical. Esse fator poderia explicar a alta competitividade e habilidade em sobreviver sob diferentes tipos de estresse ambiental (HUNGRIA et al., 2004).

1.3 Estrutura química da violaceína

Além dos genes relacionados com a detoxificação ambiental, outros com interesse biotecnológico vêm sendo caracterizados, podendo-se destacar os que estão envolvidos na biossíntese da violaceína (PERBETON; VICENT; PENFOLD, 1991).

A violaceína é um pigmento violeta naturalmente produzido por *C. violaceum* que consiste de três unidades estruturais: 5-hydroxyindole, oxindole e 2-pyrrolidone (Figura 1) formado pela união de duas moléculas modificadas de L-triptofano (DEMOSS e EVANS, 1960; HOSHINO et al., 1987). É um derivado indol com massa molar de $343,34 \text{ g mol}^{-1}$, sendo insolúvel em água, levemente solúvel em etanol, moderadamente solúvel em acetona e solúvel em DMSO, metanol e acetato de etila, exibindo um espectro máximo de absorbância em 258, 372 e 575 nm em etanol (RETORE e DURÁN, 1998).

Figura 1 - Estrutura química da violaceína. (a) 5-hydroxyindole, (b) oxindole e (c) 2-pyrrolidone. Ao lado da estrutura química da violaceína uma figura mostrando a bactéria *C. violaceum*.

FONTE: Adaptado do trabalho de Durán et al., 2007.

Os primeiros estudiosos da estrutura química desse pigmento foram Reilly e Pyne em 1927. Foi primeiramente isolado por Strong em 1944 e caracterizado quimicamente poucos anos depois, por Ballantine et al. 1958. Por estudos de degradação e síntese da violaceína deduziram a estrutura correta desse pigmento (DURÁN e MENCK, 2001), como também, propuseram a estrutura de outro pigmento produzido em menor proporção: a deoxi violaceína. Este último possuindo um grupo

hidroxila a menos que a violaceína. Esses dados foram confirmados posteriormente por espectroscopia (LAATSCH e THOMSON, 1984).

Em geral, *C. violaceum* é a bactéria mais estudada pela produção de violaceína, no entanto, esse pigmento é também produzido por outras bactérias, como *Janthinobacterium lividum*, *Alteromonas luteoviolacea* (LAATSCH e THOMPSON, 1984), *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (YADA et al., 2008) e *Shewanella violacea* (KOBAYASHI et al., 2007). Os genes necessários à síntese de violaceína em *C. violaceum* estão organizados em cinco ORFs, um operon conhecido como *vioABCDE* (Figura 2), cuja via biosintética proposta foi *vioA*→*vioB*→*vioE*→*vioD*→*vioC* (SHINODA et al., 2007).

Figura 2 - Esquema geral da estrutura do operon *vioABCDE* de *C. violaceum*. As setas indicam os genes ou ORFs que compõem o operon. O nome dentro da seta corresponde ao gene ou ORF. O número acima da seta corresponde ao número de acesso do gene no GenBank do NCBI. Imediatamente abaixo das setas está indicada a massa molecular de cada polipeptídeo, bem como, o número de nucleotídeos que compõem cada gene. As anotações sob as setas indicam a posição de início e de término do operon. As informações apresentadas neste esquema foram obtidas do KEEG (www.genome.jp/kegg) e NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Com a expressão heteróloga dos genes *vioABCDE* em *E. coli* foi possível purificar as enzimas de VioA-E e caracterizar suas funções (BALIBAR e WALSH, 2006). Com as enzimas purificadas foi possível reconstituir *in vitro* a via biossintética do pigmento majoritário violaceína, e da deoxiviolaína (Figura 3).

Figura 3. Via metabólica de biossíntese de violaceína a partir de triptofano. VioA uma L-triptofano oxidase e VioB uma polietídeo sintase atuam em conjunto na oxidação e condensação do L-triptofano, respectivamente, gerando um intermediário desconhecido que é convertido no ácido cromopirrólico. Na presença da enzima VioE, este intermediário sofre uma modificação no anel indólico gerando a prodesoxiviolaína (ASAMIZU et al. 2007). A enzima VioD uma monooxigenase hidroxila um dos anéis indólicos na posição 5 gerando proviolaína, que por último sofre ação da enzima VioC uma monooxigenase no outro anel indólico na posição 2 gerando violaceína

FONTE: Adaptado de Balibar e Walsh, 2006 e Ryan et al., 2008.

O pigmento violaceína é classificado como um metabólito secundário (BROMBERG e DURÁN, 2001), e sua produção é induzida por N-homoserina lactona acetilada (AHL), mais especificamente pela N-hexanoil-L-homoserina lactona, N-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona e N-oxododecanoil-L-homoserina lactona (CHERNIN et al., 1998; BLOSSER, 2000). Essas lactonas são descritas como reguladores genéticos em várias bactérias Gram-negativas, em um sistema que se denomina *quorum sensing*. Esse sistema é um mecanismo de comunicação intercelular dependente da densidade populacional bacteriana (DE KIEVIT e IGLEWSKI, 2000).

