

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

***Chromobacterium violaceum*: CARACTERIZAÇÃO
CULTURAL, BIOQUÍMICA, MOLECULAR E DETECÇÃO DA
PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATO - PHA**

ADRIANA ALMEIDA ANTUNES

RECIFE

2006

ADRIANA ALMEIDA ANTUNES

***Chromobacterium violaceum*: CARACTERIZAÇÃO
CULTURAL, BIOQUÍMICA, MOLECULAR E DETECÇÃO DA
PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATO - PHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, nível Mestrado, como parte dos requisitos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área: Microbiologia Aplicada

ORIENTADORA: Profa. Dra. GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI

RECIFE
FEVEREIRO/2006

Antunes, Adriana Almeida

***Chromobacterium violaceum* : caracterização cultural, bioquímica, molecular e detecção da produção de polihidroxialcanoato-PHA / Adriana Almeida Antunes. – Recife : O Autor, 2006.**

78 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Ciências biológicas – Microbiologia aplicada. 2. *Chromobacterium violaceum* – Identificação e caracterização cultural – Testes bioquímicos e moleculares . 3. Produção de polihidroxialcanoato-PHA – Polímero biodegradável – Detecção. I. Título.

**579.6
579.3**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-136**

***Chromobacterium violaceum*: CARACTERIZAÇÃO CULTURAL,
BIOQUÍMICA, MOLECULAR E DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE
POLIHIDROXIALCANOATO - PHA**

Adriana Almeida Antunes

Orientador:



Prof^ª. Dr^ª Galba Maria de Campos Takaki

Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife, PE

Examinadores:



Prof^ª. Dr^ª Rosa Valéria da Silva Amorim

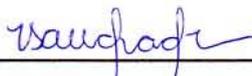
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof^ª. Dr^ª Maria Aparecida de Resende

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG

Suplentes:



Prof^ª. Dr^ª Vania de Souza Andrade

Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, AL



Prof^ª. Dr^ª Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE

RECIFE

2006

Aos meus pais, Marcelo e Maria Thereza Antunes pelo amor, compreensão incentivo e por todas as oportunidades que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus avós Levy e Engracia (*in memoriam*) pela compreensão, apoio e amor incondicional aos netos, pela simplicidade, alegria de viver e doçura no modo de tratar.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, que me deu forças e me fez cumprir mais uma etapa da minha vida acadêmica.

À coordenadora e vice-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Profa. Dra. Suely Lins Galdino e Profa. Dra. Maria Tereza Correia, aos professores do curso e funcionários em especial, Adenilda Eugênia de Lima e Liane Salomé de Lima Santos pelo carinho.

Aos meus irmãos, Tathyana e Guilherme Antunes e a todos os meus familiares, pela compreensão e carinho.

À minha orientadora Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, pelo profissionalismo, apoio, paciência e carinho dedicados.

Ao Pe. Theodoro Paulo Severino Peters, Reitor da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), pela utilização de toda a infra-estrutura do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais para a realização deste trabalho.

Aos amigos Maria Luiza Bastos da Silva, Dr. Ricardo Kenji Shiosaki, MSc. Stella Maris Castro Gimenez, Marta Cristina, Raquel Rufino, Thaiza Stamford, Juliana Luna, Norma Evangelista, Patrícia Mendes, Petrusk Homero, Marcos Moraes, Marcos Lima, Vladimir Vidal, Maria do Carmo Catanho, Adriana Xavier e a todos os estagiários pelo carinho e amizade.

À secretária do NPCIAMB Sônia Maria de Souza e aos técnicos de laboratório Severino Humberto de Almeida e Salatiel Joaquim dos Santos pela colaboração.

Aos meus amigos, que sempre estiveram comigo e me apoiaram.

Um agradecimento especial a Denis Carvalho de Sousa, as famílias Carvalho e Sousa, aos meus alunos, e a minha grande amiga Danielle de Oliveira, pelos momentos de dedicação.

Ao CNPq, a FACEPE e FINEP, pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1.0 INTRODUÇÃO	13
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 <i>Chromobacterium violaceum</i> : histórico	14
2.2 Características de <i>Chromobacterium violaceum</i>	15
2.3 Produção de pigmento por <i>Chromobacterium violaceum</i>	16
2.4 <i>Chromobacterium violaceum</i> : patogenicidade	19
2.5 Produção de polihidroxialcanoato (PHA)	20
2.5.1 Polihidroxialcanoatos: histórico	20
2.5.2 Polihidroxialcanoatos: considerações gerais	21
2.5.3 Polihidroxialcanoatos: classificação e constituição química	23
2.5.4 Síntese de polihidroxialcanoatos	25
2.5.5 Perspectivas futuras para utilização de polihidroxialcanoatos	27
3.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
4.0 OBJETIVOS	40
4.1 Geral	40
4.2 Específicos	40
5.0 ARTIGO	41
5.1 Aspectos fenotípicos e moleculares de linhagens de <i>Chromobacterium violaceum</i> e detecção da produção de polihidroxialcanoato - PHA	42
5.2 RESUMO	43
5.3 ABSTRACT	44
5.4 INTRODUÇÃO	45
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.5.1 Procedimentos Experimentais	52

5.5.2	Microrganismos	52
5.5.3	Caracterização morfológica e bioquímica	53
5.5.4	Caracterização molecular	54
5.5.4.1	Extração do DNA	54
5.5.4.2	Reações de amplificação	54
5.5.4.3	Análise Filogenética	55
5.5.4.4	Grau de similaridade	55
5.5.5	Produção de polihidroxicanoato	56
5.5.5.1	Seleção das linhagens produtoras de PHA	56
5.5.5.2	Caracterização da produção de PHA	56
6.0	REFERÊNCIAS	57
7.0	CONCLUSÕES	74
8.0	ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

***Chromobacterium violaceum*: Caracterização cultural, bioquímica, molecular e detecção de polihidroxialcanoato-PHA**

Figura 1 a e b – Aspectos do crescimento e micrografia eletrônica de <i>Chromobacterium violaceum</i>	16
Figura 2 – Estrutura química da violaceína	17
Figura 3 – Lesões (perna/mão) causadas por <i>Chromobacterium violaceum</i>	19
Figura 4 – Fórmula geral dos poliésteres de ácidos hidroxialcanóicos	24
Figura 5 – Rotas metabólicas para a produção de PHA	26

Artigo

Aspectos fenotípicos e moleculares de linhagens de *Chromobacterium violaceum* e detecção da produção de polihidroxialcanoato - PHA

Figura 1 – Dendograma construído pelo coeficiente de Jaccard representando o grau de similaridade entre isolados de <i>Chromobacterium violaceum</i> , baseado nas respostas dos testes bioquímicos realizados	65
Figura 2 – Dendograma construído pelo coeficiente de Jaccard representando o grau de similaridade pela susceptibilidade das treze linhagens de <i>Chromobacterium violaceum</i> frente aos antimicrobianos	67
Figura 3 – Polimorfismo de RAPD detectados em treze isolados	69

de <i>Chromobacterium violaceum</i> amplificados com o primer OPAA-06	
Figura 4 – Polimorfismo de RAPD detectados em treze isolados de <i>Chromobacterium violaceum</i> amplificados com o primer OPT-13	70
Figura 5 – Dendograma construído pelo coeficiente de Jaccard representando o grau de similaridade entre isolados de <i>Chromobacterium violaceum</i> baseado em DNA amplificado por APD e no padrão de bandas amplificadas	71
Figura 6 – Produção de polihidroxicanoato em diferentes concentrações de Nilo blue por linhagens de <i>Chromobacterium violaceum</i>	72
Figura 7 - Produção de polihidroxicanoato em diferentes concentrações de verde malaquita por linhagens de <i>Chromobacterium violaceum</i>	73

LISTA DE TABELAS

***Chromobacterium violaceum*: Caracterização cultural, bioquímica, molecular e detecção de polihidroxialcanoato-PHA**

Tabela 1 - Efeito do custo do substrato sobre a produção e o rendimento do PHB	22
Tabela 2 - Microrganismos, Substratos e Co-polímeros na produção de Polihidroxialcanoato-PHA.	23

Artigo

Aspectos fenotípicos e moleculares de linhagens de *Chromobacterium violaceum* e detecção da produção de polihidroxialcanoato - PHA

Tabela 1 – Isolados de <i>Chromobacterium violaceum</i> depositados na coleção de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da UNICAP/PE	62
Tabela 2 – Crescimento das treze linhagens de <i>Chromobacterium violaceum</i> em diferentes meios de cultura	63
Tabela 3 – Resultado dos testes bioquímicos realizados em treze linhagens de <i>Chromobacterium violaceum</i>	64
Tabela 4 – Resultado do antibiograma realizado para treze linhagens de <i>Chromobacterium violaceum</i>	66
Tabela 5 – Iniciadores aleatórios selecionados para amplificação de DNA de <i>Chromobacterium violaceum</i> através da reação em cadeia da polimerase (RAPD/PCR)	68

LISTA DE ABREVIATURAS

MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico

C. violaceum – *Chromobacterium violaceum*

PHAs – Polihidroxialcanoatos

PHB – Polihidroxiacetato

PMHB - Polihidroxiacetato

PHV – Polihidroxiacetato

PMHV – Polihidroxiacetato

HHx – Hidroxiacetato

HHp – Hidroxiacetato

HASCL – Short Chain Length

HAMCL – Medium Chain Length

HALCL – Long Chain Length

A. eutrophus – *Alcaligenes eutrophus*

COA – Coenzima A

PET – Tereftalato de etileno

LB – Luria Bertani

MH – Mueller Hinton

MC – Mac Conkey

BHI – Brain Heart Infusion

TSI – Tryptic sugar iron

TSB – Tryptic soy broth

UPGMA – Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean

NTSYS – pc – Numerical Taxonomy and Multivariate System, versão 2.0

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

RESUMO

Estudos foram realizados com treze linhagens de *Chromobacterium violaceum* avaliando as características bioquímicas, a variabilidade genética e a produção de polihidroxicanoato. Os isolados demonstraram maior crescimento no meio Luria Bertani, suplementado com glicose. Todos os isolados foram negativos para os testes de uréia, manitol, lactose e indol, e positivos para frutose, lisina, sacarose, glicose, catalase, gelatinase, motilidade e oxidase. Todas as linhagens demonstraram resistência aos antimicrobianos ampicilina e cefalotina. Observou-se ainda, resistência para gentamicina e amicacina (UCP 1035-Ceará) e para imipenen, cloranfenicol e amicacina (UCP 1489-Pernambuco), evidenciando características fenotípicas distintas entre as treze linhagens. A variabilidade genética das linhagens de *C. violaceum* foi avaliada pelo índice de similaridade de Jaccard, utilizando-se o método UPGMA nas análises de agrupamento. Os índices de similaridade variaram de 0,17 a 0,35 para onze isolados, enquanto que, os isolados UCP 1462 e UCP 1463 apresentaram 100% de similaridade. O perfil de RAPD foi característico para cada linhagem, permitindo a formação de dois grupos indicando a variabilidade genética dos isolados analisados. A detecção da produção de polihidroxicanoato foi realizada utilizando os corantes Nilo blue e verde malaquita, destacando-se a linhagem de *C. violaceum* UCP 1467, como maior produtora do biopolímero.

Palavras chave: *Chromobacterium violaceum*, caracterização bioquímica, RAPD, produção de polihidroxicanoato, similaridade.

Abstract

Studies were carried out with thirteen strains of *Chromobacterium violaceum* evaluating the biochemical characteristics, the genetic variability and the polyhydroxyalkanoate production. The isolates had demonstrated to greater growth on the Luria Bertani medium, supplemented with glucose. All the isolates had been negative for the urea tests, manitol, lactose and indol, and positive for fructose, lysine, sucrose, glucose, catalase, gelatinase, motility and oxidase. All the strains were demonstrated resistance to ampicillin and cephalotin. It was still observed, resistance for gentamicin and ampicillin (UCP 1035-Ceará), and for imipenem, chloramphenicol and ampicillin (UCP 1489-Pernambuco), evidencing phenotypic characteristics between the thirteen strains. The genetic variability of *C. violaceum* strains was evaluated by the index of Jaccard similarity, using UPGMA method in the grouping analyses. The similarity indices had varied of 0.17 to 0.35 for eleven isolated ones, while that, isolated the UCP 1462 and UCP 1463 had presented 100% of similarity. The RAPD profile was characteristic for each strain, allowing to the formation of two analyzed groups indicating the genetic variability of the isolates. The detection of the polyhydroxyalkanoate production was carried out using the Nile blue and green malachite dyes, being distinguished strain of *C. violaceum* UCP 1467, as higher biopolymer producer.

Key words: *Chromobacterium violaceum*; biochemical characterization; RAPD; similarity; Polyhydroxyalkanoate production.

1. INTRODUÇÃO

Chromobacterium violaceum, descrita pela primeira vez por Boisbaudran em, 1882, é um importante microrganismo do ambiente, escolhido pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), como modelo para ser o primeiro microrganismo a ter seu genoma completamente seqüenciado, através de consórcio de laboratórios de âmbito nacional (VASCONCELOS et al., 2003).

Segundo Yu et al., (1999), *C. violaceum* foi provavelmente isolado no passado, mas não foi reconhecido como patogênico (SCHATTENBERG & HARRIS, 1941; SNEATH et al., 1953).

De acordo com as pesquisas realizadas por Creczynski-Pasa & Antônio (2004), *C. violaceum* não é considerada uma bactéria exigente. Em condição aeróbia, é capaz de crescer em meios com carboidratos simples, como a glicose, frutose, galactose e ribose, utilizando as vias de Embden-Meyerhoff, ciclos de Krebs e do glioxilato. Em condições de anaerobiose, a bactéria metaboliza glicose, produzindo ácidos acético e fórmico, mas não produz ácido láctico ou etanol. *C. violaceum* é capaz, ainda, de utilizar aminoácidos e lipídios como suplementos energéticos (CRECZYNSKI-PASA & ANTÔNIO, 2004).

A literatura considera *C. violaceum* como uma bactéria com características raras entre os microrganismos já descritos. Apresenta a expressão da enzima elastase (ZINN et al., 2001), como também grande potencial na produção de polihidroxicanoatos (PHAs), polímeros orgânicos com características físico-químicas muito semelhantes aos plásticos derivados da indústria petroquímica - propileno e polietileno, representando uma excelente alternativa como substitutos destes plásticos (RAMOS-COMERZANA, MONTEOLITA-SANCHEZ, 2000).

Neste sentido, estudos foram realizados caracterizando treze linhagens de *C. violaceum*, isoladas de diferentes localidades, através de técnicas bioquímicas, moleculares, estabelecendo o grau de similaridade entre as linhagens, além da detecção da produção de polihidroxicanoato (PHA).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Chromobacterium violaceum* : histórico

Chromobacterium violaceum foi descrita pela primeira vez no século XIX por Boisbaudran em 1882, evidenciando a formação de uma coloração violeta sobre um preparado à base de arroz, que o autor atribuiu a um “pequeno organismo” (BOISBAUDRAN, 1882). Esta observação foi realizada em 1867, 15 anos antes do artigo ser publicado. Mais tarde, De Moss definiu o “pequeno organismo” e o pigmento descrito por Boisbaudran, como sendo provavelmente *Chromobacterium violaceum* e a violaceína, respectivamente, devido ao espectro de absorção de luz visível registrado pelo próprio Boisbaudran (DEMOSS, 1967). De forma independente, em 1880, Bergonzini fez uma descoberta acidental, enquanto trabalhava com soluções de ovoalbumina na Universidade Modena na Itália. Ele havia preparado, em março de 1880, muitas soluções de albumina de ovo para estudar o mecanismo de retardamento da putrefação, e neste experimento, ele esqueceu de descartar uma das soluções que servia de controle, sendo esquecido em laboratório, com posterior aparecimento de um filme fantástico. O pesquisador italiano reduziu o volume por evaporação e obteve uma solução de um fino filme muito denso de cor violeta. No início, se pensava ser a *Cromococcus violaceus*, que era a única bactéria conhecida que apresentava coloração violeta, mas, percebeu que se tratava de outra bactéria. Após alguns experimentos, Bergonzini a denominou de *Cromobacterium violaceum*, e publicou sua descoberta “sobre uma nova bactéria colorida” (BERGONZINI, 1881). Em seguida, Zimmerman corrigiu a ortografia de *Cromobacterium* dado por Bergonzini para *Chromobacterium violaceum*, adicionando o h ao nome (BUCHANAN, 1918; ZIMMERMAN, 1881; BALOWS et al., 1991). Entretanto, por um longo período a *Chromobacterium violaceum* era chamada de *Bacillus violaceus* (TOBIE, 1934). Hoje, o gênero, descrito por Sneath, é encontrado no Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey’s (HOLT & FRIEG, 1984).

No Brasil, a *Chromobacterium violaceum* só foi relatada quase um século depois. Em abril de 1976, na frente da estação de tratamento de água da cidade de Manaus (Amazonas) foi recolhida uma amostra de água proveniente de uma profundidade de 30 metros. O objetivo era realizar uma análise bacteriológica, e os resultados indicaram a existência de apenas dois tipos diferentes de colônias bacterianas: colônias brancas e violetas. As violetas foram identificadas pelo Professor Wilson Chagas de Araújo, do Instituto de Microbiologia da UFRJ, como sendo a *C. violaceum*, sendo esta a primeira vez que se isolou e se estudou esse microrganismo no Brasil (CALDAS, 1977; CALDAS et al., 1978). A violaceína foi considerada como um pigmento protetor da irradiação solar para a bactéria, por sugestão do Professor Caldas, do Instituto de Biofísica, UFRJ, originando assim, uma série de estudos, que evidenciaram o potencial fototerapêutico dessa substância (DURÁN & FALJONI-ALARIO, 1980; CALDAS, 1990; DURÁN, 1990).

Em 2000, a bactéria *Chromobacterium violaceum*, foi escolhida pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) para ser o primeiro microrganismo a ter o seu genoma completamente seqüenciado, devido ao seu potencial biotecnológico. A seqüência completa do seu genoma foi finalizada e publicada em 2002 (BRAZILIAN GENOMA PROJECT CONSORTIUM, 2003)

2.2 Características de *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum é um microrganismo de vida livre que se apresenta sob a forma de bastonete ou coco-bacilo pequeno (0,6-9,0µm x 1,5-3,0µm), Gram-negativo, móvel (com um único flagelo polar e a média de 1 a 4 flagelos de posição lateral ou subpolar), não esporulado, aeróbio ou anaeróbio facultativo, que pertence a família Neisseriaceae. As colônias são de cor violeta, convexas, planas (embora variantes possam ser irregulares e não-pigmentadas) e não gelatinosas (Figura 1).



Figura 1 a

Figura 1 b

Figura 1 a - Aspectos do crescimento de *Chromobacterium violaceum* (GASTON, 2004) e figura 1 b – Micrografia eletrônica de *Chromobacterium violaceum*
www.unb.br/acsweb/imagens/bactéria1.jpg

Em caldo nutriente forma um anel violeta com uma delicada película na superfície (KONEMAN et al., 1994, 2001; JAWETZ et al., 1998; TRABULSI et al., 1999).

2.3 Produção de pigmento por *Chromobacterium violaceum*

A violaceína é o principal pigmento produzido por esta bactéria, *C. violaceum*. As linhagens podem ser pigmentadas e não-pigmentadas, ainda que as não pigmentadas sejam raras. Contudo, os primeiros casos de infecção por *C. violaceum* reportados na Korea registraram o contato de indivíduos com linhagens não pigmentadas (TRABULSI et al., 1999; LEE et al., 1999).

O pigmento, violaceína, é insolúvel em água (YU et al., 1999), e é constituído por três unidades estruturais: 5-hidroxiindol, 2-pirrolidona e 2-oxoindol (BROMBERG & DURAN, 2001) (Figura 2).

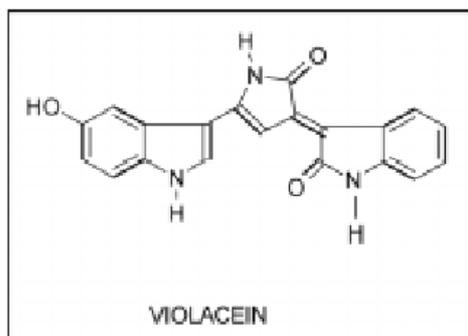


Figura 2. Estrutura química da violaceína (DURÁN et al., 2001)

Suspeitas sobre a ação antibiótica da violaceína foram levantadas a partir da observação da microfauna do Rio Negro, na Amazônia, onde a *C. violaceum* está presente em grande quantidade. Boa parte dos pequenos animais em suas águas, são dizimados em virtude do poder antibiótico da violaceína. Diante da baixa disponibilidade de alimentos, os cardumes desaparecem e tornam inviáveis as atividades pesqueiras da população ribeirinha. Não é por outra razão que o rio ficou conhecido internacionalmente como "*hungry river*" (rio da fome) (<http://inventabrasilnet.t5.com.br/chagas.htm>).

A biomassa do Rio Negro chega a ser 200 vezes menor que a do Rio Amazonas. A *C. violaceum* não é encontrada exclusivamente na região do Rio Negro, como é costume imaginar. Ela se difunde amplamente por todo o mundo tropical e não apenas em ambientes aquáticos (algumas amostras já foram isoladas em solo). Além de violaceína, a *C. violaceum* produz também um peptídeo substância formada pela união de dois ou mais aminoácidos, como as proteínas e certos hormônios, que revelou expressiva atividade antitumoral em testes feitos com camundongos (SHIRATA et al., 2000).

Segundo Caldas (1990), o pigmento tem sido introduzido como composto terapêutico para fins dermatológicos. A violaceína também apresenta atividade antimicrobiana contra importantes patógenos tropicais, como *Mycobacterium tuberculosis* (SOUZA & DURÁN, 1999), *Trypanosoma cruzi* (KONEMAN, 1994; DURÁN, 1994; RETTORI, 2000; DESSAUX et al., 2004) e *Leishmania* sp. (LEON et al., 2001), possuindo ainda outras atividades como bactericida (LICHSTEIN et al., 1945; DURÁN, 1983, DURÁN, 1990) antiviral (DE AZEVEDO et al., 2000 e

DURÁN et al., 2001) e anticancerígena (UEDA et al., 1994; MELO & DURÁN, 2000; DIAS JR. et al., 2002).

A violaceína (contendo 10% de desoxiviolaceína) apresentou atividade antiviral, protegendo células Hela de infecções do vírus Herpes simples e Pólio (RETTORI, 2000). Mais recentemente, modificações da violaceína (por inclusão com beta-ciclodextrinas) aumentaram a solubilidade desta, que resultaram em atividades antiulcerogênica e antioxidante desses derivados (DE AZEVEDO et al., 2000).

A produção desse pigmento é induzida especificamente pela N-hexanoil homoserina lactona (HHLs) (BLOSSER & GRAY, 2000), que tem sido descrita como regulador genético em várias bactérias Gram-negativas, em um sistema que se denomina *quorum sensing*. Estudos com mutantes que não produzem violaceína provaram que o “*quorum sensing*” é um mecanismo regulatório gênico comum na maioria das bactérias gram-negativas (DURÁN et al., 2001). Pesquisas recentes confirmam a importância de vários outros metabólitos. Alguns deles são de grande interesse biológico e médico, como os potenciadores de antibióticos beta-lactâmicos glicopeptídeos, o SQ28,504 e SQ28,546, antibióticos como o aerocianidina, aerocavina e o 3,6-diidroxiindoxazeno (também chamado γ -TO678H, ou 6-hidroxi-3-oxo-1,2-benzisoxazol), monobactama SB-26.180, um antitumoral depsipeptídeo, FR901228, o antibiótico antitumoral WB968, e o inibidor de carboxipeptidase, o arfamenina B. De acordo com Sandor et al., 2000, o FR901228 é um novo inibidor da deacetilase de histona com estrutura diferente de outros mais conhecidos, como tricostatina e trapoxina. Este composto mostra-se com grande potencial terapêutico quando comparado à tricostatina, um inibidor específico de acetilação de histonas, tendo sido descrito como um agente seletivo contra leucemia crônica das células linfocíticas em ensaios clínicos (DURÁN et al., 2001).

C. *violaceum* produz outros metabólitos secundários como algumas enzimas de grande interesse biotecnológico, como é o caso da enzima que catalisa a síntese de gama-ciano-alfa-aminobutírico e tiocianato, triptofano hidroxilase, beta-lactamase serina hidroximetil transferase, glicina liase, beta-ciano-alanina sintetase, L-triptofano-2', 3'-oxidase, indol oxigenase, quitinase e citosina deaminase (DURÁN et al., 2001).

2.4 *Chromobacterium violaceum*: patogenicidade

O potencial patogênico desta bactéria foi descrito pela primeira vez em 1905 por Wooley, quando a mesma foi identificada como responsável pela morte de búfalos por septicemia, nas Filipinas (WOOLEY, 1905). Posteriormente, verificou-se que *C. violaceum* poderia causar infecções em outros animais, como porcos, macacos, ovelhas e cães (TI et al., 1993; CHONG & LAM, 1997; DURÁN et al., 2001; CHATTOPADHYAY et al., 2002).

Ocasionalmente, *Chromobacterium violaceum* pode atuar como um patógeno oportunista em homens e animais e causar septicemia fatal de lesões na pele com abscessos no fígado e no pulmão (MARTINEZ et al., 2000) (Figura 3). Outros relatos também associados à *C. violaceum* são a granulomatose crônica, a adenite, como complicação de granulomatose crônica, a osteomielite, a celulite periorbital e a infecção ocular. Todos os casos citados até agora foram produzidos por bactérias pigmentadas, mas há também casos de infecções originados por formas não pigmentadas (MILLER et al., 1988), sugerindo que a patogenicidade associada a essa bactéria parece ser independente da presença de violaceína.



Figura 3. Lesões (perna/ mão) causadas por *Chromobacterium violaceum*
www.med.cmu.ac.th/.../sensitivity_plate.jpg

Segundo Trabulsi et al., (1999), casos descritos ocorreram em regiões tropicais e subtropicais, em geral relacionados ao contato recreacional em lagos e

rios. Após o fermento, onde ocorre a penetração do agente, há um longo período de latência, até que manifestações do tipo septicemia ou abscesso hepático se manifestem.

A maioria dos pacientes com a infecção causada por *C. violaceum*, tem a pele como porta de entrada, para organismos encontrados em água e solos contaminados, contudo, é possível ser infectado também por via oral (PONTE, 1992).

Infecção causada diretamente por *C. violaceum* não é comum; quando isso ocorre, usualmente há relato de uma clara história de exposição à água, principalmente, exposições a poças formadas por água de chuva (BLACK, 1938), picadas de insetos (KAUFMAN et al., 1986; PETRILLO et al., 1984), em mergulhos em águas contaminadas (MACHER et al., 1982).

Um grande alerta deve ser criado sobre esta infecção, principalmente entre os pediatras e cirurgiões-pediatras, uma vez que as crianças se infectam com mais freqüência que os adultos, necessitando de uma terapia agressiva para salvar estes pacientes (CHATTOPADHYAY, 2002).

2.5 Produção de Polihidroxicanoatos (PHA)

2.5.1 Polihidroxicanoatos : histórico

O primeiro PHA descoberto foi o poli (3-D-hidroxi butirato) (PHB), um homopolímero que foi detectado em *Bacillus megaterium* no ano de 1925. Posteriormente, foram encontradas inclusões de PHA em uma grande variedade de espécies bacterianas (DOI, 1990; STEINBÜCHEL, 1991; DAWES, 1993; SUDESH, 2000).

Mesmo após algumas décadas de sua descoberta o PHB representava apenas uma curiosidade acadêmica. Apenas em 1962 foram publicadas as primeiras patentes sobre produção de PHB, e nelas foi citado pela primeira vez que este polímero possui propriedades termoplásticas (BAPTIST, 1962).

Durante algumas décadas o ácido 3-hidroxi butírico (3HB) permaneceu como o único constituinte de PHAs conhecido. Em 1972, a partir de análises da composição do lodo ativado, identificou-se a presença de um material solúvel em

álcool a quente, que continha o 3HB, mas que possuía uma estrutura diferente do PHB. Esse material possuía ponto de fusão entre 100 e 105°C, enquanto o PHB fundia a 169-170°C (WALLEN, 1972). Posteriormente, verificou-se que esse material era composto, além das unidades 3HB, pelo ácido 3-hidroxi-valérico (3HV) e por pequenas quantidades dos ácidos 3-hidroxi-hexanóico (3HHx) e 3-hidroxi-heptanóico (3HHp) (WALLEN, 1974).

2.5.2 Polihidroxicanoatos: considerações gerais

Os biomateriais são produtos sintetizados e catabolisados por diferentes microrganismos e utilizados em diversas aplicações biotecnológicas (STEINBÜCHEL et al., 1998; ANGELOVA & HUNKELER, 1999; ZINN et al., 2001; WILIAMS et al., 2002).

Os plásticos biodegradáveis têm recebido muita atenção devido aos problemas ambientais causados pela acumulação de dejetos não degradáveis. Polihidroxicanoatos (PHAs) apresentam-se como grânulos acumulados intracelularmente por vários microrganismos, como polímeros de armazenamento, e podem chegar a representar mais de 80% do seu peso seco celular ((KIM et al., 1994), funcionando como fonte de carbono e energia, considerados fortes candidatos substituintes dos plásticos derivados do petróleo (ANDERSON & DAWES et al., 1990; DOI et al., 1990; POIRIER et al., 1995; LEE, 1996; STEINBÜCHEL & VALENTIN, 1999). O número de grânulos por célula depende de cada espécie e segundo Byrom (1994) é observado em torno de 8 a 13 grânulos por célula em *Alcaligenes eutrophus*. Os microrganismos que acumulam PHA são facilmente identificados por coloração com Sudan black ou Nilo blue (OSTLE & HOLT, 1982)

Os plásticos biodegradáveis são polímeros lineares de (R) - 3-hidroxiácidos nos quais um grupo carboxila de um monômero forma grupo tipo éster com o grupo hidroxila do monômero seguinte e que se degradam completamente por ataque microbiano em curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do meio ambiente. Dentre os biopolímeros em desenvolvimento estão os polihidroxicanoatos (PHAs). Além da vantagem em serem biodegradáveis, ainda apresentam outras importantes características como serem biocompatíveis,

serem produzidos a partir açúcares e ácidos graxos e por apresentar propriedades termoplásticas, físicas e mecânicas semelhantes às do polipropileno, polímero derivado do petróleo (MADISON & HUISMAN, 1999; SUDESH & DOI, 2000). Muitos produtos derivados dos plásticos de origem petroquímica podem ser produzidos e de baixo custo. De acordo com a literatura, o maior custo com a produção de PHA é o do substrato (YAMANE, 1992; YAMANE, 1993). Conseqüentemente, o preço do substrato tem uma grande influência no custo da produção de PHA. O resultado dos custos dos substratos estão resumidos na tabela 1) (LEE, 1996b; MADISON & HUISMAN, 1999). O substrato mais barato custa \$ 0,22 kg⁻¹ de PHA comparado ao custo do polipropileno de 0,185 kg⁻¹ (KOTHUIS & SCHELLEMAN, 1998).

Tabela 1. Efeito do custo do substrato sobre a produção e o rendimento do PHB

Substrato	Preço (US \$ kg⁻¹)	Produção (g PHB/g substrato)	Custo do substrato (US kg-1 PHB)
Glicose	0,493	0,38	1,35
Sacarose	0,295	0,40	0,72
Metanol	0,180	0,43	0,42
Ácido acético	0,595	0,38	1,56
Etanol	0,502	0,50	1,00
Melaço da cana	0,220	0,42	0,52
Soro de queijo	0,071	0,33	0,22
Amido de milho hidrolisado	0,220	0,185	0,58
Hemicelulose hidrolisada	0,069	0,20	0,34

Foram identificados mais de 100 monômeros diferentes como constituintes destes compostos em várias bactérias. Contudo, o polihidroxibutirato (PHB) é

constituído por monômeros de 3-hidroxi-butirato, representando o PHA mais bem caracterizado e acumulado com maior frequência por bactérias. Outros PHAs frequentemente acumulados por bactérias, são o polihidroxi-valerato (PHV), polihidroxi-metilvalerato (PMHV) e o polihidroxi-metilbutirato (PMHB). A sua presença e proporção relativa dependem do tipo de substrato usado pelo microrganismo (MADIGAN et al., 2000) (Tabela 2).

Tabela 2. Microrganismos, Substratos e Co-polímeros na produção de Polihidroxi-alcanoato-PHA.