Em *C. violaceum* vários processos estão sob regulação do *quorum sensing*. Dentre eles podemos citar a formação de biofilmes (MARTINELLI et al., 2004); biossíntese de violaceína; produção de cianeto (via operon *acnABC*), assim como sua degradação através do produto dos genes *cynT* (cianato permease) e *cynS* (cianase) (DURÁN e MENCK, 2001). Genes que codificam a elastase (*lasA* e *lasB*), o antibiótico fenazina (CV0931 e CV2663), enzimas extracelulares (serina protease, collagenase, e oligopeptidase), quitinases extracelulares (CHERNIN et al., 1998), possuem seqüências regulatórias similares às encontradas em genes regulados por *quorum sensing*, o que demonstra a possibilidade de estarem sob a mesma regulação (VASCONCELOS et al., 2003).

1.4 Atividades biológicas da violaceína

Lichstein e Van de Sand (1945) fizeram o primeiro estudo abrangente das propriedades antibióticas da violaceína. Até aquela data, tudo que havia sido descrito desta bactéria dizia respeito aos casos por septicemia e, em todos esses, havia sido verificada a ausência de microrganismos contaminantes, indicando a possível atividade antibiótica da violaceína. Verificou-se, primeiramente, que a violaceína possuía efeito inibitório acentuado no crescimento de bactérias Gram-positivas, e efeito leve para as Gram-negativas. No entanto, estudos posteriores realizados com violaceína purificada, mostraram que ela é igualmente eficiente para os dois grupos (DURÁN e MENCK, 2001). Mais recentemente, o pigmento violeta, produzido por *Janthinobacterium lividum* foi caracterizado como sendo uma mistura de violaceína e deoxiviolaceína. Este mostrou atividade antibacteriana contra diversas bactérias saprófitas tais como *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Altas

concentrações deste pigmento causaram não somente a inibição do crescimento, mas também a morte de tais bactérias (NAKAMURA et al., 2003).

Quanto ao potencial biotecnológico do pigmento, esse apresentou uma série de atividades biológicas *in vitro*, dentre as quais se podem destacar: atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (DE SOUZA et al., 1999; DURÁN e MENCK, 2001); antiparasitária contra importantes patógenos tropicais como *Trypanosoma cruzi* (CALDAS et al., 1978; HAUN et al., 1992; DURÁN et al., 1994) e *Leishmania sp.* (RIVEIROS; HAUN; DURÁN, 1989; LEON et al., 2001; DURÁN e MENCK, 2001; ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003; KODACH et al., 2006); antiviral, onde foi visto que a violaceína juntamente com 10% de deoxiviolaceína apresentou atividade para vírus herpéticos e para poliovírus (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003); antitumoral, sendo efetiva em culturas de células de algumas leucemias, linfomas e tumores de pulmão e cólon (MELO et al., 2000; MELO et al., 2003; FERREIRA et al., 2004; SARAIVA et al., 2004; KODACH et al., 2006; DE CARVALHO et al., 2006.) e em linfomas relacionados à AIDS, o que sugere uma possível aplicação clínica no futuro, além de apresentar propriedades antioxidantes (KONZEN et al., 2006).

Embora apresentem diversas estratégias adaptativas e representem uma rica fonte de genes com grande potencial biotecnológico, de interesse para áreas como saúde, meio ambiente e agricultura, os genomas de espécies de vida livre têm recebido pouca atenção em comparação aos organismos patogênicos. As análises anteriores feitas sobre *C. violaceum* haviam sido baseadas somente no conhecimento de uma pequena fração da constituição genética do organismo. Além disso, as informações básicas sobre os mecanismos e estratégias relacionadas à ampla adaptabilidade desta bactéria, incluindo sua observada (mas não freqüente) infecção em humanos, não foram investigadas com profundidade em níveis moleculares e genéticos. Sendo assim, as informações geradas pelo sequenciamento do genoma de *C. violaceum* serão de suma importância para se ter conhecimento sobre sua história evolutiva, bem como para que suas potencialidades biotecnológicas sejam aplicadas em benefício do homem e do meio ambiente (VASCONCELOS et al., 2003).

Uma porção considerável do genoma *C. violaceum* (40% das ORFs) corresponde a genes não conhecidos, uma vez que foram anotados como hipotéticos conservados ou hipotéticos (VASCONCELOS et al., 2003), o que equivale dizer que grande parte do patrimônio genético dessa espécie ainda não está acessível, sendo possível que exista

uma série de novos genes com potencial biotecnológico e esses são um grande desafio a ser vencido, ainda mais quando não é observada homologia com seqüências já descritas. Desta maneira, abordagens funcionais devem ser aplicadas visando à identificação e caracterização de novos genes.

Considerando que geneticamente *C. violaceum* foi, até o momento, pouco explorada, encontra-se grandes dificuldades para promover o estudo de função gênica neste microorganismo, uma vez que boas ferramentas para a sua manipulação ainda não estão bem desenvolvidas. O objetivo principal deste trabalho é desenvolver estratégias para obter mutantes nesta bactéria, e sendo assim, o primeiro passo foi determinar os melhores parâmetros para manipulá-la geneticamente. Isto inclui a investigação de métodos de transformação, assim como definir os melhores vetores e marcas de resistência para se trabalhar com *C. violaceum*.

Neste trabalho foi utilizada a linhagem ATCC 12472 de *C. violaceum* (VASCONCELOS et al., 2003). Como primeira estratégia para obtenção de mutantes nesta bactéria foram utilizados kits comerciais contendo o transposon Tn5, que se insere aleatoriamente no genoma. Na segunda estratégia os mutantes foram buscados por conjugação bacteriana entre *E. coli* e *C. violaceum*, também utilizando o transposon Tn5, que contém um marcador para resistência a canamicina, conforme descrito em Revers et al., (2000).