Bactérias	Substrato	Co-Polímeros
<i>Ralstonia eutropha</i>	Ácido propiônico	(R)-3HB
	Ácido pentanóico	(R)-3HV
<i>Aeromonas caviae</i>	Óleo vegetal	(R)-3HB
	Ácidos graxos	(R)-3HHx
<i>Pseudomonas</i> sp.	Carboidrato	(R)-3HB
<i>Ralstonia eutropha</i>	4-Ácido hidroxibutírico	(R)-3HA
<i>Alcaligenes latus</i>	γ - Butirolactona	(R)-3HB
<i>Comamonas acidovorans</i>	1,4-Butanodiol	4HB
	1,6- Hexanodiol	

2.5.3 Polihidroxi-alcanoatos : classificação e constituição química

A estrutura geral dos polihidroxi-alcanoatos está apresentada na figura 4, segundo Lee (1996), podendo apresentar entre 100 e 30.000 monômeros, demonstrando a variação das posições do grupo hidroxila (n) e do radical R nas unidades monoméricas e o grau de polimerização, influem nas propriedades físicas do polímero (STEINBÜCHEL & SCHLEGEI, 1991).

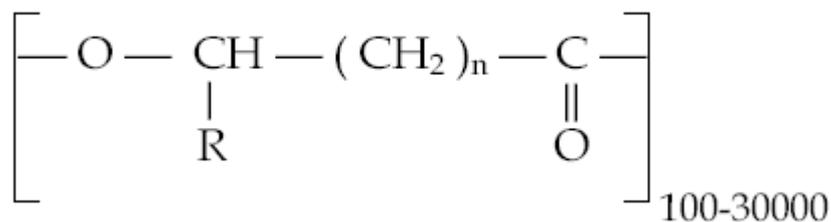


Figura 4 - Fórmula geral dos poliésteres de ácidos hidroxialcanóicos (PHAs)
(Lee, 1996)

Steinbüchel e Valentin (1995), propõem que as unidades constituintes de PHAs sejam divididas em três grandes grupos, com base no comprimento da cadeia de carbono lateral. Assim, de acordo com a cadeia lateral os hidroxialcanoatos podem ser: com cadeia de comprimento curto (HA_{SCL} – do inglês Short Chain Length), contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia lateral, e hidroxialcanoatos com cadeia de comprimento médio (HA_{MCL} – do inglês Medium Chain Length), contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia lateral. O hidroxialcanoatos de cadeia de comprimento longo (HA_{LCL} - do inglês Long Chain Length) refere-se a monômeros contendo 17 ou mais átomos de carbono na cadeia lateral, entretanto; em nenhum PHA produzido por bactérias foi identificado monômero com mais de 16 átomos de carbono na cadeia lateral.

Uma classificação preliminar permite separar as bactérias, com relação ao acúmulo de PHAs, em dois grandes grupos. No primeiro grupo são colocadas bactérias que incorporam em seus PHAs apenas HA_{SCL}, ou mais raramente HA_{MCL} contendo 6 carbonos na cadeia lateral; sendo a principal representante deste grupo; por exemplo, *Alcaligenes eutrophus*. Contudo, outras bactérias representantes de diversos grupos taxonômicos também são incluídas. No segundo grupo são incluídas bactérias que incorporam apenas HA_{MCL}, ou mais raramente HA_{SCL} contendo 5 carbonos na cadeia lateral; neste grupo todas as representantes são *Pseudomonas* fluorescentes. Essas diferenças parecem ser determinadas essencialmente pela enzima PHA sintase presente nessas bactérias, uma vez que a clonagem em *Pseudomonas oleovorans* dos genes responsáveis pela síntese de PHB em *A. eutrophus* determinou, após cultivo em

diferentes ácidos orgânicos, a síntese de dois PHAs distintos, um contendo apenas 3HB e outro contendo monômeros HA_{MCL} (LIEBERGESELL, 1993).

2.5.4 Síntese de Polihidroxialcanoatos

A síntese de PHAs depende da capacidade metabólica da célula bacteriana em sintetizar hidroxiacil-CoA a partir do substrato, bem como da presença de uma PHA sintase que permita a incorporação do monômero ao poliéster (LIMA et al., 2001).

A via metabólica mais estudada de produção de PHB é aquela encontrada em *A. eutrophus*, e é muito semelhante à via metabólica que leva à síntese de PHB em diversas bactérias (LIMA et al., 2001).

Na síntese de PHB a partir da acetil-CoA estão envolvidas três enzimas. β -cetotiolase catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando uma molécula de acetoacetil-CoA; esta, por sua vez, é reduzida a D(-)-3-hidroxiacetil-CoA numa reação estereoespecífica catalisada pela enzima 3-cetoacetil-CoA redutase NADPH dependente. O último passo compreende a polimerização da unidade D(-)-3-hidroxiacetil-CoA a um polímero em crescimento, numa reação catalisada pela enzima PHA sintase. A enzima-chave para regulação dessa via metabólica é a β -cetotiolase (TSUGE, 2002). Em condições balanceadas de crescimento, onde todos os nutrientes necessários à multiplicação celular estão disponíveis, espera-se que os níveis de Coenzima A (CoA) livre sejam altos, devido à grande demanda por grupos acetil pelo ciclo de Krebs para formação de esqueletos carbônicos e a geração de energia. Segundo alguns autores; como Oeding & Schleger, 1973 e Sênior & Dawes (1973), CoA livre tem efeito inibitório sobre a enzima β -cetotiolase, impedindo deste modo a síntese de PHB. Quando algum nutriente se torna limitante à multiplicação da bactéria, a demanda por acetil diminui, e com isso os níveis de Coa livre se tornam reduzidos, diminuindo a inibição sobre β -cetotiolase e desencadeando a síntese de PHB (Figura 5).

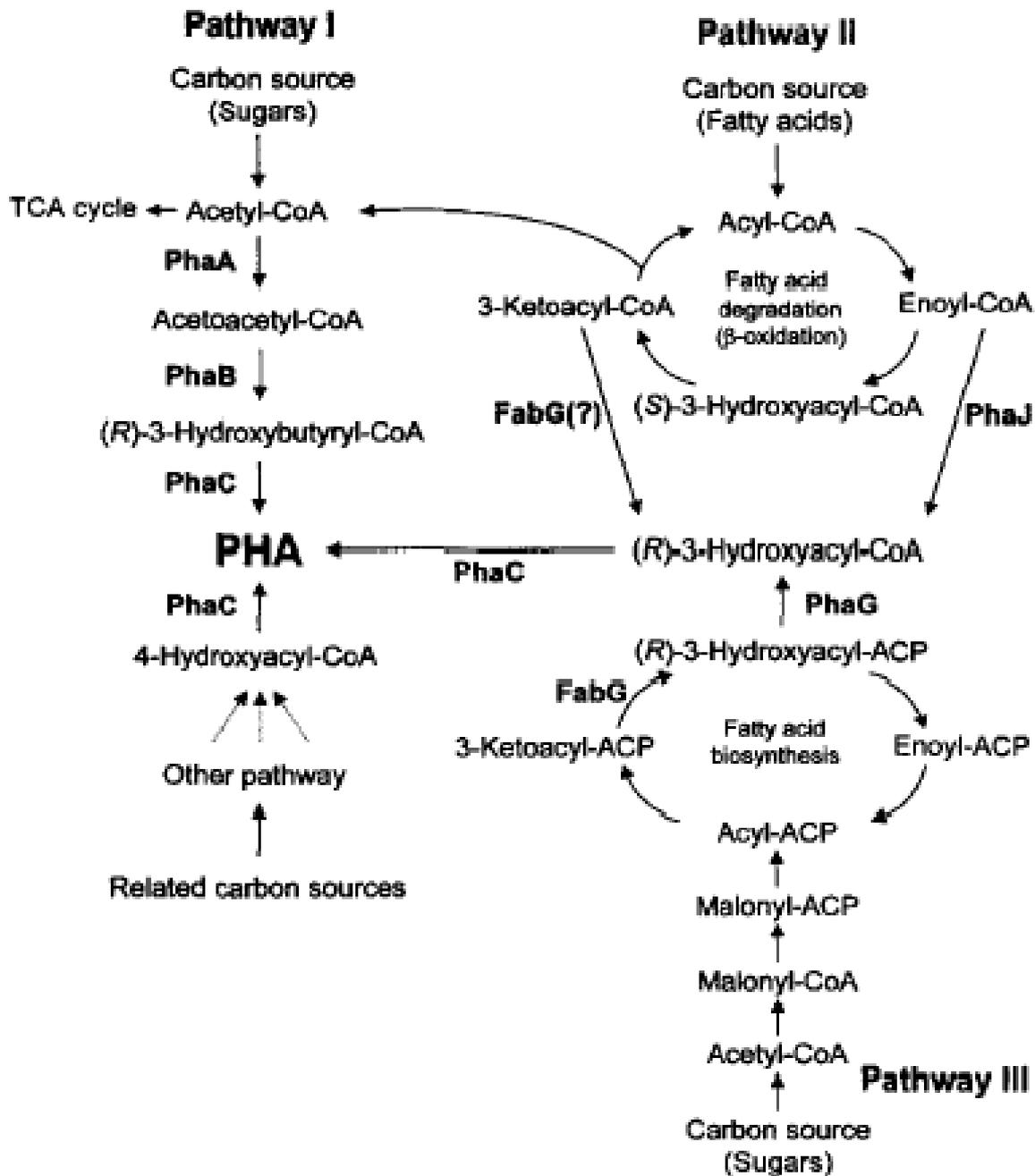


Figura 5 – Rotas metabólicas para a produção de PHA (TSUGE, 2002)

2.5.5 Perspectivas futuras para utilização de Polihidroxicanoatos

Um dos requisitos mais importantes, para que PHB ou P3HB-co-3HV possam substituir os plásticos convencionais em larga escala, é o preço com que estes produtos poderão ser comercializados (HÄNGGI, 1995). Desse modo, o desenvolvimento desse processo depende: 1. da obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos no produto desejado, 2. do desenvolvimento de processos fermentativos que permitam explorar ao máximo o potencial destas linhagens 3. e do desenvolvimento de processos de extração-purificação, de forma a tornar os custos de recuperação do produto os menores possíveis.

O isolamento de novas linhagens ainda deve exercer impacto nos custos de produção do copolímero P3HB-co-3HV (GOMEZ, 1994). A definição de substratos que possam ser utilizados como precursores para a síntese de unidades 3HV por essas linhagens isoladas também pode permitir reduções nos custos de produção (RODRIGUES, 1995). Além desses, outro fator de grande importância é a determinação da melhor forma de suprimento dos substratos para a bactéria, que pode permitir maior eficiência de conversão do substrato em produto, bem como, o processo de produção (PEREIRA, 1996).

Devido às características que possuem os polihidroxicanoatos, estes polímeros vêm sendo usados na manufatura de garrafas, filmes e fibras para embalagens biodegradáveis, bem como, sacos de proteção para plantas (STEINBÜCHEL & FÜCHTENBUSCH, 1998).

C. violaceum é um dos raros microrganismos já estudados que sintetizam polihidroxicanoatos (PHAs) – polímeros orgânicos com características físico-químicas muito semelhantes às do polipropileno e do polietileno, onde os mais utilizados são o polihidroxibutirato (PHB) e o polihidroxivalerato (PHV). Os PHAs demonstram ser uma excelente alternativa aos plásticos derivados da indústria petroquímica. No entanto, a participação no mercado internacional é mínima, devido ao seu alto custo de produção. A vantagem dos plásticos biodegradáveis está relacionada com o seu tempo de degradação. Enquanto o plástico comum necessita de 60 a 200 anos para se degradar (no caso do polímero PET – tereftalato de etileno), os plásticos biodegradáveis necessitam apenas de 6 a 12

meses. Essa redução de tempo representa uma grande redução econômica, contribuindo com a saúde e o meio ambiente.

3.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial PHA. *Microbiol. Rev.*, v.54, p. 450-472, 1990.

ANDERSON, A. J., HAYWOOD, G. W., WILLIAMS, D. R., & DAWES, E.A. The production of Polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources. In: *Novel Biodegradable. Microbial Polymers*, E. A. Dawes (ed.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p.119-129, 1990.

ANGELOVA, N. & HUNKELER D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol.*, v. 17, p.409-421, 1999.

BALOWS, A; HAUSLER Jr, WJ; HERRMANN, KL; ISEMBERG, HD; SHADOMY, HJ: *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, 1991

BAPTIST, J.N. **Process for preparing poly-B-hydroxybutyric acid.** US Patent Application US 3044924 e US 3036959, 1962.

BERGOZINI, C. Sopra un nuovo bacterio colorato. *Annuar Soc. Nat. Modena*, Series 2, v. 14, p. 149-158, 1881.

BLACK M.E. & SHAHAN J. *Bacillus violaceus* infection in a human being. *JAMA*, v.110 p.1270-1271, 1938.

BLOSSER, R.S. & GRAY, K.M. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acetyl homoserine lactone autoinducers. *J. Microbiol. Methods*, v.40, p. 47-55, 2000.

BOISBAUDRAN, L. Matière colorante se formant dans la colle de farine. *Comp. Rend. Acad. Sci.* v.94, p. 562-562, 1882

BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability, PNAS, v.100, n.20, p.11660-11665, 2003

BROMBERG, N. & DURÁN, N.J. Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties. Mol. Catal. B: Enzymatic. v.11, p. 463-467, 2001

BUCHANAN, E. Studies in the nomenclature and classification of bacteria. J. Bacteriol. v.3, p.52-57, 1918

BYROM, D. Polyhydroxyalkanoates, In: mobley DP (ed) Plastic from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors. Hanser Munich, p. 5-33, 1994

CALDAS, L.R. Photochemistry and photobiology in a virgin land, Photochem. Photobiol. v.26, p.1-2, 1977

CALDAS, L.R.; LEITÃO, A.A.C.; SANTOS, S.M. & TYRRELL, R.M. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein, Intern. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol. Acad. Brasil. Cienc. Rio de Janeiro, p.121-132, 1978

CALDAS, L.R. Um pigmento nas águas negras. Ciência Hoje v.11, p. 56-57, 1990

CHATTOPADHYAY, A., KUMAR, V., BHAT, N. and PLNG RAO *Chromobacterium violaceum* Infection: A Rare But Frequently Fatal Disease. J. Pediatric Surgery, v. 37, N. 1, p.108-110 (January), 2002

CHONG, C.Y. & LAM, M.S. Case report and review of *Chromobacterium* sepsis- a gram-negative sepsis mimicking melioidosis. Singapore Med. J. v.38, p.263-265, 1997

CRECZYNSKI-PASA, T.B. and ANTÔNIO, R.V. Energetic metabolism of *Chomobacterium violaceum*. Genetics and Molecular Research v. 3 n.1, p.162-166, 2004

DAWES, E. A., SENIOR, P. J. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. Advances in Microbial Physiology. v.10, p.135-266, 1973.

DE AZEVEDO, M.B.M., ALDERETE, J.RODRIGUEZ, J.A., DURÁN, N., DE SOUZA, A.O., FALJONI-ALARIO, A., Biological activities of violacein, a new antitumoral índole derivative, in inclusion complex with beta-cyclodextrin. J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem., v.37, p.93-101, 2000

DE MOSS, R.D. Violacein, **Antibiotics**, v.2, p.77-81, 1967

DESSAUX, Y., ELMERICH, C. & FAURE, D. Violacein: a molecule of biological interest originating from the soil-borne bacterium *Chromobacterium violaceum*. Rev. Med. Intern. v. 25, p.659-662, 2004

DIAS Jr., L.C., MOTTA NETO, J.D., RETTORI, D., DURÁN, N. Semiempirical INDOS/S study on the absorption spectrum of violacein. Journal of Molecular Structure, v.580, p.85-90, 2002

DOI, Y.; SEGAWA, A.; KAWAGUCHI, Y.; KUNIOKA, M. Cyclic nature of poly (3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiology Letters, v. 67, p.165-170, 1990

DURÁN, N. & FALJONI-ALARIO, A. Bacterial Chemistry- I. Studies of a potencial phototherapeutic substance from *Chromobacterium violaceum*, *An. Acad. Brasil. Cien.* v.52, p.297-302, 1980

DURAN, N., ERAZO, S. & CAMPOS, V. *An. Acad. Brás. Cien.* v.55, p. 231-234, 1983

DURÁN, N. A descoberta de um antibiótico. *Ciência Hoje*, v.11, p.58-60, 1990

DURÁN, N., ANTONIO, R.V., HAUN, M. & PILLI, R.A. Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. *World of Microbiol. Biotechnol.* v.10, p. 686-690, 1994

DURÁN, N. & MENCK, C.F.M. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspective. *Crit. Rev. Microbiol.* v.27, p. 201-222, 2001

DURÁN, N., RETTORI, D., MENCK, C.F.M. Quem é a *Chromobacterium violaceum*? *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n.20, p.38-43, mai./jun., 2001

GOMEZ, J.G.C. **Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos**. São Paulo, USP-IPT-I. Butantã. 1994. (Dissertação de Mestrado)

HÄNGGI, U.J. Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 16, p. 213-220, 1995

HOLT, J.G. & KRIEG, N.R. (Eds), *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, Williams e Wilkins, Baltimore, v. 1, p.580-582, 1984

JAWETZ, M. & ADELBERG et al. **Microbiologia Médica**. 20. edição Rio de Janeiro Editora Guanabara Koogan S.A., 1998

KAUFMAN SC, CERAGO D, SCHUGURENSKY A.: First case report from Argentina of fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum*. *J Clin Microbiol* v. 23 p. 956-958, 1986

KIM, B.S., LEE, S.C., LEE, S.Y., CHANG, H.N., CHANG, Y.K. & WOO, S.. Production of poly (3-hydroxybutiric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*, v.4, p.892-898, 1994

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. **Diagnóstico Microbiológico** – Texto e Atlas Colorido – 5. edição MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. **Introduction to Diagnostic Microbiology**. J.B. Lippincott Company, p.122-123, 1994

KOTHUIS, B. & SCHELLEMAN, F. Environmental economic comparison of biotechnology with traditional alternatives. In: Meesters KHP, editor. Production of poly-(3-hydroxyalkanoates) from waste streams. Delft: Tudelft Press; p.4, 1998

LEE, S.Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol.*, v.14, p. 431-438, 1996

LEE J, KIM JS, NAHM CH, et al: Two cases of *Chromobacterium* infection after injury in a subtropical region. *J Clin Microbiol* v.37, p. 2068-2070, 1999

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

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

LIEBERGESELL, M.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototropic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 40, p.292-300, 1993

LIMA, U.A. et al., **Biotecnologia industrial**. Willibaldo Schmidell – São Paulo: Edgard Blücher, 2001

MACHER AM, CASALE, TB, FAUCI AS. Chronic granulomatous disease of childhood and *Chromobacterium violaceum* infections in the southeastern United States. *Ann Intern Med* v. 97, p. 51-55, 1982

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**, Prentice-Hall International Editions, Upper Saddle River, 2000

MADISON LL, HUISMAN GW: Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev.* v. 63, p. 21-53, 1999

MARTINEZ, R.; VELLUDO, M.A.S.L.; SANTOS, V.R.; DINAMARCO, P.V. *Chromobacterium violaceum* infection in Brazil. A case Report. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.42, n.2, p. 111-113, 2000

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, p.539-543, 2000

MILLER, D.P., BLEVINS, W.T., STEELE, D.B., STOWER, M.D. A comparative study of virulent and avirulent strains of *Chromobacterium violaceum* *Can. J. Microbiol.* v.34, p. 249-255, 1988

OEDING, V.; SCHLEGEL, H.G. B-ketothiolase from *Hydrogenomas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly-B-hydroxybutyrate metabolism. *Biochemistry Journal*, v.134, p.239-248, 1973

OSTLE, A.G. & HOLT, J.G. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-B-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 238-241, 1982

PEREIRA, R.P.M. **Produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 sob diferentes condições de oferta de substratos.** São Paulo, 149 p. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Biotecnologia USP-IPT-I. Butantã, 1996

PETRILLO VF, SEVERO V, SANTOS MM, EDELWEISS EL. Recurrent infection with *Chromobacterium violaceum*: first case report from South América. *J. Infect* v. 9, p. 167-169, 1984

POIRIER, Y., NAWRATH, C. & SOMERVILLE, C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Bio / Technology* v.13, p. 142-150, 1995

PONTE, R. and JENKINS, S.G. Fatal *Chromobacterium violaceum* infections associated with exposure to stagnant water. *Pediatr. Infect. Dis. J.* v.11, p. 583-586, 1992

RAMOS COMERZANA, A. MONTEOLIVA – SANCHEZ, M. Potencial biofarmacéutico de los residuos de la industria oleícola. *Biopharmaceutical Potential of olive industrial wastes.* *Arts Pharmaceutica*, v. 41, p. 129-136, 2000

RETTORI, D. **Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum*.** (Duran, N. Orientador), Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, 2000

RODRIGUES, M.F.A. **Isolamento e caracterização de bactérias quanto à produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) e clonagem dos genes de biossíntese de PHA de *Burkholderia* sp.** São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. (Dissertação de Mestrado), 1995

SCHATTENBERG, H.J., HARRIS, W.H. A definitive and unique occurrence of rapidly fatal infection caused by *Bacillus violaceus manilae*. *JAMA* v. 117, p. 2069-2070, 1941

SENIOR, P.J. & DAWES, E.A. The regulation on poly-B-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemistry Journal*, v. 134, p.225-238, 1973

SHIRATA, A., TSUKAMOTO, T., YASUI, H., HATA, T., HAYASAKA, S., KOJIMA, A., KATO, H. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. *Japan Agric. Res. Quart.*, v. 34, p.131-140, 2000

SNEATH, PHA, WHELAN JPE, SINGH, RB, EDWARDS D. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*. *Lancet*, ii: p. 276-277, 1953

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

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol.* v.16, p.419-427, 1998

STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, v. 128, p.219-228, 1995

SUDESH K, ABE H, DOI Y: Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates:biological polyesters. *Prog Polym Sci*, v.25 p.1503-1555, 2000

TI, T.Y.; TAN, W.C., CHONG, A.P. & LEE, E.H. Nonfatal and fatal infections caused by *chromobacterium violaceum*. *Clin. Infect. Dis.* v.17, p.505-507, 1993

TOBIE, W. C. The pigment of *Bacillus violaceus*. III The apparent relation of violacein to indigo. *Soc. Am. Bacteriol. 39th General meeting*, p.11-12, 1934

TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3. edição São Paulo:Editora Atheneu, 1999

TSUGE, T. Metabolic Improvements and Use of Inexpensive Carbon Sources in Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n.6, p. 579-584, 2002

UEDA, H., NAKAJIMA, H., HORI, Y., GOTO, T. & OKUHARA, M. Action of FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* no. 968, on Ha-ras transformed NIH3T3 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* v.58, p.1579-1583, 1994

VASCONCELOS, A.T.R., ALMEIDA, D.F., ALMEIDA, F.C., ALMEIDA, L.G.P., ALMEIDA, R., ALVES-GOMES, J.A., ANDRADE, E.M., ANTÔNIO, R.V., ARARIPE, J., ARAÚJO, M.F.F., ASTOLFI-FILHO, S., AZEVEDO, V., BAPTISTA, A.J., BATAUS, L.A.M., BATISTA, J.S., BELÓ, A., VAN DEN BERG, C., BLAMEY, J., BOGO, M., BONATTO, S., BORDIGNON, J., BRITO, C.A., BROCCHI, M., BURITY, H.A., CAMARGO, A.A., CARDOSO, D.D.P., CARNEIRO, N.P., CARRARO, D.M., CARVALHO, C.M.B., CASCARDO, J.C.M., CAVADA, B.S., CHUEIRE, L.M.O., CRECZYNSKI-PASA, T.B., DURAN, 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.R., FREITAS, N.S.A., FURLAN, L.R., GAZZINELLI, R.T., GOMES, E.A., GONÇALVES, P.R., GRANGEIRO, T.B., GRATTAPAGLIA, D., GRISARD, E.C., GUIMARÃES, C.T., HANNA, E.S., HUNGRIA, M., JARDIM, S.N., LAURINO, J., LEOI, L.C.T., LIMA, L.F.A., LOUREIRO, M.F., LYRA, M.C.C.P., MACEDO, M., MADEIRA, H.M.F., MANFIO, G.P., MARANHÃO, A.Q., MARTINS, W.S., DI MAURO, S.M.Z., MEDEIROS, S.R.B., MEISSNER, R.V., MOREIRA, M.A.M., NASCIMENTO, F.F., NICOLAS, M.F., OLIVEIRA, J.G., OLIVEIRA, S.C., PAIXÃO, R.F.C., PARENTE, J.A., PEDROSA, F.O., PENA, S.D.J., 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., RIGO, L.U., RONDINELLI, E., SANTOS, E.B.P., SANTOS, F.R., SCHNEIDER, M.P.C., SEUANEZ, H.N., SILVA, A.M.R., SILVA, A.L.C., SILVA, D.W., SILVA, R., SIMÕES, I.D.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. AND SIMPSON, A.J.G. Complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.v.100, p.11660-11665, 2003.

WALLEN, L.L.; DAVIS, E.N. Biopolymers of activated sludge. *Environmental Science Technology*, v. 6, p.161-164, 1972

WALLEN, L.L.; ROHWEDDER, W.K. Poly-B-hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environmental Science Technology*, v. 8, p.576-579, 1974

WILIAMS SF, MARTIN D: **Application of PHAs in medicine and pharmacy**. In *Biopolymers*, vol 4, Polyesters III: Applications and Commercial Products. Edited by Doi Y e A Steinbüchel. Germany: Wiley-VCH, p.91-128, 2002

WOOLEY, PG: *Bacillus violaceus manilae* (a pathogenic organism). *Bull John Hopkins Hospital* v.16, p. 89-93, 1905

YAMANE, T. Cultivation engineering of microbial bioplastics production. *FEMS Microbio Rev.* v. 103, p.257-264, 1992

YAMANE, T. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. *Biotechnol. Bioeng.* v.41, p. 165-70, 1993

YU, V.L., MERIGAN JR, T.C., BARRIERE, S.L. **Antimicrobial therapy and vaccines**. Williams e Wilkins, 1999

ZIMMERMAN, B. Review of Bergonzini on *Chromobacterium*, *Bo. Centralbl.* v.4, p. 1528-1530, 1881

ZINN, M., B., WITHOLTM AND t. EGLI. **Occru, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoates**. *Adv. Drugm Del. Rev* 53, (1): 5-21, 2001

Antunes, A.A. *Chromobacterium violaceum*: caracterização cultural, bioquímica, molecular.....

www.med.cmu.ac.th/.../sensitivity_plate.jpg > acessado em novembro de 2004

<http://inventabrasilnet.t5.com.br/chagas.htm> > acessado em novembro de 2004

www.unb.br/acsweb/imagens/bactéria1.jpg > acessado em novembro de 2004

4.0 Objetivos

4.1 Geral

Caracterização bioquímica e molecular de 13 linhagens de *Chromobacterium violaceum* e avaliação da produção de polihidroxialcanoato.

4.2 Específicos

- Avaliar o crescimento de treze linhagens de *C. violaceum* em diferentes meios de cultura;
- Obter a caracterização bioquímica dos treze isolados de *C. violaceum*;
- Estabelecer o perfil de susceptibilidade das linhagens de *C. violaceum* frente aos antimicrobianos;
- Caracterizar as linhagens de *C. violaceum* através de técnicas moleculares;
- Estabelecer o grau de similaridade através dos testes bioquímicos e moleculares das linhagens de *C. violaceum*;
- Selecionar as linhagens de *C. violaceum* melhor produtoras de polihidroxialcanoato-PHA.

**Aspectos fenotípicos e moleculares de linhagens
de *Chromobacterium violaceum* e detecção da produção de
Polihidroxicanoato - PHA**

ANTUNES, A.A., SILVA, M.L.R.B., SILVA, M.V., SILVA, C.A.A., BURITY, H.A.,
CAMPOS-TAKAKI, G.M. *

Manuscrito a ser submetido para publicação no

Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology

**Aspectos fenotípicos e moleculares de linhagens
de *Chromobacterium violaceum* e detecção da produção de
Polihidroxialcanoato - PHA**

ANTUNES, A.A. ^{1,5}, SILVA, M.L.R.B. ^{2,5}, SILVA, M.V. ³, SILVA, C.A.A ^{4,5},
BURITY, H.A. ³, CAMPOS-TAKAKI, G.M. ^{4,5*}.

¹Mestrado em Ciências Biológicas, UFPE, Recife-PE; ²Doutorado em Ciências Biológicas, UFPE, Recife-PE; ³Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária/CNPq/Embrapa); ⁴Departamento de Química; ⁵Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco, 50.050-900 Recife – PE, Brasil.

Autor para correspondência: *G.M.Campos-Takaki, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Rua Nunes Machado, 42- Boa Vista, 50.050-590 Recife, Pernambuco, Brasil.
Phone/FAX: 55 81 21194017- 21194043. E.mail: gmctakaki@pesquisador.cnpq.br / takaki@unicap.br

Resumo

Estudos foram realizados com treze linhagens de *Chromobacterium violaceum* confirmando a identificação, as características fenotípicas, a variabilidade genética e a detecção e produção de polihidroxicanoato. Os isolados demonstraram maior crescimento no meio Luria Bertani, suplementado com glicose. Todos os isolados foram negativos para os testes de uréia, manitol, lactose e indol, e positivos para frutose, lisina, sacarose, glicose, catalase, gelatinase, motilidade e oxidase, identificando novas linhagens de *C. violaceum* (UCP 1035 e UCP 1489), respectivamente. Todas as linhagens demonstraram resistência aos antimicrobianos ampicilina e cefalotina. A variabilidade genética das linhagens de *C. violaceum* foi avaliada pelo índice de similaridade de Jaccard, utilizando-se o método UPGMA nas análises de agrupamento. Os índices de similaridade variaram de 0,17 a 0,35 para onze isolados, enquanto que, os isolados UCP 1462 e UCP 1463 apresentaram 100% de similaridade. O perfil de RAPD foi característico para cada linhagem, permitindo a formação de dois grupos indicando a variabilidade genética dos isolados analisados. A detecção da produção de polihidroxicanoato foi realizada utilizando os corantes Nilo blue e verde malaquita, destacando-se a linhagem de *C. violaceum* UCP 1467, como maior produtora do biopolímero.

Running Title: Aspectos fenotípicos e moleculares de linhagens de *C. violaceum* e detecção da produção de PHA.

Palavras chave: *Chromobacterium violaceum*; aspectos fenotípicos; RAPD; similaridade; produção de polihidroxicanoato.

Abstract

Studies had been carried through with thirteen strains of *Chromobacterium violaceum* evaluating the biochemistry characteristic, the genetic variability and the polyhydroxyalkanoate production. The isolates had demonstrated to greater growth in the Luria Bertani medium, supplemented with glucose. All the isolates had been negative for the urea tests, manitol, lactose and indol, and positive for fructose, lysina, sucrose, glucose, catalase, gelatinase, motility and oxidase. All the strains were demonstrated resistance to ampicillin and cephalotin. It was still observed, resistance for gentamicin and ampicacin (UCP 1035-Ceará) and for imipenen, chloranphenicol and ampicacin (UCP 1489- Pernambuco), evidencing distinct degrees of similarity between the thirteen strains. The genetic variability of *C. violaceum* strains was evaluated by the index of Jaccard similarity, using UPGMA method in the grouping analyses. The similarity indices had varied of 0,17 the 0,35 for eleven isolated ones, while that, isolated the UCP 1462 and UCP 1463 had presented 100% of similarity. The RAPD profile was characteristic for each strain, allowing to the formation of two analyzed groups indicating the genetic variability of the isolates. The detention of the polyhydroxyalkanoate production was carried through using the Nile blue and green malachite dyes, being distinguished strain of *C. violaceum* UCP 1467, as bigger biopolymer producer.

Running Title: Phenotipics and molecular characterization of *C. violaceum* strains and the bioplastic production.

Key words: *Chromobacterium violaceum*; phenotipics characterization; RAPD; , similarity; Polyhydroxyalkanoate production.

Introdução

Chromobacterium violaceum é classificada como uma Beta-proteobactéria, família Neisseriaceae [Boone e Castenholz, 2001], Gram-negativa, anaeróbia facultativa e com formato de bastonete. Locomove-se por meio de um flagelo polar e possui de 1 a 4 flagelos laterais, cuja função nessa espécie é a locomoção, mas em respostas quimiostáticas, em que a *C. violaceum* responde eficientemente a mudanças químicas, existindo um talentoso sinal de transmissão entre complexos receptores e motores flagelares [Pereira et al., 2004].

A bactéria vem sendo encontrada em amostras de água e solo em regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes, de patogenicidade discutida pela literatura e o pigmento por ela produzido, denominado violaceína, sendo alvo de estudos biotecnológicos e moleculares nas últimas três décadas [Caldas, 1990]. As características fenotípicas dos microrganismos, como padrões de sensibilidade a drogas têm sido amplamente estudadas, como marcadores importantes na caracterização de linhagens [Mulligan; Arbeit, 1991; Kreiswirth; Kornblum; Arbeit, 1993]. Contudo, hoje com o advento da biotecnologia, os métodos moleculares como *fingerprints* de DNA genômico, vem demonstrando maior utilidade, principalmente, no estabelecimento do grau de similaridade, como também na diferenciação de microrganismos [Kaltwasser et al., 1995; Kreiswirth; Lutwick; Chapnick, 1995; Fluckiger; Wolz; Cheung, 1998].