Além das tentativas de obter mutantes aleatórios, utilizamos uma estratégia para obter mutações em genes específicos utilizando transformação com um vetor suicida em *C. violaceum*, no qual o plasmídeo recombinante seja transferido para a linhagem de *C. violaceum* ATCC 12472 por conjugação ou eletroporação. Como exemplo das aplicações da mutagênese sítio dirigida por recombinação homóloga, podemos citar o trabalho de Keseler e Kaiser (1997), que construiu mutantes do gene *rpoN* de *Myxococcus xanthus* identificando que σ^{54} é uma proteína vital para esse microrganismo. Isto é bastante útil principalmente para espécies cujo genoma já tenha sido seqüenciado, uma vez que as seqüências geradas podem ser comparadas diretamente com as seqüências genômicas depositadas em bancos de dados públicos. Estes dados possibilitam inferências de possíveis relações e funções dos genes a partir do contexto genômico. Além disso, esta estratégia tem permitido a identificação e caracterização de genes novos, uma vez que é possível empregar sistemas para seleção de fenótipos de interesse. Desta forma, é possível o isolamento e identificação do gene mutado, além de permitir a correlação com a função desempenhada.

A fim de avaliar qual a melhor estratégia a ser utilizada para promover mutação em *C. violaceum* foram escolhidos, inicialmente, genes precursores da via de biossíntese da violaceína, por ser este um fenótipo muito fácil de ser observado, além disso, permitir e investigar o real papel deste pigmento na biologia da bactéria. Outro gene escolhido para estudos foi o *ubiB*. Este, segundo análise de bioinformática, apresentou similaridade e identidade com genes de *Ralstonia eutropha*, responsáveis pela enzima fenol hidroxilase (enzima limitante na via de degradação do fenol). Este gene responsável por codificar a fenol-hidroxilase em *C. violaceum*, ainda não tinha sido caracterizado funcionalmente. Por isso, utilizando a estratégias de mutação, pode-se avaliar a perda de função.

6 CONCLUSÃO

Na tentativa de construir mutantes em *C. violaceum*, primeiro foi necessário estabelecer parâmetros importantes para se trabalhar, já que esta bactéria ainda foi pouco manipulada geneticamente. Os parâmetros estabelecidos neste trabalho incluem: a definição de quais antibióticos esta bactéria se mostra sensível ou resistente; plasmídeos que podem ser utilizados como vetores nesta bactéria porque são capazes de se replicar nela; e a uma forma de introdução com eficiência de DNA exógeno. A partir daí, foi desenvolvido um sistema de interrupção gênica que tornou possível obter com sucesso pelo menos dois mutante em genes de interesse.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os parâmetros utilizados para introdução de DNA exógeno por transformação de *C. violaceum*, já bem estabelecidos para outras bactérias, não se mostraram satisfatórios. No entanto, foi verificado que *C. violaceum* pode receber plasmídeos por conjugação, já que o pRKlacZ290 e o pSUP2021 são replicativos nesta bactéria.

Um plasmídeo suicida pNPTS138 foi utilizado para promover mutação dirigida dos genes *vioB* e *ubiB* em *C. violaceum*, gerando um mutante deficiente na produção do pigmento violaceína e outro deficiente na enzima fenol monoxigenase. Através da técnica de “Southern Blot”, a interrupção dos genes foram confirmadas, e o primeiro fenótipo observado, a mudança de coloração da linhagem mutada *vioB*. Experimentos complementares, utilizando espectro de absorbância para detectar a violaceína, confirmaram a ausência do pigmento no comprimento de onda esperado no mutante no gene *vioB*.

Especulações de que a violaceína poderia estar relacionada a uma proteção contra danos causados por luz UV, o mutante *vioB* apresentou uma maior sensibilidade a UVC, porém não apresentou sensibilidade para UVA e UVB.

A possibilidade de agir como uma substância antioxidante, mostrada em experimento *in vitro* (KONSEN et al., 2006), também não se confirmou quando o mutante foi submetido a estresse causado por H₂O₂. Comparando-se os resultados obtidos com as linhagens selvagem ATCC 12472, mutante *vioB* e CV026, (as duas últimas deficientes na produção do pigmento), observa-se que o pigmento violaceína parece não estar diretamente relacionado à proteção contra o estresse oxidativo provocado por H₂O₂, já que as taxas de sobrevivência e a tolerância exibidas por todas as cepas de *C. violaceum* são muito semelhantes.

Ao contrário do esperado, o mutante *vioB* demonstrou ser mais resistente aos metais FeCl_2 e CdCl_2 quando comparada à linhagem parental. Este mutante também demonstrou uma maior formação de biofilme e uma menor taxa de respiração comparada a selvagem. Todos estes fatores contribuem para a especulação de que a formação maior de biofilme verificada no mutante seria na verdade o agente protetor contra perturbações externas, talvez como um mecanismo de compensação à falta de violaceína, hipótese apoiada pelos resultados obtidos.