Nos últimos anos têm sido utilizadas técnicas moleculares para detectar a variabilidade genética entre grupos genômicos de bactérias. O RAPD é uma

técnica que permite identificar polimorfismos genéticos [Caetano-Anolles et al., 1991]. Este tipo especial de PCR, no qual um único "primer" é empregado, podendo hibridizar-se aleatoriamente em diferentes regiões do DNA, produz segmentos de DNA de diferentes tamanhos. Os perfis obtidos após a separação eletroforética dos produtos amplificados são característicos para uma dada linhagem, permitindo a avaliação da variabilidade genotípica de bactérias isoladas de diferentes ambientes [Welsh e McClelland, 1990].

Os polihidroxicanoatos (PHAs) atuam como reservas de carbono e energia, e provavelmente, possuem outras funções em um grande número de bactérias [Müller e Seebach, 1993; Lenz e Marchessault, 2005]. Apresentam-se como grânulos acumulados intracelularmente por vários microrganismos, como polímeros de armazenamento, funcionando como fonte de carbono e energia, considerados como fortes candidatos substituintes dos plásticos derivados do petróleo [Georghiou et al., 1989; Poirier et al., 1995; Steinbüchel e Valentin, 1999; Madigan et al., 2000; Durán et al., 2001].

Até o momento, mais de 140 diferentes ácidos hidroxialcanóicos foram encontrados em PHAs. Grande esforço tem sido atribuído ao metabolismo de bactérias e plantas para produzir uma grande variedade de PHAs a partir de fontes renováveis ou dióxido de carbono [Steinbüchel, 2001].

Outros PHAs podem ser frequentemente acumulados por bactérias, incluindo o polihidroxiбутирато (PHB), polihidroxiуаlerато (PHV), polihidroxiметилуаlerато (PMHV) e o polihidroxiметилбутирато (PMHB). A síntese e produção relativa dependem do tipo de substrato usado pelo microrganismo [Madigan et al., 2000].

Neste trabalho foi realizada a caracterização bioquímica e molecular, com a finalidade de estabelecer o grau de similaridade entre as linhagens, como também, selecionar a linhagem maior produtora de polihidroxialcanoato-PHA a partir das de treze linhagens de *C. violaceum*.

Resultados e Discussão

A análise dos resultados obtidos mostrou que as treze linhagens de *C. violaceum* cresceram nos meios comumente utilizados Luria Bertani (LB) sem glicose e LB suplementado com glicose, Müeller Hinton, M9, MacConkey (MC), BHI (Brain Heart Infusion) como também a introdução de novos meios como: Cled agar, King A e BTB Lactose. Observou-se ainda, que todas as linhagens de *C. violaceum* cresceram nos meios de cultura utilizados, exceto o isolado (UCP 1464) em meio King A, e quatro isolados (UCP 1462, UCP 1463, UCP 1465 e UCP 1466) em meio M9 (Tabela 2). Entre os meios testados, o meio LB suplementado com glicose destacou-se como meio de maior crescimento por todas as linhagens de *C. violaceum*. O meio de cultura King A, as linhagens UCP 1461, UCP 1467 e UCP 1489 apresentaram colônias brancas e violetas. No meio M9, as linhagens UCP 1464, UCP 1467, UCP 1469 e UCP 1471 também apresentaram colônias brancas e no meio BTB lactose, as linhagens UCP 1467 e UCP 1489 apresentam também colônias brancas e violetas (Tabela 2). Segundo Trabulsi et al., (1999), as linhagens podem ser pigmentadas e não-pigmentadas, ainda que as não-pigmentadas sejam raras. Creczynski-Pasa e Antônio (2004), relatam que os resultados do bom crescimento de *C. violaceum* nos distintos meios de cultura são apoiados pela

literatura e consideram o microrganismo como uma bactéria não exigente. Os autores confirmam ainda que, em condições de aerobiose, *C. violaceum* é capaz de crescer em meios contendo carboidratos simples, como glicose, frutose, galactose e ribose. Assim, os resultados obtidos confirmam a facilidade de cultivar *C. violaceum* no meio Luria Bertani suplementado com glicose [Creczynski-Pasa e Antônio, 2004].

Os testes bioquímicos realizados com os treze isolados de *C. violaceum* são apresentados na tabela 3, cujos resultados foram estimados através do grau de similaridade, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. A análise das características bioquímicas demonstrou a existência de dois grupos, através do teste de lisina. O primeiro grupo compreendeu a lisina positiva, englobando três linhagens (UCP1462, UCP1463 e UCP 1466), as quais foram separadas pelos testes de catalase e manose. O grupo dois com maior número de linhagens, caracterizado por ser lisina negativa, foi subdividido em outros subgrupos a partir dos testes de fermentativos com glicose e sacarose (Tabela 3 e Figura 1). As características bioquímicas observadas nas treze linhagens de *C. violaceum* são confirmadas pelas investigações realizadas [Bailey e Baron, 1994; Retori, 2000; Durán et al., 2001; Koneman et al., 2001].

O antibiograma realizado com treze isolados demonstrou que todos apresentam resistência à ampicilina e cefalotina e sensibilidade a ciprofloxacina, nitrofurantóina e tetraciclina (Tabela 4). Ressalta-se que os maiores halos de sensibilidade foram observados para ciprofloxacina, com diâmetros superiores a 30 mm, para todas as linhagens testadas. A literatura descreve que *C. violaceum* apresenta características de resistência à penicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, ampicilina, cefalotina,

cefamandol e vancomicina [Sorenson et al, 1985; Kaufman et al, 1986; Suarez et al, 1986; Georghiou et al, 1989; Ponte e Jenkins, 1992; Hassan et al., 1993]. Mais uma vez, os resultados obtidos são confirmados pela literatura, onde se observa a resistência de *C. violaceum* para cefalotina e ampicilina (Tabela 4).

Contudo, Yu (1999), afirmou que *C. violaceum* demonstra ser susceptível ao cloranfenicol, tetraciclina e aos aminoglicosídeos, corroborando com os resultados obtidos para 12 das linhagens estudadas, exceto para a linhagem UCP 1489, isolada em Pernambuco, que mostrou-se resistente (Tabela 4).

Ressalta-se ainda, o comportamento da linhagem UCP 1464, que apresentou os maiores halos de sensibilidade frente a todos os antimicrobianos testados, a UCP 1467 apresentou resistência a amicacina e aztreonam, a UCP 1468 e UCP 1470 ao aztreonam, a UCP 1035 a gentamicina e amicacina e a UCP 1489 ao imipenem, cloranfenicol e amicacina. Os resultados obtidos sugerem que o local de origem dos isolados e as condições ambientais apresentam uma relação direta com a susceptibilidade aos antimicrobianos. Essas informações são apoiadas, uma vez que a UCP 1464, UCP 1467, UCP 1468 e UCP 1470 são provenientes do Amazonas, a UCP 1035 do Ceará e a UCP 1489 de Pernambuco (Tabelas 1 e 4).

As características fenotípicas das linhagens de *C. violaceum* utilizando a sensibilidade aos antibióticos como padrão apresentam dois grupos de acordo com a resistência de acordo com o grau de similaridade. Observa-se a formação de vários subgrupos de acordo com a resistência aos antimicrobianos utilizados, destacando-se que o menor grau de similaridade está representado pelas linhagens UCP 1489 (Pernambuco) e UCP 1035 (Ceará) (Figura 2).

A utilização de técnicas moleculares para avaliar o grau de similaridade demonstra ser uma técnica atrativa, simples e apropriada para fornecer uma análise rápida e reproduzível, confirmando as informações da literatura [Athena et al., 1996; Clerc et al., 1998; Menon et al., 2003; Araújo et al., 2004 e Ozbey et al., 2005].

A caracterização molecular com o marcador RAPD indica que a partir dos oito iniciadores estudado foram amplificadas 102 regiões de bandas das quais 100% foram loci polimórficos, com uma média de 12,75 loci por primer (Tabela 5). O iniciador OPAA-06 originou o maior número de loci polimórficos, no total de 18 (Figura 3), enquanto o iniciador OPT-13 gerou apenas 9 loci polimórficos (Figura 4).

A análise de agrupamento com base nas distâncias genéticas (Figura 5) mostrou a formação de dois grupos. A variabilidade genética dentro de cada grupo é relativamente alta. A divergência genética entre estes dois grupos (G1 e G2), segundo o coeficiente de Jaccard é de 83% (17% de similaridade).

O grupo G1 apresenta um pool gênico, que agrupa 11 isolados, onde é possível distinguir dois subgrupos. O subgrupo (G1a), que compreende os isolados UCP1461 e UCP 1489, apresenta as maiores distâncias (79%). O subgrupo (G1b) compreende os isolados UCP 1468 e UCP 1471 com 25% de similaridade entre si, porém com 30% de fragmentos em comum com o isolado UCP 1469, encontrando-se distante do isolado UCP 1467 com 67% de dissimilaridade. Os isolados UCP 1462 e UCP 1463 com 100% de similaridade, poderiam talvez representar variantes de um mesmo isolado. Com relação aos isolados UCP 1464 e UCP 1465 foi evidenciado uma similaridade em torno de 33% embora a UCP 1466 tenha se distanciado com 71%. Considerando a

origem geográfica dos isolados (Tabela 1) e o agrupamento gerado no dendrograma (Figura 5) observa-se que o subgrupo G1b está constituído pela maioria dos isolados procedentes ao Estado do Amazonas (Manaus), sendo, pois, estes isolados similares entre si e dissimilares em relação aos demais isolados, procedentes do Estado de Pernambuco. No segundo grupo (G2), os isolados UCP 1470 e UCP 1035 apresentaram 23% de fragmento em comum.

Portanto, o polimorfismo gerado com os marcadores de DNA demonstraram que, os isolados de *C. violaceum* apresentaram variabilidade genética relativamente alta. Contudo, os isolados mais divergentes foram UCP 1470 e UCP 1035 e os mais similares foram UCP 1462 e UCP 1463, pela matriz de similaridade e, pelo dendrograma.

Os estudos realizados com a seleção de linhagens produtoras de polihidroxicanoato demonstraram que, das treze linhagens de *C. violaceum* cultivadas no meio LB, na presença de Nilo blue, na concentração de 0,5 µg/mL, todas apresentaram crescimento, porém apenas as linhagens UCP 1467, UCP 1470, respectivamente, isoladas do Amazonas, e UCP 1035, do Ceará, foram detectados fluorescência, confirmando a bioacumulação do polihidroxicanoato, no meio LB suplementado com glicose. Os crescimentos foram similares nas culturas controles, sem a presença de Nilo blue e na presença de dimetilsulfóxido (dados não apresentados).

Os experimentos realizados com altas concentrações do corante Nilo blue (0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 µg/mL), com as linhagens selecionadas, demonstraram habilidade de maior bioacumulação do polihidroxicanoato, pela linhagem de *C. violaceum* UCP 1467 (Figura 6).

Estudos seqüenciais foram realizados com diferentes concentrações do corante verde malaquita (0,5, 5 e 10 µg/mL), cujos resultados confirmaram a habilidade de maior acumulação de inclusões lipofílicas pela linhagem UCP 1467 (Figura 7).

Os resultados obtidos com os corantes Nilo blue e verde malaquita na detecção de polihidroxicanoato confirmam a facilidade do método de detecção, previamente descrito por Spiekermann et al., (1999).

Os resultados obtidos confirmaram a eficiência de *C. violaceum* UCP 1467, na conversão dos substratos, para a produção de polihidroxicanoato, sugerindo o desenvolvimento de processos fermentativos, que permitam explorar ao máximo o potencial desta linhagem, como também, o desenvolvimento de processos de extração-purificação, de forma a tornar os custos de recuperação do produto os menores possíveis [Salehizadeh e Loosdrecht, 2004].

Procedimentos Experimentais

Microrganismos: Foram utilizados treze isolados de *Chromobacterium violaceum*, nos quais onze foram cedidos pela Profa. Nara Suzy de Freitas (UFRPE); um pelo Centro Federal de Educação Tecnológica – CEFET (Ceará) e um pelo Prof. Carlos Alberto da Silva (UNICAP) (Tabela 1). Os isolados estão depositados no Banco de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da UNICAP/PE, Brasil. Todas as linhagens estão sendo mantidas no meio LB sólido [Sambrook et al., 1989] a 5°C. Para realização dos estudos

com *C. violaceum* repiques mensais foram realizados para o mesmo meio, incubados a 30°C, e posteriormente, mantidos à temperatura de 5°C.

Caracterização morfológica e bioquímica: os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo diferentes meios de cultura: Brain Heart Infusion (BHI), Luria Bertani (LB), LB suplementado com glicose, Müeller Hinton, KingA, MacConkey (MC), M9, Cled agar, BTB Lactose e incubadas por 48 horas a 30°C. Para caracterização dos isolados foram realizados testes de atividade fermentativa (glicose, manose, frutose, sacarose, lactose e manitol), provas bioquímicas de uréia, indol, lisina, catalase, gelatinase e oxidase (teste em disco) CECON, e teste de motilidade [Blazevic et al., 1975; Bergey, 1984; Balows et al., 1991].

O antibiograma foi realizado segundo metodologia de Kirby-Bauer. Inicialmente os isolados foram crescidos em meio LB sólido por 48 horas a 30°C. As linhagens foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5mL do caldo nutriente (TSB) e incubadas em estufa a 30°C por 2 horas. Após este período foram retiradas alíquotas do caldo nutriente, semeadas nas placas contendo meio Müeller Hinton ágar, com o auxílio de swab estéril. Em seguida, discos de 6 milímetros de diâmetro dos antibióticos (CECON) amicacina, ampiciclina, aztreonam, cefalotina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, imipenen, nitrofurantoina, e tetraciclina, foram depositados na superfície do meio de modo eqüidistante. As placas foram incubadas à temperatura de 30°C por 18 horas e a leitura da medida dos halos formados em torno dos discos foi realizada com auxílio de um halômetro.

Caracterização molecular

Extração do DNA : Os treze isolados de *Chromobacterium violaceum* (Tabela 1), foram cultivados em meio Luria Bertani (LB) sólido durante 48h a 30°C. As colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5mL de meio LB líquido e incubadas durante 48hs, à temperatura de 30°C, mantidas sob agitação constante de 150 rpm e em seguida submetidas à extração de DNA. O DNA dos 13 isolados foi extraído conforme o método descrito por [Ferreira e Grattapaglia, 1998]. O material obtido foi quantificado em gel de agarose a 1,0%, em tampão TBE [Sambrook et al., 1989] e corado com sybr Gold a 80 volts, pelo tempo de 30 min, e visualizado e fotodocumentado com o sistema 1D “Image Analysis Software Kodak Digital Science”, sob luz UV.

Reações de amplificação: Para as análises de RAPD foram utilizados volumes finais de 25 μL , que continham os seguintes componentes: DNA (2,5 $\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$); desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (0,1 mM); MgCl_2 (2,0 mM); Tris-HCl (10 mM), pH 8,3; um oligonucleotídeo iniciador (0,4 mM) (Invitrogen) e uma unidade e meia de Taq polimerase [Williams et al., 1990]. Oito iniciadores (kit Operon) foram utilizados neste estudo (OPAA-06, OPAH-15, OPAZ-16, OPAZ-14, OPN-09, OPG-09, OPV-06, OPT-13) conforme a Tabela 2. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo PTC – 100TM (MJ Research, INC.,USA), utilizando-se um programa composto por 36 ciclos de uma etapa de uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e outra desnaturação (95°C/1 minuto), anelamento (37°C/1 minuto) e extensão (72°C/1 minuto), com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os

produtos das amplificações foram separados por eletroforese, a 100 volts por 1h, em gel de agarose 1,2%, em tampão de TBE [Sambrook et al., 1989], sendo corado com sybr Gold. As bandas de DNA foram visualizadas e fotografadas com o sistema 1D “Image Analysis Software Kodak Digital Science”, sob luz UV. O marcador utilizado foi 1 Kb plus DNA Ladder.

Análise Filogenética: As bandas de DNA obtidas no processo de amplificação foram analisadas de forma binária pela presença (1) ou ausência (0), construindo-se desta maneira uma matriz de dados. A estimativa da similaridade genética entre os genótipos foi feita pelo coeficiente de similaridade, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. A análise de agrupamento dos materiais foi efetuada pelo método da média aritmética, não ponderada UPGMA (Unweighted Pair Group With Arithmetic Mean), e o agrupamento seqüencial, aglomerativo, hierárquico e exclusivo (SAHN), segundo o programa NTSYS -pc (Numerical Taxonomy and Multivariate System) versão 2.0 [Rohlf, 1993].

Grau de similaridade: O grau de similaridade das linhagens foi realizado a partir das características bioquímicas (Tabela 3) e dos resultados do antibiograma (Tabela 4), através da média aritmética, não ponderada UPGMA (Unweighted Pair Group With Arithmetic Mean), e o agrupamento seqüencial, aglomerativo, hierárquico e exclusivo (SAHN), segundo o programa NTSYS -pc (Numerical Taxonomy and Multivariate System) versão 2.0 [Rohlf, 1993] (Figura 1,2,5 e Tabela 2).

Produção de polihidroxicanoato

Seleção das linhagens produtoras de PHA: a seleção das linhagens produtoras de polihidroxicanoato foi realizada utilizando-se uma solução 0,25 mg/mL de Nilo blue (Sigma, St. Louis, Mo. USA) em dimetilsulfóxido, adicionada em condições estéreis, ao meio LB (sólido), para uma concentração final de 0,5 µg de corante/mL. Em seguida, as placas de Petri foram inoculadas com as treze linhagens de *C. violaceum*, incubadas a 30°C, por 24 horas e observadas na luz ultra violeta a no comprimento de onda de 312 nm [Spiekermann, 1999].

Caracterização da produção de PHA

Testes posteriores foram realizados com a linhagem selecionada para observar o crescimento e produção de polihidroxicanoato com altas concentrações de Nilo blue (0,5, 0,75 , 1,0 e 1,5 µg/mL), em dimetilsulfóxido.

Posteriormente, testes foram realizados com o corante verde malaquita (0,5, 5,0 e 10 µg/mL), em etanol, no meio LB agar, onde as Placas de Petri após a inoculação foram incubadas por 24 horas, a 30°C, por 24 horas. A produção de polihidroxicanoato foi observada em luz ultra-violeta para detectar as inclusões lipofílicas. Foi realizado o cultivo das linhagens de *C. violaceum* na ausência de Nilo blue, na presença de dimetilsulfóxido, e utilizados como controle *Pseudomonas* e *Escherichia coli*.

Agradecimentos

Os autores são gratos aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, FACEPE e FINEP.

Referências

Araújo, WL; Angellis, DA e Azevedo, JL: Direct RAPD Evaluation of Bacteria without Conventional DNA Extraction. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2004; 47(3) :375-380.

Balows, A; Hausler Jr, WJ; Herrmann, KL; Iseberg, HD; Shadomy, HJ: Manual of Clinical Microbiology, 1991; 5th ed. American Society for Microbiology

Bailey, Scotts. Baron, EJO : Peterson, L.R. Diagnostic Microbiology. Ninth edition. Mosby – year Book, 1994, p.566-567.

Bergey, DH: Bergey's Manual of determinative bacteriology, 1984, Baltimore, MD, U.S.A

Boone, DR e Castenholz, RW, eds., In: Garrity, GM, ed. – in – chief. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, New York: Springer, 2001, 2. ed. v.1, p.721.

Blazevic, DN e Ederer, GM: Biochemical tests in diagnostic microbiology, John Wiley e Sons, 1975, New York

Caetano-Anolles, G, Bassan, BJ, e Gresshoff, PM: DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio/Technology 1991; 9:553-557.

Caldas, LR: Um pigmento nas águas negras. Ciência Hoje 1990; 11:55-57.

Clerc, A; Manceau, C e Nesme, X: Comparison of Randomly Amplified Polymorphic DNA with Amplified Fragment Length Polymorphism To Assess Genetic Diversity and Genetic Relatedness within Genospecies III of

Pseudomonas syringe. Applied and Environmental microbiology, Apr. 1998, p. 1180–1187

Creczynski-Pasa, TB e Antônio, RV : Energetic metabolism of *Chomobacterium violaceum*. Genetics and Molecular Research 2004; 3 (1):162-166.

Duran, N, Rettori, D, Menck, CFM : Quem é a *Chromobacterium violaceum*? Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 2001, 20:38-43.

Doi, Y; Segawa, A; Kawaguchi, Y; Kunioka, M: Cyclic nature of poly (3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiology Letters 1990; 67:165-170.

Ferreira, M e Grattapaglia, D: Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed., Brasília: Embrapa-Cenargen. 1998

Fluckiger, U; Wolz, C; Cheung, AL: Characterization of a sar homolog of *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun., 1998; 66: 2871-2878

Georghiou, PR, O`kane GM, Siu S, Kemp, RJ: Near-fatal septicaemia with *Chromobacterium violaceum*. Med J Aust, 1989; 150:720-721.

Hassan, H, Suntharalingam, S, Dhillon, KS: Fatal *Chromobacterium violaceum* septicaemia. Singapore Med J 1993; 34:456-458.

Kaltwasser, G et al., Molecular study of 6 episodes of nosocomial infections produced by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Rev. Med. Chile., 1995; 122: 487-495

Kaufman SC, Cerago D, Schugurensky: First case report from Argentina of fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum*. J Clin Microbiol 1986; 23: 956-958.

Koneman, EW; Allen, SD; Janda, WM, Schreckenberger, PC.; Winn Jr., W.C. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido – 5. edição MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001

Kreiswirth, B; Lutwick, SM; Chapnick, EK et al., Tracing the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Southern blot hybridization using gene-specific probes of *mec* and Tn554. *Microb. Health Res.*, 1995; 1: 307-313

Lenz, RW, Marchessault, RH: Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* 2005; 6:1-8.

Lin, AW; Usera, MA; Barret, TJ e Golsby, RA: Application of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis To Differentiate Strains of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 1996, p. 870–876

Madigan, MT, Martinko, JM, Parker, J: Brock Biology of Microorganisms, Prentice-Hall International Editions, Upper Saddle River, 2000

Menon, Wg Cdr PK ; Eswaran, SP; Pant, SS; Bharadwaj, R e A Nagendra, A: Random Amplification of Polymorphic DNA Based Typing of *Pseudomonas Aeruginosa*. *MJAFI*, 2003; 59(1): 25-28

Müller, HM, Seebach, D: Poly(hydroxyalkanoates) – a fifth class of physiologically important organic biopolymers. *Angew Chem (Internat Ed)*, v.32, p.477-502, 1993

Mulligan, ME; Arbeit, RD: Epidemiologic utility of typing systems for differentiating among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 1991; 12: 20-28

Ozbey, G; Ertaz, HB e Muz, A: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from chickens in Turkey. *Vet. Med. – Czech*, 50, 2005 (12): 526–530

Pereira, M; Parente, JA; Bataus, DDPC; Soares, RBA e Soares, CMA: Chemotaxis and flagellar gene of *Chromobacterium violaceum*, *Genetics and Molecular Research* 2004; 1:92-101.

Poirier, Y, Nawrath, C e Somerville, C: Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Bio / Technology* 1995; 13:142-150.

Ponte, R e Jenkins, SG: Fatal *Chromobacterium violaceum* infections associated with exposure to stagnant water. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1992; 11: 583-586.

Rettori, D. Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum*. (Duran, N. Orientador), Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, 2000

Rholf, FJ Ntsys-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0 j Exeter Software Setauket, New York, 31p. , 1993

Salehizadeh, H; Van Loosdrecht, MCM: Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 2004; 22: 261-279

Sambrook, R; Fritsch, EF; Maniatis, T: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2. ed. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

Sorenson RU, Jacobs MR, Shurin SB: *Chromobacterium violaceum* adenitis acquired in the northern United States as a complication of chronic granulomatous disease. *Pediatr Infect Dis* 1985; 4:701-702.

Spiekermann, P; Rehm, BHA; Kalscheuer, R; Baumeister, D e Steinbüchel, : A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipids storage compound. *Arc. Microbiol.* 1999; 171:73-80.

Steinbüchel, A, Valentin, HE: Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* 1999; 128:219-228.

Steinbüchel, A: Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromol Biosci* 2001; 1:1-24.

Suarez AE; Wenokur B; Johnson JM; Saravolatz LD: Nonfatal chromobacterial sepsis. *South Med J* 1986; 79:1146-1148.

Welsh, J; McClelland, M: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 1990; 18 (24):7213-7218.

Williams, JGK.; Kubelik, AR; Livak, KJ; Rafalski, JA; Tingey, SV: DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 1990; 18, (22):6531-6535.

Yu, VL; Merigan, JR TC; Barriere, SL: *Antimicrobial therapy and vaccines*. Williams e Wilkins, 1999

Tabela 1. Isolados de *Chromobacterium violaceum* depositados na coleção de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da UNICAP/PE

Número da Coleção	Procedência	Substrato
UCP-1461	Amazonas	Solo Inundado
UCP-1462	Amazonas	Solo Inundado
UCP-1463	Amazonas	Solo Inundado
UCP-1464	Amazonas	Solo Inundado
UCP-1465	Amazonas	Solo Inundado
UCP-1466	Amazonas	Solo Inundado
UCP-1467	Amazonas	Solo Inundado
UCP-1468	Amazonas	Solo Inundado
UCP-1469	Amazonas	Solo Inundado
UCP-1470	Amazonas	Solo Inundado
UCP-1471	Amazonas	Solo Inundado
UCP-1035	Ceará	Lagoa das Almécegas
UCP-1489	Pernambuco	Riacho em Paulista

Tabela 2. Crescimento das 13 linhagens de *Chromobacterium violaceum* em diferentes meios de cultura

Isolados no.	King	Cled	LB	LB glic.	M9 glic	BTB lactose	Mac Conkey	Mueller Hinton	BHI
1461	+*	++	++	++++	+	++	++	++	++
1462	+	++	++	++++	-	++	++	++	++
1463	+	++	++	++++	-	++	++	++	++
1464	-	++	++	++++	+*	++	++	++	++
1465	+	++	++	++++	-	++	++	++	++
1466	+	++	++	++++	-	++	++	++	++
1467	+*	++	++	++++	+*	++*	++	++	++
1468	+	++	++	++++	+	++	++	++	++
1469	+	++	++	++++	+*	++	++	++	++
1470	+	++	++	++++	+	++	++	++	++
1471	+	++	++	++++	+*	++	++	++	++
1035	+	++	++	++++	+	++	++	++	++
1489	+*	++	++	++++	+	++*	++	++	++

(-) Ausência de crescimento

(+) 10 UFC/mL

(++) 70-100UFC/mL

(++++) >200 UFC/mL

* Colônias de cor violeta e branca

Tabela 3. Resultado dos testes bioquímicos realizados em 13 linhagens de *Chromobacterium violaceum*

UCP	Gelatinase	Uréia	Glicose	Manitol	Manose	Motilidade	Catalase	Lactose	Sacarose	Indol	Oxidase	Lisina	Frutose
1461	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
1462	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1463	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1464	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
1465	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
1466	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
1467	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
1468	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
1469	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
1470	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
1471	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
1035	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
1489	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+

(-) negativo

(+) positivo

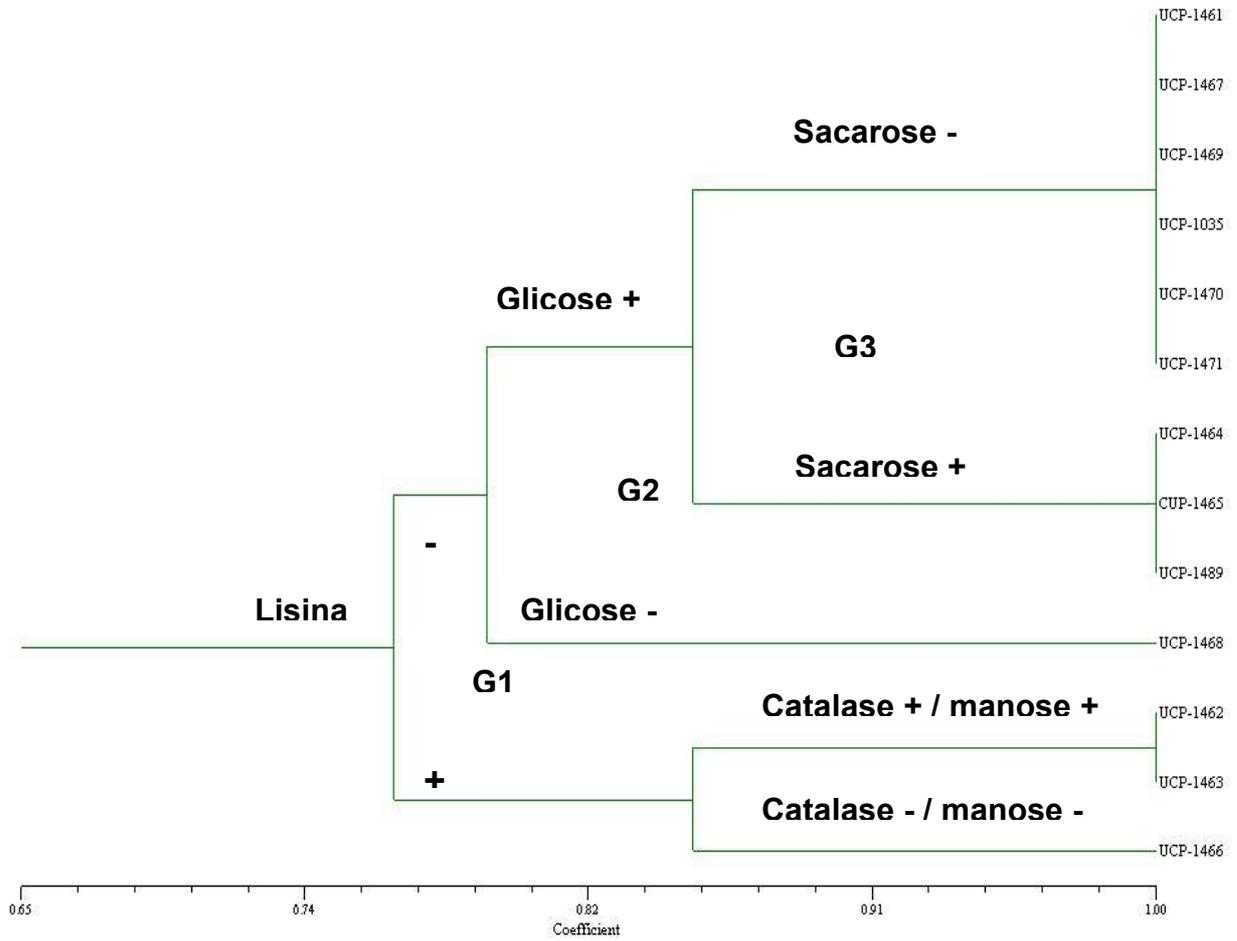


Figura 1. Dendrograma construído pelo coeficiente de Jaccard representando o grau de similaridade entre isolados de *Chromobacterium violaceum*, baseado nas respostas dos testes bioquímicos realizados.