Como era esperado, o mutante *ubiB* deficiente na enzima fenol monoxigenase mostrou a perda da função quando submetido a concentrações crescentes de fenol. Isto levanta a possibilidade de *C. violaceum* ser utilizada em processos biotecnológicos na biodegradação de compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS¹

- ABOU-SHANAB, R. A. I.; VAN BERKUM, P.; ANGLE, J. S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. **Chemosphere**, v. 68, p. 360–367, 2007.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; ANTONIO R. V.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI C. R.; SIMÕES, C. M. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.**, v. 98, n. 6, p. 843-848, 2003.
- ANTONIO, R. V.; CRECZYNSKI-PASSA, T. B. Genetics analysis of violacein biosynthesis by *C. violaceum*. **Genet. Mol. Res.** v. 3, p. 85-91, 2004.
- ASAMIZU, S.; KATO, Y.; IGARASHI, Y.; ONAKA, H. VioE, a prodeoxyviolacein synthase involved in violacein biosynthesis, is responsible for intramolecular indole rearrangement. **Tetrahedron Lett**, v. 48, p. 2923–2926, 2007.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAM, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed). **Short protocols in molecular biology**, New York: John Wiley & sons, 1995. 900 p.
- BALLANTINE, J. A.; BEER, R. J. S.; CRUTCHLEY, D. J.; DODD, G. M.; PALMER, D. R. The synthesis of violacein and related compounds. **Proc. Chem. Soc.**, p. 232-233, 1958.
- BALIBAR, C. J.; WALSH, C. T. In vitro Biosynthesis of Violacein from L-Tryptophan by the Enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. **Biochemistry**, v. 45, p. 15444-15457, 2006.
- BALL, M.; CARRERO, P.; CASTRO, D.; YARZ, L. A. Mercury resistance in bacterial strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near el callao (Bolívar State, Venezuela). **Current Microbiology**, v. 54, p. 149–154, 2007.
- BHADRA, B.; NANDA, A. K.; CHAKRABORTY, R. Fluctuation in recoverable nickel and zinc resistant copiotrophic bacteria explained by the varying zinc ion content of Torsa River in different months. **Arch. Microbiol.**, 2006.
- BLOSSER, R. S.; GRAY, K. M. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. **J. Microbiol. Methods**, v. 40, n. 1, p. 47-55, 2000.
- BOISBAUDDRAN, L. Matière colorante se formant dans la colle de farine. **Comp. Rend. Acad. Sci.**, v. 94, p. 562-563, 1882.
- BOONE; D. R.; CASTENHOLZ, R. W. In: GARRITY, G. M. (ed.-in-chief) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer, v. 1. P. 721, 2001.
- BRANDT, U.; TRUMPOWER, B. The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. Review.**, v. 29, n. 3, p. 165-197, 1994.
- BRAZ, V. S.; MARQUES, M. V. Genes involved in cadmium resistance in *Caulobacter crescentus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 15, n. 2, p. 289-95, 2005.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BROETTO, L.; CECAGNO, R.; SANT'ANNA, F. H.; WEBER, S.; SCHRANK, I. S. Stable transformation of *Chromobacterium violaceum* with a broad-host-range plasmid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 71, n. 4, p. 450-454, 2006.

BROMBERG, N.; DURÁN, N. Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties. **J. Mol. Catal. B Enzym.**, v. 11, p. 463–467, 2001.

CALDAS, L. R.; LEITÃO, A. A. C.; SANTOS, S. M.; TYRRELL, R. M. Preliminary experiments on the photobiological preoperties of violacein. In: (Tyrrell, RM. Ed). Academia Brasileira de Ciências. **Proceedings of the International Symposium on Current Topics in Radiology and Photobiology**, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, p. 121-126, 1978.

CAMPBELL, S. C.; OLSON, G. J.; CLARK, T. R.; MCFETERS, G. Biogenic production of cyanide and its application to gold recovery. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, n. 3, p. 134-139, 2001.

CHEN, W. M.; CHANG, J. S.; WU, C. H.; CHANG, S. C. Characterization of phenol and TCE degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. **Res. Microbiol.**, v. 155, p. 672-680, 2004.

CHEN, W. P.; KUO, T. T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 21, n. 9, p. 2260, 1993.

CHERNIN, L. S.; WINSON, M. K.; THOMPSON, J. M.; HARAN, S.; BYCROFT, B. W.; CHET, I.; WILLIAMS, P.; STEWART, G. S. A. B. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate analysis and regulation by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, v.180, n. 17, p. 4435-4441, 1998.

CHOI, K. H.; KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. **J. Microbiol. Methods.**, v. 64, n. 3, p. 391-397, 2006.

CORP, W. A. Factors Influencing Growth and Polysaccharide formation by Strains of *Chromobacterium violaceum*. **J. Bacteriol.**, v.88, n. 5, p. 1433-1441, 1964.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

COVERT, S. F.; KAPOOR, P.; LEE, M. H; BRILEY, A.; NAIRN, C. J. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycol. Res.**, v. 105, p. 259-264, 2001.

CROSSE, P. A.; SOARES, K.; WHEELER, J. L.; COOKE, K. L.; ADIN, C. A.; O'KELLEY, J. J.; LEVY, J. K. *Chromobacterium violaceum* infection in two dogs. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 42, n. 2, p. 154-159, 2006.

DE CARVALHO, D. D.; COSTA, F. T.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. **Toxicol. in vitro.**, v. 20, n. 8, p. 1514-21, 2006.

DE KIEVIT, T. R.; IGLEWSKI, B. H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 9, p. 4839-4849, 2000.

DE LORENZO, V.; HERRERO, M.; JAKUBZIK, U.; TIMMIS, K. N. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. **J. Bacterio.**, v. 172, n. 11, p. 6568-72, 1990.

DE SOUZA, A. O.; AILY, D. C. G.; SATO, D. N.; DURÁN, N. Atividade da violaceína *in vitro* sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. **Ver. Inst. Adolfo Lutz.**, v. 58, p. 59-62, 1999.