Tabela 4. Resultado do antibiograma realizado para 13 linhagens de *Chromobacterium violaceum*

UCP	CF	IP	GN	CL	AP	TT	AM	NT	AT	CP
1461	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
1462	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
1463	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
1464	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
1465	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
1466	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
1467	R	S	S	S	R	S	R	S	R	S
1468	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
1469	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
1470	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
1471	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
1035	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S
1489	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S

Beta lactâmicos (CF – Cefalotina; AP – Ampicilina) ; Quinolona (CP – Ciprofloxacina); Aminoglicosídeos (GN – Gentamicina; AM – Amicacina); CL – Cloranfenicol; Sulfa (NT – Nitrofurantoina); TT – Tetraciclina; IP – Imipenem; Monobactâmico (AT – Aztreonam)

R= Resistente

S= Sensível

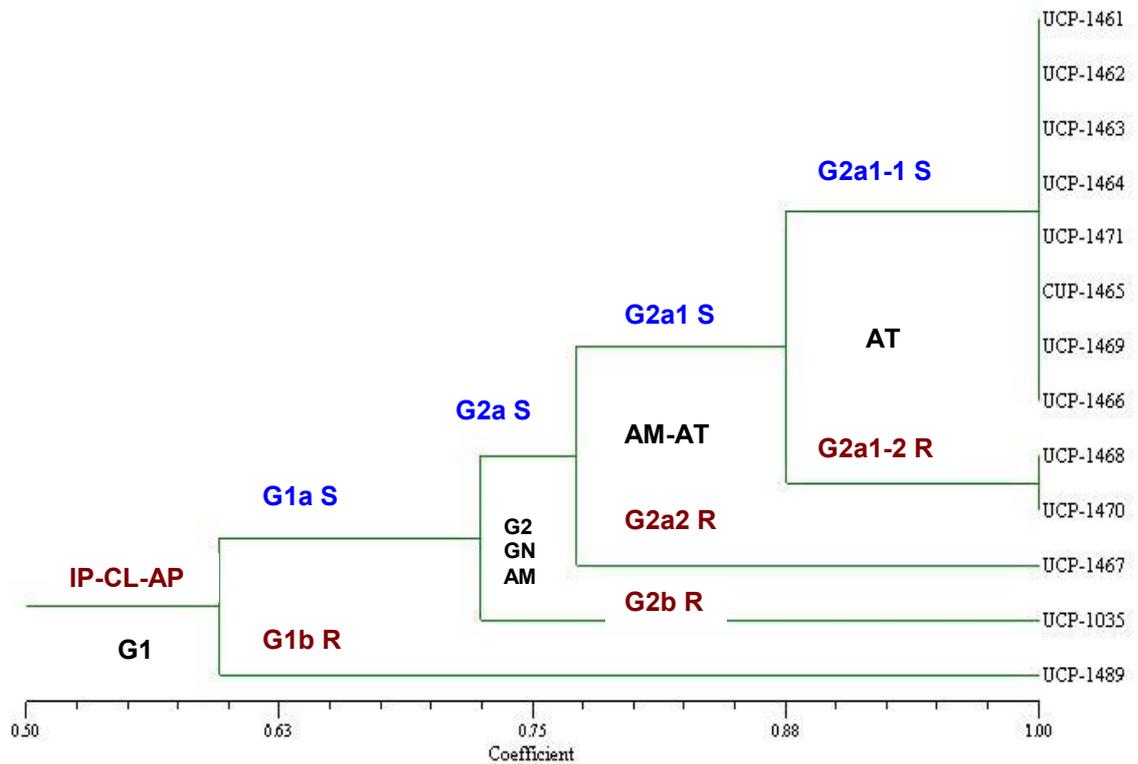


Figura 2. Dendrograma construído pelo coeficiente de Jaccard representando o grau de similaridade pela suscetibilidade das treze linhagens de *Chromobacterium violaceum* frente aos antimicrobianos. G1= resistente IP – CL – AP; G1a= sensível IP – CL – AP; G1b= resistente IP – CL – AP; G2a= sensível GN – AM; G2b= resistente GN – AM; G2a1= sensível AM – AT; G2a2= resistente AM – AT; G2a1-1= sensível AT; G2a1-2= resistente AT.

IP – Imipenem; CL – Cloranfenicol; AP – Ampicilina; GN – Gentamicina; AM – Amicacina; AT – Aztreonam;

Tabela 5. Iniciadores aleatórios selecionados para amplificação de DNA de *Chromobacterium violaceum* através da reação em cadeia da polimerase (RAPD/PCR).

Iniciadores	Seqüência das bases 5' → 3'	Número de bandas por primer	Número de pares de bases (pb) dos produtos amplificados
OPAA -06	GGTCCCTGAC	18	200 - 5000
OPAH-15	AATGGCGCAG	12	850 - 4000
OPAZ-16	AGGCGAACTG	12	850 - 4000
OPAZ-14	CACGGCTTCC	12	850 - 4000
OPN-09	TGCCGGCTTG	10	650 - 4000
OPG-09	CTGACGTCAC	12	850 - 4000
OPV-06	ACGCCCAGGT	17	200 - 5000
OPT-13	AGGACTGCCA	09	850 - 4000

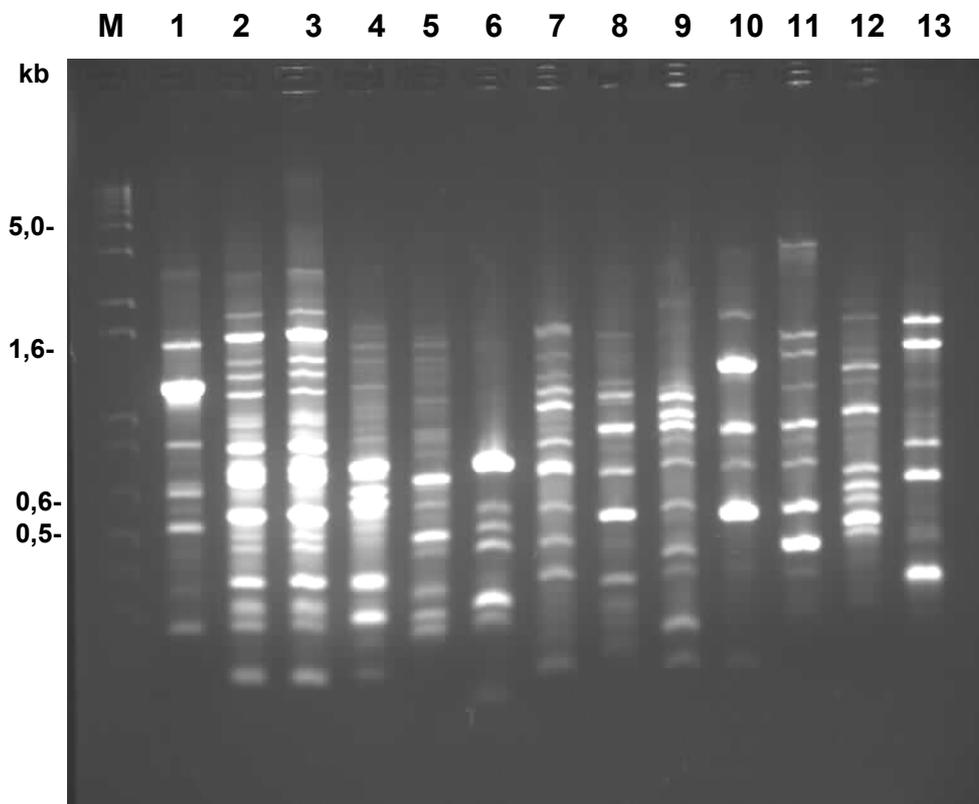


Figura 3: Polimorfismo de RAPD detectados em treze isolados de *Chromobacterium violaceum*. M- marcador de massa molecular (1Kb plus DNA Ladder) de acordo com a tabela 1, 1-13 produtos de amplificação das amostras com *primer* OPAA-06

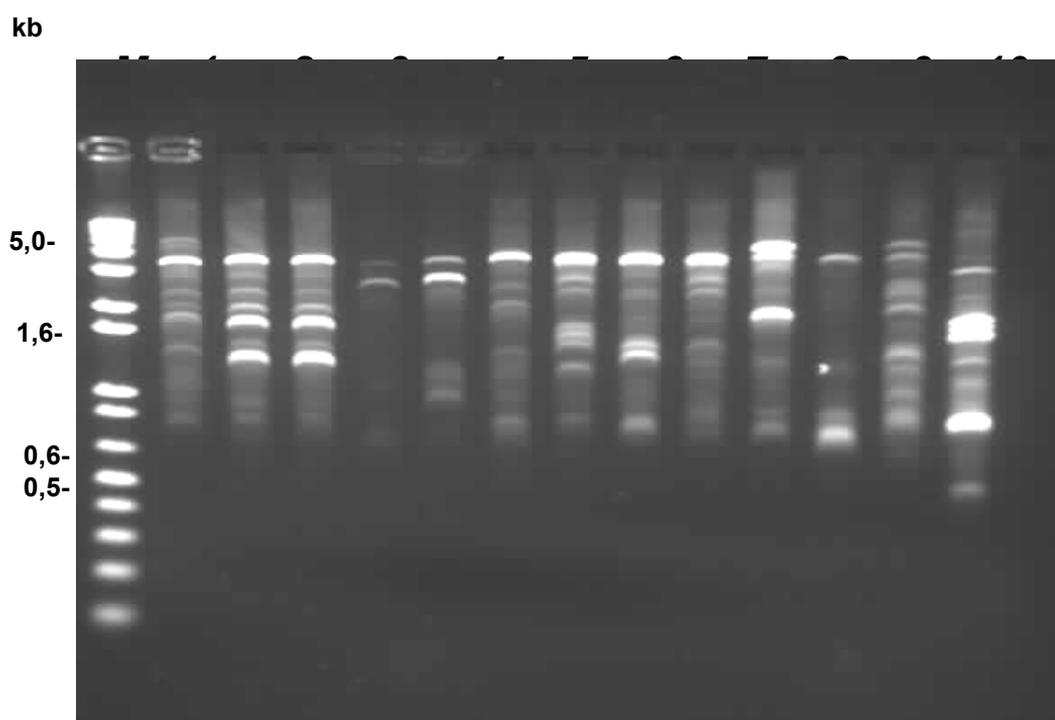


Figura 4: Polimorfismo de RAPD detectados em treze isolados de *Chromobacterium violaceum* M- marcador de massa molecular (1Kb plus DNA Ladder) de acordo com a tabela 1, 1-13 produtos de amplificação das amostras com *primer* OPT-13

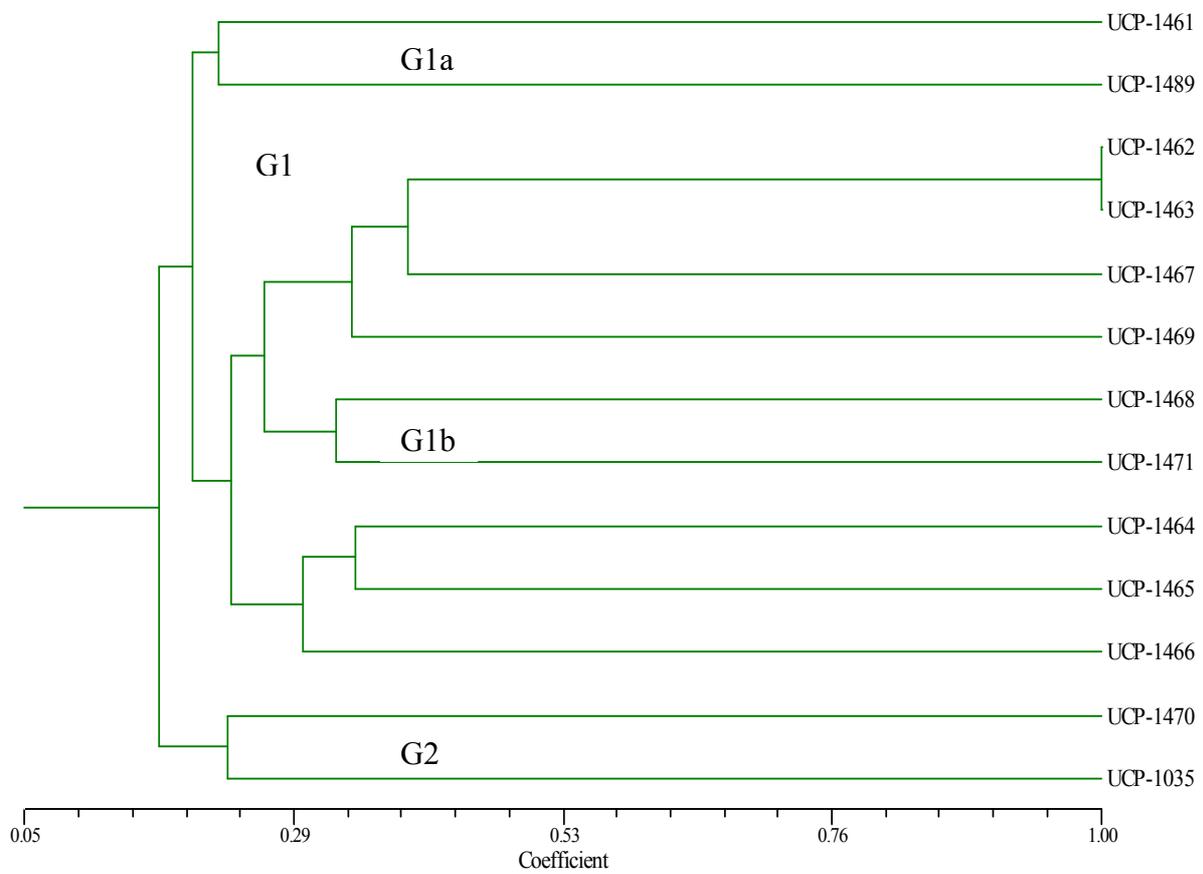


Figura 5. Dendrograma construído pelo coeficiente de Jaccard representando o grau de similaridade entre isolados de *Chromobacterium violaceum* baseado em DNA amplificado por RAPD, baseado no padrão de bandas amplificadas.

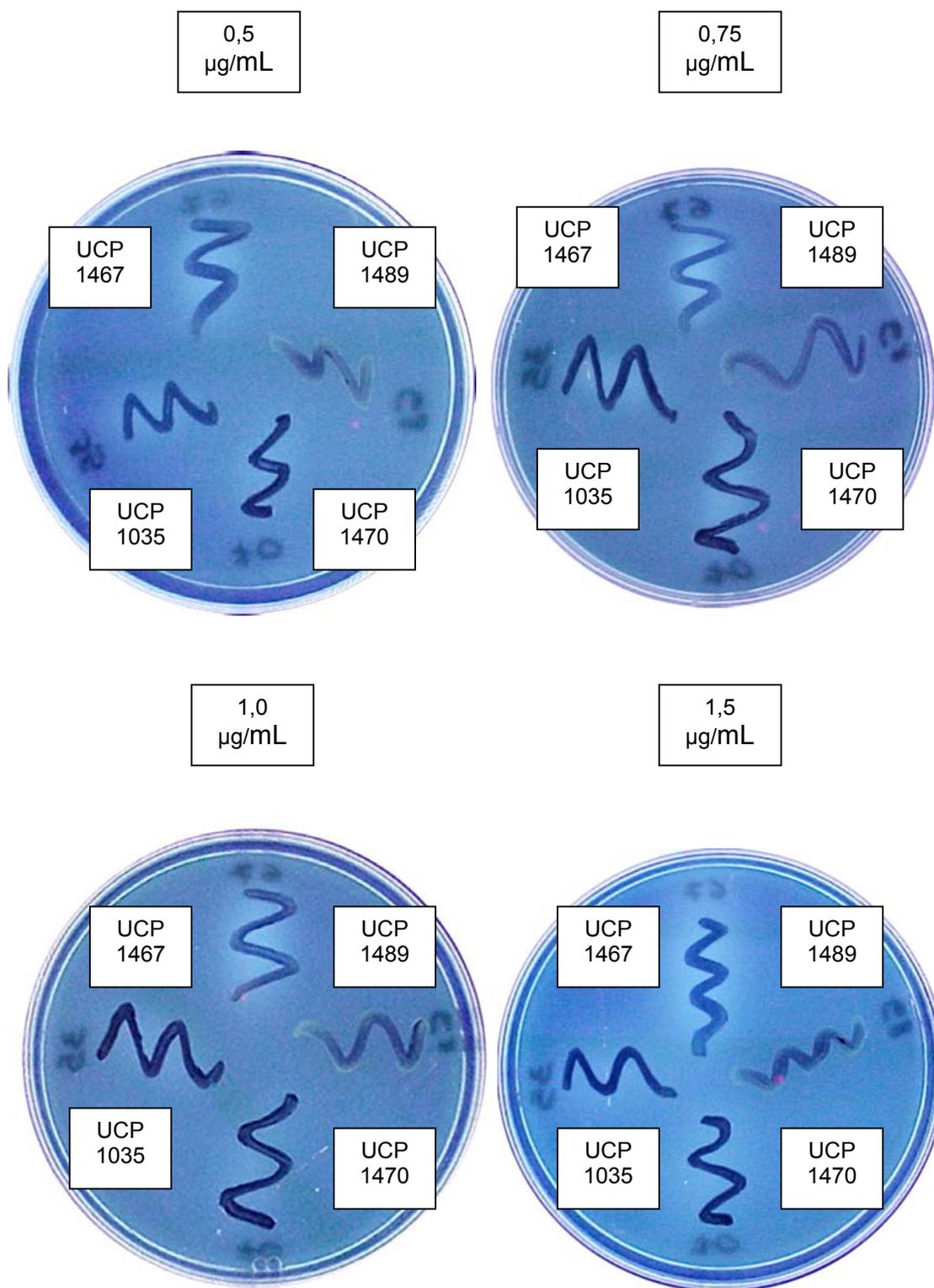


Figura 6. Produção de polihidroxicanoato em diferentes concentrações de Nilo blue (0,5, 0,75, 1,0 e 1,5 µg/mL) por linhagens de *Chromobacterium violaceum* UCP 1467, UCP1489, UCP1035 e UCP1470.