DEMOSS, R. D.; EVANS, N. R. Incorporation of C14-labeled substrate into violacein. **J. Bacteriol.**, v. 79, p. 965-968, 1960.

DESOIZE, B. Metals and metal compounds in carcinogenesis. *In Vivo*. v. 17, n. 6, p. 529-539, 2003.

DIAS, J. R. L. C; MOTTA NETO, J. D. D. A.; RETTORI, D.; DURÁN, N. Semiempirical INDOS/S study on the absorption spectrum of violacein. **Jornal of Molecular Structure: THEOCHEM.**, v. 580, p. 85-90, 2002.

DURÁN, N.; JUSTO, G. Z.; FERREIRA, C. V.; MELO, P. S.; CORDI, L.; MARTINS, D. Violacein: properties and biological activities. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 48, n. 3, p. 127-133, 2007.

DURÁN, N.; MENCK, C. F. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.27, n. 3, p. 201-222, 2001.

DURÁN, N.; ANTONIO, R. V.; HAUN, M.; PILLI, R. A. Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. **World J. Microbiology and Biotechnol.**, v. 10, n. 6, p. 686-690, 1994.

DURÁN, N. Violacein: a descoberta de um antibiótico. **Cienc. Hoje**, v. 11, p. 58-60, 1990.

EDGAR, R.; BIBI, E. A single membrane-embedded negative charge is critical for recognizing positively charged drugs by the Escherichia coli multidrug resistance protein MdfA. **EMBO J.**, v. 18, n. 4, 822-832, 1999.

FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; ALMEIDA, R.; PORTILLO, V. D. O. A.; BARBOSA, T. A.; TREVILATO, P. B.; NETO, C. E.; COELHO, R. D.; SILVA, D. W.; BARTOLETI, L. A.; HANNA, E. S.; BROCCHI, M.; MANFIO, G. P. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. **Genet. Mol. Res.**, v.31, n. 1, p. 134-147, 2004.

FERREIRA, C. V.; BOS, C. L.; VERSTEEG, H. H.; JUSTO, G.; DURAN, N.; PEPPELENBOSCH, M. P. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. **Blood**, v. 104, n. 5, p. 1459-1464, 2004.

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.**, v. 132, p. 613, 1993.

GARRITY, G. M.; WINTERS, M.; SEALES, D. B. Taxonomica outline of the genera prokaryotic. **Bergey's manual of syntematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer-verla. p. 1-39, 2001.

GAY, P.; LE COQ, D.; STEINMETZ, M.; BERKELMAN, T.; KADOL, C. I. Positive Selection Procedure for Entrapment of Insertion Sequence Elements in Gram-Negative Bacteria **J. Bacteriol.**, v. 164, n. 2, p. 918-921, 1985.

GOBER, J. W.; SHAPIRO, L. A developmentally regulated *Caulobacter flagellar* promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. **Mol. Biol. Cell.**, v. 3, n. 8, p. 913-2, 1992.

GUEROT-FLEURY, A. M. K.; SHAZAND, N.; FRANDSEN, P.; STRAGIER. Antibiotic resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. **Gene**, v. 167, n. 1, p. 335-336, 1985.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, n. 4, p. 557-80, 1983.

HAUN, M.; PEREIRA, M. F.; HOFFMANN, M. E.; JOYAS, A.; CAMPOS, V.; FILARDI, L. D.; DE CASTRO, S. L.; DURÁN, N. Bacterial chemistry. VI. Biological activities and cytotoxicity of 1,3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives. **Biol. Res.**, v. 25, n. 1, p. 21-25, 1992.

HINO, S.; WATANABE, K.; TAKAHASHI, N. Phenol hydroxylase cloned from *Ralstonia eutropha* strain E2 exhibits novel kinetic properties. **Microbiology**, v. 144, p. 1765-1772, 1998.

HOLZINGER, A.; LÜTZ, C. Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. **Micron**, v. 37, n. 3, p. 190-207, 2006.

HOSHINO, T.; KONDO, T.; UCHIYAMA, T.; OGASAWARA, N. Biosynthesis of violacein: a novel rearrangement in tryptophan metabolism with a 1,2 shift of the indole ring. **Agri. Biol. Chem.**, v. 51, p. 965-968, 1987.

HUNGRIA, M.; NICOLAS, M. F.; GUIMARAES CT, JARDIM SN, GOMES EA, VASCONCELOS AT. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Mutat. Res.**, v. 603, n. 1, p. 97-103, 2004.

ITALIANI, V. C.; MARQUES, M. V. Isolation and characterization of *Caulobacter* mutants impaired in adaptation to stationary phase. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 85-90, 2003.

ITALIANI, V. C.; ZULETA, L. F.; MARQUES, M. V. The transcription termination factor Rho is required for oxidative stress survival in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 44, n. 1, p. 181-194, 2002.

JACOBS, M. A.; ALWOOD, A.; THAIPISUTTİKUL, I.; SPENCER, D.; HAUGEN, E.; ERNST, S.; WILL, O.; KAUL, R.; RAYMOND, C.; LEVY, R.; CHUN-RONG, L.; GUENTHNER, D.; BOVEE, D.; OLSON, M. V.; MANOIL, C. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 25, n. 24, p. 14339-14344, 2003.

KESELER, I. M.; KAISER, D. Sigma 54, a vital protein of *Myxococcus xanthus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 94, n. 5, p. 1979-1984, 1997.

KITA, Y.; NISHIKAWA, H.; TAKEMOTO, T. Effects of cyanide and dissolved oxygen concentration on biological Au recovery. **J. Biotechnol.**, v. 124, n. 3, p. 545-51, 2006.

KOBAYASHI, H.; NOGI, Y.; HORIKOSHI, K. New Violet 3,3-bipiridyl pigment purified from deep-sea microorganism *Shewanella violácea* DSS12. **Extremophiles**, v. 11, n. 2, p. 245-250, 2007.

KODACH, L. L.; BOS, C. L.; DURÁN, N.; PEPPELENBOSCH, M. K.; FERREIRA, C. V.; HARDWICK, C. H. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 3, p. 508, 2006.

KOIDE, T.; DA SILVA NETO, J. F.; GOMES, S. L.; MARQUES, M. V. Insertional transposon mutagenesis in the *Xylella fastidiosa* Citrus Variegated Chlorosis strain with transposome. **Curr. Microbiol.**, v. 48, n. 4, 247-250, 2004.

KOLIBACHUK, D.; MILLER, A.; DENNIS, D. Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (phaC) gene from *Chromobacterium violaceum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 8, p. 3561-3565, 1999.

KOLTER, R.; INUZUKA, M.; HELINSKI, D. R. Transcomplementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. **Cell**, v. 15, p. 1199-1208, 1978.

KONZEN, M.; DE MARCO, D.; CORDOVA, C. A.; VIEIRA, T. O.; ANTÔNIO, R. V.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, n. 24, p. 8307-13, 2006.

LAATSCH, H.; THOMSON, R. H. Spectroscopic properties of violacein and related compounds: Crystal structure of tetramethylviolacein. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. II**: p. 1331-1335, 1984.

LEE, M. D.; ODOM, J. M.; BUCHANAN, R. J. JR. New perspectives on microbial dehalogenation of chlorinated solvents: insights from the field. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 52, p. 423-452, 1998.

LEON, L. L.; MIRANDA, C. C. DE SOUZA, A. O.; DURÁN, N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 48, n. 3, p. 449-450, 2001.

LIN, J. K.; LIANG, Y. C. Cancer chemoprevention by tea polyphenols. **Proc. Natl. Sci. Counc Repub China B**, v. 24, n. 1, p. 1-13, 2000.

LICHSTEIN, H. C.; VAN DE SAND, V. F. Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. **J. Infect. Dis.**, v. 76, p. 47-51, 1945.

MAI-PROCHNOW, A.; LUCAS-ELIO, P.; EGAN, S.; THOMAS, T.; WEBB, J. S.; SANCHEZ-AMAT, A.; KJELLEBERG, S. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 15, p. 5493-5501, 2008.

MANJUNATH, M. Fatal septicaemia due to *Chromobacterium violaceum*. **West. Indian. Med. J.**, v. 56, n. 4, p. 380-1, 2007.

MARTINELLI, D., GROSSMANN, G., SE' QUIN, U., BRANDL, H. & BACHOFEN, R. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. **BMC Microbiol.**, v. 4, p. 25, 2004.

MARTINEZ, P.; MATTAR, S. Fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum* in a child from Colombia. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 49, n. 6, p. 391-393, 2007.

MCCLEAN, K.H., WINSON, M.K., FISH, L., TAYLOR, A., CHHAB, B.W., STEWART, G.S.A.B., WILLIAMS, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of Nacylhomoserine lactones. **Microbiology U.K.**, v. 143, p. 3703-3711, 1997.

MELO, P. S.; JUSTO, G. Z.; DE AZEVEDO, M. B.; DURÁN, N.; HAUN, M. Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. **Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 217-225, 2003.

MELO, P. S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C.; HAUN, M.; DURÁN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.**, v. 36, n. 8, p. 539-543, 2000.

MUKHOPADHYAY, R. R.; PHUNG, B. P.; PHUNG, L. T.; SILVER, S. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 26, n. 3, p. 311-325, 2002.

NAKAHARA, H.; ISHIKAWA, T.; SARAI, Y.; KONDO, I.; KOZOKUE, H.; SILVER, S. Linkage of mercury, cadmium and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 975-976, 1977.

NAKAMURA, Y., ASADA, C. AND SAWADA, T. Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain. **Biotechnol and Bioprocess Eng.**, v. 8, n. 1, p. 37-40, 2003.

PANTANELLA, F.; BERLUTTI, F.; PASSARIELLO, C.; SARLI, S.; MOREA, C.; SCHIPPA, S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, n. 4, p. 992-999, 2007.

PARKHILL, J., ACHTMAN, M., JAMES, K. D., BENTLEY, S. D., CHURCHER, C., KLEE, S. R., MORELLI, G., BASHAM, D., BROWN, D., CHILLINGWORTH, T. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. **Nature**, v. 404, n. 6777, p. 502-506, 2000.

PERBETON, J. M.; VICENT, K. M.; EPEFOLD, R. J. Cloning and heterologous expression of the violacein biosynthesis gene cluster from *Chromobacterium violaceum*. **Curr. Microbiol.**, v. 22, n. 6, p. 355-358, 1991.

PERERA, S.; PUNCHIHEWA, P. M.; KARUANANAYAKE, M. C.; DE SILVA, N. Fatal septicaemia caused by *Chromobacterium violaceum*. **Ceylon. Méd. J.**, v. 48, n. 1, p. 26-27, 2003.

PERPETUO, E. A.; MARQUES, R. C. P.; MENDES, M. A.; LIMA, W. C.; MENCK, C. F. M.; NASCIMENTO, C. A. O. Characterization of the phenol monooxygenase gene from *Chromobacterium*

violaceum: potential use for phenol biodegradation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 1-7, 2009.

[PRICE-WHELAN, A.](#); [DIETRICH, L. E.](#); [NEWMAN, D. K.](#) Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 17, p. 6372-6381, 2007.

[POON, W. W.](#); [DAVIS, D. E.](#); [HA, H. T.](#); [JONASSEN, T.](#); [RATHER, P. N.](#); [CLARKE, C. F.](#) Identification of *Escherichia coli* ubiB, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 18, p. 5139-5146, 2000.

REILLY, J.; PYNE, G. On the pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. **Sci. Proc. Roy. Dub. Soc.**, v. 21, n. 5, p. 1059-1064, 1927.

RETTORI, D.; DURÁN, N. Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido por *Chromobacterium violaceum*. **World Journal of Microbiology**, v. 14, p. 685-688, 1998.

REVERS, L. F.; PASSAGLIA, L. M.; MARCHAL, K.; FRAZZON, J.; BLAHA, C. G.; VANDERLEYDEN, J.; SCHRANK, I. S. Characterization of an *Azospirillum brasilense* Tn5 mutant with enhanced N(2) fixation: the effect of ORF280 on *nifH* expression. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 183, n. 1, p. 23-29, 2000.

RICHARD, C. *Chromobacterium violaceum*, opportunist pathogenic bacteria in tropical and subtropical regions. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 86, n. 3, p. 169-173, 1993.

RIVEROS, R.; HAUN, M.; DURÁN, N. Effect of growth condition on production of violacein by *Chromobacterium violaceum* (BB_78 strain). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 22, n. p. 569-577, 1989.

ROKITKO, P. V.; ROMANOVSKA, V. O.; MALASHENKO, I. U. R.; CHORNA, N. A. Effect of UV-radiation and drying on bacterium diversity in soil. **Mikrobiol. Z.**, v. 66, n. 1, p. 68-77, 2004.

ROBERTS, R. C.; TOOCHINDA, C.; AVEDISSIAN, M.; BALDINI, R. L.; GOMES, S. L.; SHAPIRO, L. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 7, p. 1829-1841, 1996.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. Chemical Analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques; John Wiley & Sons, p189, 2000.

RYAN, K. S.; BALIBAR, C. J.; TURO, K. E.; WALSH, C. T.; DRENNAN, C. L. The violacein biosynthetic enzyme VioE shares a fold with lipoprotein transporter proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 10, p. 6467-6475, 2008.

SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULT, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J. C.; CATTOLICO, L. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 497-502, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SARAIVA, V. S.; MARSHALL, J. C.; COOLS-LARTIGUE, J.; BURNIER, M. N., JR. Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines. **Melanoma Res.**, v. 14, n. 5, p. 421-424, 2004.

SCHULTZ, J. E.; MATIN, A. **J. Mol. Biol.**, v. 218, p. 129-140, 1991.

SHINODA, K.; HASEGAWA, T. I.; SATO, H.; SHINOZAKI, M.; KURAMOTO, H.; TAKAMIYA, Y.; SATO, T.; NIKAIKIDOU, N.; WATANABE, T.; HOSHINO, T. Biosynthesis of violacein: a genuine intermediate, protoviolaceinic acid, produced by VioABDE, and insight into VioC function. **Chem. Commun.**, v. 28, n. 40, p. 4140-4142, 2007.

SILVER, S.; MISTRA, T. K. Plasmid mediated metals resistance. **Annu. Ver. Microbiol.**, v. 42, n. p. 717–743, 1988.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A broad host range immobilization system for *in vivo* engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. **Biotechnology**, v. 1, p. 784 – 790, 1993.

SIRINAVIN, S.; TECHASAENSIRI, C.; BENJAPONPITAK, S.; PORNKUL, R.; VORACHIT, M. Invasive *Chromobacterium violaceum* infection in children: case report and review. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 24, n. 6, p. 559-561, 2005.

SMITH, D. H. R-Factor mediated resistance to mercury, nickel and cobalt. **Science**, v. 156, n. 3778, p. 1114–1115, 1967.

SNEATH, P. H. A. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 1. Williams & Williams, Baltimore p. 580–582, 1984.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, v. 5, n. 3, p. 503-17, 1975.

STRONG, F. M. Isolation of violacein. **Science**, v. 100, p. 287, 1944.

STEPHENS, C. Microbial genomics: tropical treasure? **Curr. Biol.**, v. 20, n. 2, p. R65-6, 2004.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959–964, 2000.

SUMITA, T. C.; PEREIRA, R. S.; SILVA, M. B.; DA ROSA, L. C. L.; UENO, M. Avaliação da interação de Zinco, Alumínio, Cobre e Manganês em *Chromobacterium violaceum*. **Revista Amb-Água**, v. 2, n. 3, p. 44-53, 2007.

TAKEO, M.; PRABU, S. K.; KITAMURA, C.; HIRAI, M.; TAKAHASHI, H.; KATO, D.; NEGORO, S. Characterization of alkylphenol degradation gene cluster in *P. Putida* MT4 and evidence of oxidation of alkylphenol and alkylcatechols with medium-length alkyl chain. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 102, n. 4, p. 352-361, 2006.

TEOH, A. Y.; HUI, M.; NGO, K. Y.; WONG, J. LEE, K. F.; LAI, P. B. Fatal septicaemia from *Chromobacterium violaceum*: case reports and review of the literature. **Hong Kong Med. J.**, v. 12, n. 3, p. 228-31, 2006.

THEODORAKIS, C. W.; SWARTZ, C. D.; ROGERS, W. J.; BICKHAM, J. W.; DONNELLY, K. C.; ADAMS, S. M. Relationship between genotoxicity, mutagenicity and fish community structure in a contaminated stream. **J. Aquat. Ecosyst. Stress and Recovery**. Dordrecht. v. 7, n. 2, p. 131-143, 2000.

TONG, X.; CAMPBELL, J. W.; BALÁZSI, G.; KAY, K. A.; WANNER, B. L.; GERDES, S. Y.; OLTVAI, Z. N. Genome-scale identification of conditionally essential genes in *E. coli* by DNA microarrays. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 10, n. 1, p. 347-354, 2004.

TORNALETTI, S.; HANAWALT, P. C. Effect of DNA lesions on transcription elongation. **Biochimie.**, v. 81, n. 2, p. 139-146, 1999.

TSAI, J. W., ALLEY, M. R. Proteolysis of the McpA chemoreceptor does not require the *Caulobacter* major chemotaxis operon. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 2, p. 504 -507, 2000.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 10, n. 1, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, A. T.; ALMEIDA, D. F.; HUNGRIA, M.; GUIMARAES, C. T.; VASCONCELLOS, R.; ALMEIDA, A.; ALMEIDA, L.; ALMEIDA, R.; ALVES-GOMES, J.; ANDRADE, E. M.; ARARIPE, J.; ARAUJO, M. F.; ASTOLFI-FILHO, S.; AZEVEDO, V.; BAPTISTA, A.; BATAUS, L. A.

M.; BATISTA, J. S.; BELO, A.; VAN DEN BERG, C.; BOGO, M.; BONATTO, S.; BORDIGNON, J.; BRIGIDO, M.; BRITO, C. A.; BROCCHI, M.; BURITY, H. A.; CAMARGO, A. A.; CARDOSO, D.; CARNEIRO, N. P.; CARRARO, D. M.; CARVALHO, C. M.; CASCARDO, J.; CAVADA, B.; CHUEIRE, L. M.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; JUNIOR, N.; FAGUNDES, N.; FALCÃO, C. L.; FANTINATTI, F.; FARIAS, I. P.; FELIPE, M. S. S.; FERRARI, L. P.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T.; FRANCO, G.; FREITAS, N. S.; FURLAN, L. R.; GAZZINELLI, R. T.; GOMES, E. A.; GONCALVES P. R.; GRANGEIRO, T. B.; GRATTAPAGLIA, D.; GRISARD, E. C.; HANNA, E. S.; JARDIM, S. N.; LAURINO, J.; LEOL, L. C.; AGNEZ LIMA, L. F.; LOUREIRO, M. F.; LYRA, M. C.; MADEIRA, H. M.; MANFIO, F. G. P.; MARANHÃO, A. Q.; MARTINS, W. S.; MAURO, S. M.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R.; MEISSNER, R. V.; MOREIRA, M. A.; NASCIMENTO, F. F.; NICOLAS, M. F.; OLIVEIRA, J. G.; OLIVEIRA, S. C.; PAIXAO, R. F.; PARENTE J. A.; PEDROSA, F. O.; PENA, S. D.; PEREIRA, J. O.; PEREIRA, M.; PINTO, L. S. R. C.; PINTO, L. S.; PORTO, J. I. R.; POTRICH, D. P.; RAMALHO-NETO, C. E.; REIS, A. M. M.; RONDINELLI, E.; SANTOS, E. B. P.; SANTOS, F. R.; SCHNEIDER, M. P.; SEUANEZ H. N.; SILVA, A. M. R.; SILVA, A. L. C.; SILVA, D. W.; SIMOES, I. C.; SIMON, D.; SOARES, C. M. A.; SOARES, R. B. A.; SOUZA, E. M.; SOUZA, K. R. L.; SOUZA, R. C.; STEFFENS, M. B. R.; STEINDEL, M.; TEIXEIRA, S. R.; URMENYI, T.; VETTORE, A.; WASSEM, R.; ZAHA, A.; SIMPSON, A. J. G. The Complete Genome Sequence of *Chromobacterium violaceum* Reveals Remarkable and Exploitable Bacterial Adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11660-11665, 2003.

ZHANG, J.; MADDEN, T. L. Power BLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. **Genome. Res.**, v. 7, n. 6, p. 649-656, 1997.

ZULETA, L. F.; ITALIANI, V. C.; MARQUES, M. V. Isolation and characterization of NaCl-sensitive mutants of *Caulobacter crescentus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 6, p. 3029-3035, 2003.

YADA, S., WANG, Y., ZOU, Y., NAGASAKI, K., HOSOKAWA, K., OSAKA, I., ARAKAWA, R.; ENOMOTO, K. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. **Marine Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 128-132, 2008.

WAISBERG, M.; JOSEPH, B.; BEYERSMANN, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology**, v. 192, n. 2-3, p. 95-117, 2003.

WATANABE, K.; FUTAMATA, H.; HARAYAMA, S. Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 655-663, 2002.

WINSON, M. K.; CAMARA, M.; LATIFI, A.; FOGLINO, M.; CHHABRA, S. R.; DAYKIN, M.; BALLY, M.; CHAPON, V.; SALMOND, P. C.; BYCROFT, B. W.; LAZDUNSKI, A.; STEWART, G. S. A. B.; WILLIAMS, P. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, p. 9427-9431, 1995.