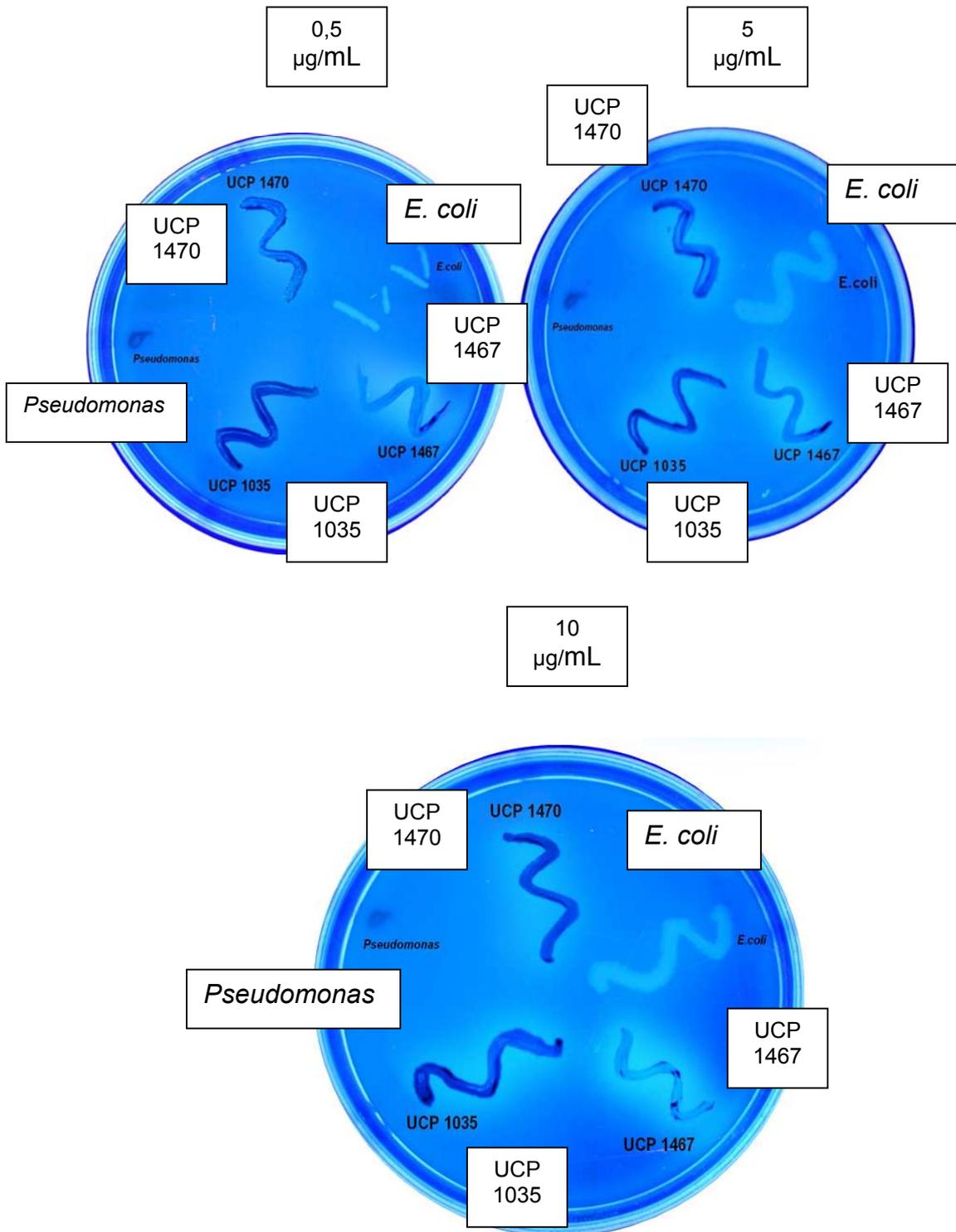


Figura 7. Produção de polihidroxicanoato em diferentes concentrações de verde malaquita (0,5, 5 e 10 µg/mL) por linhagens de *Chromobacterium violaceum* UCP 1467, UCP1489, UCP1035, UCP1470 e *Escherichia coli* e *Pseudomonas* como controle.

7.0 CONCLUSÕES

- Os isolados de *Chromobacterium violaceum* estudados crescem de forma exuberante no meio LB suplementado com glicose;
- As treze linhagens de *C. violaceum* confirmam as características bioquímicas do gênero e da espécie descritas pela literatura, contudo, apresentam grau de similaridade distribuídos em dois grupos;
- Todos os isolados são sensíveis aos antimicrobianos ciprofloxacina, nitrofurantoína, tetraciclina e resistentes a cefalotina e ampicilina;
- Apenas o isolado UCP 1467 é resistente a amicacina e aztreonam; e os isolados UCP 1468 e 1470 são resistentes ao aztreonam e o isolado UCP 1489 (PE) é resistente ao imipenem, cloranfenicol e amicacina;
- O grau de similaridade entre as linhagens de *C. violaceum* frente a susceptibilidade aos antimicrobianos apresenta dois grupos de acordo com a resistência;
- O perfil de RAPD é característico para cada linhagem, confirmando a formação de dois grupos, indicando a variabilidade genética dos isolados;
- Pela análise molecular, os isolados de *C. violaceum* (Amazonas e de Pernambuco) participam do mesmo grupo de similaridade e o isolado originário do estado do Ceará apresenta diversidade genética maior;
- Os estudos comprovam que *C. violaceum* possui habilidade para acumular polihidroxicanoato evidenciado por Nilo blue e verde malaquita.

8.0 ANEXOS

Composição do Meio Luria Bertani Ágar

Componentes	Concentração (g/L ⁻¹)
Triptona	10,0
Cloreto de sódio	5,0
Extrato de levedura	5,0
Ágar	15,0

Composição do Meio Luria Bertani Ágar (suplementado com glicose)

Componentes	Concentração (g/L ⁻¹)
Triptona	10,0
Cloreto de sódio	5,0
Extrato de levedura	5,0
Glicose	5,0
Ágar	15,0

Composição do Meio King A Ágar

Componentes	Concentração (g/L ⁻¹)
Peptona	20,0
Cloreto de magnésio	1,4
Extrato de levedura	10,0
Ágar	15,0

Composição do Meio Mac Conkey Ágar

Componentes	Concentração (g/L ⁻¹)
Peptona	19,0
Lactose	10,0
Sais biliares	1,0
Cloreto de sódio	5,0
Cristal violeta	0,001
Vermelho neutro	0,03
Ágar	15,0

Composição do Meio CLED Ágar

Componentes	Concentração (g/L ⁻¹)
Peptona	4,0
Extrato de carne	3,0
Triptona	4,0
Lactose	10,0
L-cistina	0,128
Azul de bromotimol	0,02
Ágar	15,0

Composição do Meio BTB Lactose Ágar

Componentes	Concentração (g/L ⁻¹)
Extrato de carne	5,0
Peptona	10,0
Lactose	10,0
Azul de bromotimol	0,008
Ágar	15,0

Composição do Meio BHI Ágar

Componentes	Concentração (g/L ⁻¹)
Peptona de gelatina	10,5
Infuso de cérebro e coração	6,0
Peptona de carne	11,0
Dextrose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato dibásico de sódio	2,5

Composição do Meio Müller Hinton Ágar

Componentes	Concentração (g/L ⁻¹)
Infusão de carne	2,0
Caseína hidrolizada	17,5
Amido	1,5
Ágar	15,0

Composição do Meio M9 Ágar

Componentes	Concentração (g/L ⁻¹)
NH ₄ Cl	1,0
Na ₂ HPO ₄	6,0
K ₂ HPO ₄	3,0
NaCl	0,5
Glicerol ou Asparagina	5,0
Sulfato de Magnésio 1M	1 mL
Cloreto de cálcio 0,01M	10 mL
Ágar	15,0

Matriz de Similaridade Genética dos Isolados de *Chromobacterium violaceum*

	UCP1461	UCP 1462	UCP 1463	UCP 1464	UCP 1465	UCP 1466	UCP 1467	UCP 1468	UCP 1469	UCP 1470	UCP 1471	UCP 1035	UCP 1489
UCP1461	1.00												
UCP 1462	0.24	1.00											
UCP 1463	0.24	1.00	1.00										
UCP 1464	0.14	0.29	0.29	1.00									
UCP 1465	0.15	0.23	0.23	0.34	1.00								
UCP 1466	0.16	0.28	0.28	0.25	0.34	1.00							
UCP 1467	0.27	0.38	0.38	0.19	0.23	0.22	1.00						
UCP 1468	0.13	0.35	0.35	0.29	0.13	0.24	0.24	1.00					
UCP 1469	0.21	0.33	0.33	0.28	0.19	0.22	0.35	0.30	1.00				
UCP 1470	0.13	0.23	0.23	0.24	0.22	0.23	0.11	0.23	0.21	1.00			
UCP 1471	0.18	0.23	0.23	0.19	0.28	0.24	0.21	0.32	0.19	0.22	1.00		
UCP 1035	0.12	0.17	0.17	0.12	0.11	0.24	0.14	0.16	0.17	0.22	0.18	1.00	
UCP 1489	0.22	0.27	0.27	0.19	0.12	0.21	0.21	0.16	0.18	0.10	0.19	0.13	1.00

Guidelines for Authorswww.karger.com/mmb_guidelines

- ▼ [Submission](#)
- ▼ [Conditions](#)
- ▼ [Arrangement](#)

- ▼ [Page Charges](#)
- ▼ [Galley Proofs](#)
- ▼ [Reprints](#)
- ▶ [Electronic Submission](#)

Submission

Manuscripts and correspondence pertaining to them should be sent to:

Editorial Office 'JMMB'

S. Karger AG
P.O. Box
CH-4009 Basel (Switzerland)
Tel. +41 61 306 1356
Fax +41 61 306 1434
E-Mail e.lawrence@karger.ch

Mailing address for courier deliveries only:

Allschwilerstr. 10
CH-4055 Basel (Switzerland)

or to one of the following editors:

Editor-in-Chief

M.H. Saier, Jr.
Division of Biological Sciences
University of California at San Diego
La Jolla, CA 92093-0116 (USA)
Tel. +1 858 534 4084
Fax +1 858 534 7108
E-Mail: msaier@ucsd.edu

Senior Editors

Peter Dürre
Mikrobiologie und Biotechnologie
Universität Ulm
D-89069 Ulm (Germany)
Tel. +49 731 502 2710
Fax +49 731 502 2719
E-Mail: peter.duerre@biologie.uni-ulm.de

Masayori Inouye
Robert Wood Johnson Medical School
Department of Biochemistry
675 Hoes Lane
Piscataway, NJ 08854 (USA)
Tel. +1 732 235 4540
Fax +1 732 235 4559
E-Mail: inouye@umdnj.edu

Sueharu Horinouchi
Department of Biotechnology
Graduate School of Agriculture and Life Sciences
The University of Tokyo

113-8657 Bunkyo-ku, Tokyo (Japan)
Tel. +81 3 5841 5123
Fax +81 3 5841 8021
E-Mail: asuhori@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

George P.C. Salmond
Department of Biochemistry
University of Cambridge, Tennis Court Road
Cambridge, CB2 1QW (UK)
Tel. +44 1223 333650
Fax +44 1223 333345
E-Mail: gpcs@mole.bio.cam.ac.uk

Manuscripts should be written in English. They should be submitted in triplicate (with three sets of illustrations, of which one is original), typewritten double-spaced on one side of the paper (size approx. 21 × 28 cm), with 3-cm margins.
The final version of your manuscript and illustrations should also be submitted on disk. For details refer to Disk Submission. Editorial review and copy-editing will be executed from the disk version of your manuscript.
Resubmission of a rejected manuscript should be addressed to the original receiving editorial office.

▲

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that they are not under simultaneous consideration by any other publication. A covering letter should be included with both the first and final version of the manuscript with the signature of all authors to confirm that they have seen and approved the submission. Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the permanent property of 'Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher. It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc. from other publications. It is a policy of the journal that

nucleotide sequence data should be deposited with the EMBL/GenBank/DBJ libraries prior to publication, and the accession number should be quoted in the manuscript.

▲

Arrangement

English: All manuscripts must be written in perfect English. Before you submit, please ensure that your manuscript is corrected by someone who speaks English as his or her first language.

Abstract: Each paper must include an abstract. Abstracts should be 100–200 words.

Running Title: Each paper must include a running title of no more than 80 characters.

Research Articles: Original research articles should be sub-divided into the following sections:

- Abstract
- Introduction (concise with no sub-headings)
- Results (may be sub-divided)
- Discussion (results and discussion may be combined and may include sub-headings)
- Experimental Procedures (should be sufficiently detailed to permit the experiments to be reproduced)
- Acknowledgements
- References

Reviews: Review articles should be sub-divided into the following sections:

- Abstract
- Introduction (concise with no sub-headings)
- The main text of the paper (should be divided under various headings as appropriate to the article)
- Acknowledgements
- References

Communications: Short Communications should be 2–5 journal pages in length, should include an abstract and running title, but should not be divided into introduction, results, discussion, and experimental procedures sections. Sub-sections specifying topic are permissible.

Units: Concentration to be given in g/l, etc., or molarity, M. Use the format microgram (greek letter mu + g)/ml not microgram (greek letter mu + g) ml-1. Note ml not mL.

Footnotes: Avoid footnotes. When essential, they are numbered consecutively and typed at the foot of the appropriate page.

Tables and Illustrations: Tables and illustrations (both numbered in Arabic numerals) should be prepared on separate sheets. Tables require a heading and figures a legend, also prepared on a separate sheet. For the reproduction of illustrations, only good drawings and original photographs can be accepted; negatives or photocopies cannot be used. Due to technical reasons, figures with a screen background should not be submitted. When possible, group several illustrations on one block for reproduction (max. size 180 × 223 mm) or provide crop marks. On the back of each illustration, indicate its number, the author's name, and 'top' with a soft pencil. Electronically submitted b/w half-tone and color illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800–1200 dpi.

Color Illustrations: Up to 6 color illustrations per page can now be integrated within the text at the special price of CHF / USD 660.00 per page. Color illustrations are reproduced at the author's expense.

References: Identify references [in square brackets] in the text by naming the authors and the year. 1 author: [Saier, 1994]; 2 authors: [Altschul and Karlin, 1990]; 3 and more authors: [Yen et al., 2002]. Several references listed within square brackets should be cited in an alphabetical order. Material submitted for publication but not yet accepted should be noted as 'unpublished data' and may not be included in the reference list. The list of references should include only those publications cited in the text. Arrange the reference list in strict alphabetical order according to the examples given below. The authors' surnames followed by their initials should be given, and each name should be separated by a comma. Preferably, please cite all authors. For papers by the same authors, listing should be according to the year; for papers by the same authors published in the same year, use the letters a, b, c, etc. directly (no space) connected to the year. For journal abbreviations, please use the Index Medicus system.

Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying

and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

Examples

(a) *Papers published in periodicals:* Andrade MA, Ponting C, Gibson T, Bork P: Homology-based method for identification of protein repeats using statistical significance estimates. *J Mol Biol* 2000; 298:521–537.

(b) *Papers published only with DOI numbers:* Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) *Monographs:* Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*. Basel, Karger, 1985.

(d) *Edited books:* Russell RRB: Genetic analysis and genetic probes for oral bacteria; in Ferguson DB (ed): *Aspects of Oral Molecular Biology*. *Front Oral Physiol*. Basel, Karger, 1991, vol 8, pp 57–76

▲

Page Charges

There are no page charges for papers of 6 or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF / USD 290.00 will be levied for all pages in excess of the allotted 6 printed pages. The allotted size of a paper is equal to approx. 18 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

▲

Galley Proofs

Unless indicated otherwise, galley proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations made in galley proofs, other than the correction of printer's errors, are charged to the author. No page proofs are supplied.

▲

Reprints

The corresponding authors of all papers will receive a one-year subscription to 'JMMB' free of charge. Order forms and a price list for additional reprints are sent with the galley proof. Orders submitted after the issue is printed are subject to considerably higher prices.

Journal of
Molecular Microbiology
and Biotechnology

-
- ▶ [Journal Home](#)
 - ▶ [Editorial Board](#)
 - ▶ [Guidelines](#)
 - ▶ [Issues](#)

-
- ▶ [Advertising](#)
 - ▶ [Subscriptions](#)
 - ▶ [Free Alert](#)
 - ▶ [Online Sample](#)

■ Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel