



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**ANA CAROLINA MONROY HUMPHREY**

**EFEITOS DE PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS NA PRODUÇÃO DE**  
**PIGMENTOS E BIOMASSA DE TRÊS BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLOS**  
**AMAZÔNICOS**

**MANAUS**  
**2016**

**ANA CAROLINA MONROY HUMPHREY**

**EFEITOS DE PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS NA PRODUÇÃO DE  
PIGMENTOS E BIOMASSA DE TRÊS BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLOS  
AMAZÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira**

**MANAUS**

**2016**

Ficha Catalográfica

O48e Humphrey, Ana Carolina Monroy

Efeitos de parâmetros físicos e químicos na produção de pigmentos e biomassa de três bactérias isoladas de solos amazônicos . / Ana Carolina Monroy Humphrey -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2016.

81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2016.

Ficha catalográfica elaborada por  
Maria Eliana N. Silva – CRB- 11/248

## **DEDICATÓRIA**

A Dios que permitió que uno más de mis sueños y metas se hiciera realidad, trayéndome al lugar exacto en el momento perfecto. Por llenarme de paciencia y sabiduría en cada paso del camino, haciendo que cada día que viví en este maravilloso lugar, me hiciera crecer como persona.

A mis padres Ana Astrid Carolina Humphrey López y Guillermo Monroy Horta por el apoyo cada día desde mi venida, llenándome de consejos y de ánimos. Por la ayuda que me dieron en cada problema y dificultad que encontré en el camino y por el amor incondicional que me impulsa a ser mejor. A mis hermanas María Gabriela Monroy Humphrey y Kathia Monroy Humphrey por el cariño, los ánimos, las risas y por siempre mantener el equilibrio familiar. A mi futuro primer sobrino, que desde ya trae alegría a nuestra familia.

A mis abuelos que ya no me acompañan, pero que siempre formaran parte de mis alegrías, y que desde donde estén sé que celebran junto conmigo otro triunfo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade outorgada para fazer de mais um sonho, uma realidade. Pelas varias benções que recebi ao longo do caminho e pela força e a sabedoria nos momentos de dificuldade.

À minha família pelo apoio e amor incondicional, porque apesar da distancia permaneceram sempre do meu lado. A meu tio Herbert Humphrey pelos conselhos, o carinho, e o apoio econômico quando o precisei.

Ao meu orientador Luiz Antonio de Oliveira pelo apoio no desenvolvimento do meu projeto. Fico muito grata pela orientação e por ter permitido fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Aos meus amigos Carla, Jorge, Paola, Bianka, Alan, Jaqui, Carlos, Juan, Diego e Tati que se tornaram minha família no Brasil. A base do sucesso é estar acompanhado das melhores pessoas ao longo do caminho, e foi com estas pessoas com quem compartilhei os melhores momentos da minha travessia. Ao meu companheiro Rodolfo Carvalho, por trazer alegria à minha vida. Pelo muito que me ensinou em tão pouco tempo, ajudando-me a crescer ainda mais como profissional e como pessoa.

Aos meus grandes amigos na Guatemala, pois, apesar da distância me deram todo o seu amor e apoio, me lembrando que a distância não é grande o suficiente para separar aos verdadeiros amigos. Porque quando mais precisei deles, estiveram dando-me as palavras certas para superar cada tropeço.

À Beatriz Pinheiro pela ajuda inicial na correção do meu projeto de qualificação e pelos conselhos técnicos. Fico muito grata com você.

Ao Francisco pelo apoio técnico dentro do laboratório. Às meninas que formam parte do grupo de pesquisa pela companhia, ajuda e sorrisos. A Mirna pela ajuda no laboratório, e pela sua amizade, muito obrigada.

À professora Cecilia Nunez por abrir-me as portas do seu laboratório para o uso do equipamento.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) pela oportunidade de participar em um dos programas. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa outorgada durante o período do mestrado. À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e ao programa do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais pelos cursos fornecidos.

## RESUMO

A aceitação de muitos produtos no mercado está diretamente relacionada à sua aparência, e entre as características mais importantes pode-se citar a cor. Estudos tem estabelecido que as doses inadequadas de corante sintéticos são prejudiciais para a saúde do consumidor, culminando, por tanto, em criações de legislações em relação à sua utilização. Devido à atual tendência mundial de querer substituir o artificial pelo natural, a indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética está na busca de produtos naturais que não ocasionem danos à saúde e que sejam amigáveis ao meio ambiente. Uma alternativa para a obtenção de pigmentos naturais é através de bactérias devido às vantagens que possuem em termos de sua alta taxa de crescimento, independência geográfica, condições controláveis, manipulação genética, além da redução dos custos através do uso de meios de cultivo mais econômicos. No presente trabalho objetivou-se testar distintos parâmetros físicos e químicos, identificando aqueles que influenciam de forma positiva no crescimento celular e produção de pigmentos de três bactérias isoladas de solos amazônicos (*Serratia marcescens*, *Microbacterium* sp. e *Burkholderia* sp.). Os testes foram realizados por meio de crescimento em caldo nutritivo selecionado como meio base, testando distintas fontes de carbono, nitrogênio, temperaturas e pH. Foram retiradas amostras cada 24, 48 e 72h após incubação, medindo o crescimento celular por meio de OD (densidade ótica) a 600nm, e a produção do pigmento através da extração com solventes polares quando foi necessário, e a leitura da OD no comprimento de onda para cada caso (vermelho a 470 nm para *S. marcescens*, amarelo a 440 nm para *Microbacterium* sp. e, roxo a 470 nm para *Burkholderia* sp.). A maior produção de biomassa de *S. marcescens* foi obtida utilizando sacarose e glicose como fontes de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, em uma temperatura de 25°C e um pH que pode variar entre 7 e 8. Os parâmetros de crescimento que influenciaram de forma positiva na A produção do pigmento foi favorecida pelo uso do amido solúvel como fonte de carbono, o extrato de levedura como fonte de nitrogênio, a uma temperatura de 25°C e com um pH 8 no meio de cultura. Com relação à *Microbacterium* sp., um melhor crescimento celular ocorreu na presença de sacarose como fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, em 25 e 30 °C com um pH entre 6 e 8. O amido solúvel como fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, em uma faixa entre 20-30°C, e um pH entre 6 e 9 favoreceram a produção do pigmento. Quanto à *Burkholderia* sp., crescimento celular foi favorecido pelo uso de glicose como fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, a uma temperatura de 20 e 25°C e um pH de 6. As maiores produções de pigmento foram observadas quando a lactose foi utilizada como fonte de carbono, extrato levedura como fonte de nitrogênio, a uma temperatura de 20 e 25°C e um pH entre 6 e 7. Estes resultados podem ser utilizados para obter melhores rendimentos na produção dos pigmentos de interesse nas espécies de bactérias estudadas.

Palavras chaves: Metabolismo microbiano, biopigmentos, microbiota amazônica, produtos biotecnológicos.

## ABSTRACT

The acceptance of many products in the market is directly related to their appearance, and among the most important features we can mention the color. Due to the current global trend of wanting to replace the artificial for the natural, the food industry, textile, pharmaceutical and cosmetic are seeking natural products that do not cause harm to health and that are friendly to the environment. An alternative source for obtaining natural pigments are bacteria, due to the advantages they have in terms of their high growth rate, geographic independence, controllable conditions, genetic manipulation, and reduced cost through the use of less expensive growth media. The present study aimed to test different physical and chemical parameters, identifying those that influence positively on cell growth and pigment production of three bacteria isolated from Amazonian soils (*Serratia marcescens*, *Microbacterium* sp. and *Burkholderia* sp). The tests were performed using nutrient broth as growing medium, selected as the base medium, testing different sources of carbon, nitrogen, temperature and pH. Samples were taken at 24, 48 and 72 hours after incubation, by measuring the cell growth by means of OD (optical density) at 600 nm, and pigment production by extraction with polar solvents when necessary, and reading the OD in the wavelength for each case (red at 470 nm for *S. marcescens*, yellow at 440 nm for *Microbacterium* sp., and purple at 470 nm for *Burkholderia* sp). In *Serratia marcescens* the highest biomass was obtained with sucrose and glucose as carbon source, yeast extract as a nitrogen source at a temperature of 25°C and a pH of 7 and 8. The growth parameters that influenced positively in the production of pigment was the use of soluble starch as carbon source, yeast extract as a nitrogen source at a temperature of 25°C and pH 8. Regarding to *Microbacterium* sp., the best cell growth occurred in the presence of sucrose as carbon source, yeast extract as nitrogen source, at a temperature of 25 and 30°C with a pH between 6 and 8. Soluble starch as carbon source, yeast extract as a nitrogen source in a temperature range between 20-30 °C and a pH between 6 and 9, favored the pigment production. As to *Burkholderia* sp., cell growth was favored by the use of glucose as carbon source, yeast extract as a nitrogen source at a temperature of 20-25°C, and a pH of 6. The higher pigment yields were observed when lactose was used as carbon source, yeast extract as a nitrogen source at a temperature of 20 and 25°C, and a pH between 6 and 7. These results can be used in order to improve the yields in the production of pigments of interest by the bacterial species studied.

Key words: microbial metabolism, biopigment, Amazon microbiota, biotechnology products.

## SUMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEORICO .....</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>CAPITULO I .....</b>	<b>25</b>
.....	25
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
2.1 CRESCIMENTO DA BACTÉRIA EM MEIO LIQUIDO .....	28
2.2 TESTE DE FONTES DE CARBONO .....	28
2.3 TEST DE FONTES DE NITROGÊNIO .....	28
2.4 TESTE DE TEMPERATURAS.....	29
2.5 TESTE DE PH.....	29
2.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO PIGMENTO .....	29
2.7 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR.....	29
2.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR .....	29
2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	30
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
3.1 EFEITO DAS FONTES DE CARBONO.....	31
3.2 EFEITO DAS FONTES DE NITROGÊNIO .....	33
3.3 EFEITO DA TEMPERATURA.....	35
3.4 EFEITO DO PH.....	36
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>
<b>CAPITULO 2.....</b>	<b>41</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
2.1 CRESCIMENTO DA BACTÉRIA EM MEIO LIQUIDO .....	44
2.2 TESTE DE FONTES DE CARBONO .....	44

2.3	TEST DE FONTES DE NITROGÊNIO .....	44
2.4	TEST DE TEMPERATURAS.....	45
2.5	TEST DE PH.....	45
2.6	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO PIGMENTO .....	45
2.7	AValiação DO CRESCIMENTO CELULAR.....	45
2.8	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR .....	45
2.9	ANALISES ESTATÍSTICA .....	46
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
3.1	EFEITO DAS FONTES DE CARBONO.....	47
3.2	EFEITO DAS FONTES DE NITROGÊNIO .....	48
3.3	EFEITO DA TEMPERATURA.....	50
2.1.	EFEITO DO PH .....	52
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>
	<b>CAPITULO 3.....</b>	<b>56</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
2.1	CRESCIMENTO DA BACTÉRIA EM MEIO LIQUIDO .....	59
2.2	TESTE DE FONTES DE CARBONO .....	59
2.3	TEST DE FONTES DE NITROGÊNIO .....	60
2.4	TEST DE TEMPERATURAS.....	60
2.5	TEST DE PH.....	60
2.6	OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO PIGMENTO .....	60
2.7	AValiação DO CRESCIMENTO CELULAR.....	61
2.8	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR .....	61
2.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	62
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
3.1	EFEITO DAS FONTES DE CARBONO.....	62
3.2	EFEITO DAS FONTES DE NITROGÊNIO .....	63
3.3	EFEITO DA TEMPERATURA.....	64
3.4	EFEITO DO PH .....	66
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>70</b>

<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPITULO 1</b>	Pag.
Figura 1. Efeito das fontes de carbono no crescimento celular de <i>Serratia marcescens</i> .....	32
Figura 2. Efeito das fontes de carbono na produção de pigmento de <i>Serratia marcescens</i> .....	33
Figura 3. Efeito das fontes de nitrogênio no crescimento celular de <i>Serratia marcescens</i> .....	34
Figura 4. Efeito das fontes de nitrogênio na produção de pigmento de <i>Serratia marcescens</i> ....	35
Figura 5. Efeito da temperatura no crescimento celular de <i>Serratia marcescens</i> .....	36
Figura 6. Efeito da temperatura na produção de pigmento de <i>Serratia marcescens</i> .....	36
Figura 7. Efeito do pH no crescimento celular de <i>Serratia marcescens</i> .....	37
Figura 8. Efeito da temperatura na produção de pigmento de <i>Serratia marcescens</i> .....	37
Figura 9. Produção do pigmento por <i>Serratia marcescens</i> .....	38
<b>CAPITULO 2</b>	
Figura 1. Efeito das fontes de carbono no crescimento celular de <i>Microbacterium</i> sp.....	48
Figura 2. Efeito das fontes de carbono na produção de pigmento de <i>Microbacterium</i> sp.....	48
Figura 3. Efeito das fontes de nitrogênio no crescimento celular de <i>Microbacterium</i> sp.....	49
Figura 4. Efeito das fontes de nitrogênio na produção de pigmento de <i>Microbacterium</i> sp.....	50
Figura 5. Efeito da temperatura no crescimento celular de <i>Microbacterium</i> sp.....	51
Figura 6. Efeito da temperatura na produção de pigmento de <i>Microbacterium</i> sp.....	51
Figura 7. Efeito do pH no crescimento celular de <i>Microbacterium</i> sp.....	52
Figura 8. Efeito da temperatura na produção de pigmento de <i>Microbacterium</i> sp.....	52
Figura 9. Produção do pigmento por <i>Microbacterium</i> sp.....	53
<b>CAPITULO 3</b>	
Figura 1. Efeito das fontes de carbono no crescimento celular de <i>Burkholderia</i> sp.....	63
Figura 2. Efeito das fontes de carbono na produção de pigmento de <i>Burkholderia</i> sp.....	63
Figura 3. Efeito das fontes de nitrogênio no crescimento celular de <i>Burkholderia</i> sp.....	64

Figura 4. Efeito das fontes de nitrogênio na produção de pigmento de <i>Burkholderia</i> sp.....	64
Figura 5. Efeito da temperatura no crescimento celular de <i>Burkholderia</i> sp.....	65
Figura 6. Efeito da temperatura na produção de pigmento de <i>Burkholderia</i> sp.....	66
Figura 7. Efeito do pH no crescimento celular de <i>Burkholderia</i> sp.....	66
Figura 8. Efeito da temperatura na produção de pigmento de <i>Burkholderia</i> sp.....	67
Figura 9. Figura 9. Crescimento de <i>Burkholderia</i> sp. em agar nutritivo.....	68
Figura 10. Pigmento em água destilada e no meio de cultura base.....	69

## 1. INTRODUÇÃO

A cor é um constituinte vital e provavelmente uma das principais características da percepção dos sentidos. O homem procura sempre o que é agradável através dos estímulos visuais. As evidências artísticas das pinturas pré-históricas comprova o interesse das civilizações antigas na formulação de tinturas naturais. Antes da chegada dos pigmentos sintéticos os corantes naturais eram a única fonte de cores. Os pigmentos sintéticos foram introduzidos em meados de 1856, pelos avanços na química orgânica e pelo desenvolvimento de corantes sintéticos de baixo custo (VENIL *et al.*, 2013).

As pesquisas tem demonstrado que os corantes naturais derivados de plantas e animais, geralmente são seguros por não oferecerem toxicidade, não apresentar riscos carcinogênicos e são caracterizado como moléculas biodegradáveis. Atualmente a tendência mundial está despertando interesse na produção desses compostos frente aos perigos que os corantes sintéticos estão provocando na saúde humana e no meio ambiente (VENIL *et al.*, 2014).

A indústria, motivada pelas mudanças de comportamento social de hábitos alimentares mais saudáveis, e por inúmeras oportunidades oferecidas pelos avanços tecnológicos, vem aumentando a disponibilidade de corantes naturais no mercado. Portanto, a inovação e a pesquisa devem ser cada vez maiores com essa perspectiva (BABITHA 2009).

Os corantes naturais são derivados de minerais, insetos, plantas e microrganismos, sendo estes últimos, potencialmente promissores a diferentes finalidades (VENIL *et al.*, 2014). O uso de microrganismos apresenta duas vantagens frente a outras formas de vida: a primeira é o mecanismo de fermentação, considerado um processo eficiente e rápido com maior produtividade em relação a qualquer processo químico. A segunda vantagem é que os microrganismos podem ser geneticamente manipulados, permitindo obter o produto de interesse com rendimentos altos (VELMURUGAN *et al.* 2010).

Muitas espécies de bactérias produzem variedade de pigmentos que são importantes para a sua fisiologia celular e sobrevivência. Estudos têm mostrado que alguns destes metabólitos possuem atividade antibiótica, anticarcinogênica, imunossupressoras, antifúngicas, bactericida, antitumoral, antimalárico, inseticida e antioxidante (KURBANOGU *et al.* 2015; ZANG *et al.* 2014; LAPENDA 2010). Estas e outras características, fazem destes compostos, produtos de importância econômica devido à sua

ampla utilização em diversos setores industriais, sendo de fato os pigmentos naturais uma demanda crescente do mercado, com um aumento de 10-15% anual (PEREIRA *et al.*, 2014).

Um dos grandes desafios tecnológicos é procurar meios de crescimento mais econômicos, já que os produtos sintéticos possuem um alto custo de produção em grande escala. Outros desafios é obter pigmentos puros e concentrados, procurar alternativas de separação dos pigmentos, escolher os solventes mais adequados já que eles também são contaminantes, obter uma produção de quantidades suficientes através de bons processos de fermentação e obter altos rendimentos em tempos relativamente curtos (VENIL *et al.*, 2013).

Considerando as abundantes atividades biológicas apresentadas pelos diversos pigmentos, é necessária a pesquisa de novos organismos produtores destes e outros compostos promissores, junto com a busca de processos de crescimento adequados para a sua obtenção.

## 2. REFERENCIAL TEORICO

Dos sentidos do ser humano um 87% é responsável das percepções pela visão, 9% pela audição e o 4% restantes por meio do olfato, do tato e do paladar. A aceitação de muitos produtos no mercado está diretamente relacionada à sua cor, característica que embora seja subjetiva é fundamental na indução da sensação de outras características como aroma, sabor e a textura. Com a finalidade de dar uma aparência que agrade ao consumidor, o setor alimentício, farmacêutico e têxtil preocupa-se com a aplicação de cores em seus produtos (INSUMOS, 2009).

Desde as antigas civilizações o homem tinha o hábito de utilizar substâncias da natureza para colorir seus alimentos e as roupas com a finalidade de melhorar sua aparência (ABEROUMAND 2011; PRADO e GODOY 2003). Até 1856 todos os corantes alimentícios provinham de vegetais, extratos de origem animal, minerais e alguns como resultados da transformação de substâncias naturais (OTTERSTÄTTER, 1999). Com a chegada dos corantes sintéticos nos séculos XVIII e XIX aumentou o interesse das indústrias pelos corantes artificiais, com a finalidade de obter maior aceitação pelo consumidor e inclusive na tentativa de mascarar alimentos de baixa qualidade (PRADO; GODOY, 2003). Os corantes sintéticos ou artificiais são uma classe de aditivos introduzidos nas bebidas e alimentos sem valor nutritivo, cujo único objetivo é fazê-los mais atrativos (INSUMOS, 2009).

Estudos demonstraram que o uso incorreto dos corantes sintéticos podia provocar reações adversas. Diversos países permitem o uso de diferentes corantes e em diferentes quantidades dependendo da legislação. Foi em 1906 que surgiram as primeiras suspeitas da ação cancerígena dos corantes e desde então foram empreendidas varias pesquisas sobre a ação tóxica e cancerígena deles (PRADO; GODOY, 2003).

No inicio do século XX os Estados Unidos chegaram a ter mais de 700 corantes sintéticos, numero reduzido para nove corantes permitidos, sendo dois de uso restrito. No Japão permite-se o uso de 11 e com a criação da União Europeia harmonizaram-se as legislações dos países membros permitindo 17 corantes artificiais para alimentos e bebidas. No Brasil a legislação atual através das Resoluções nº 382-388, de 9 de agosto de 1999, da ANVISA, são permitidos apenas 11 corantes artificiais para o uso em alimentos e bebidas sendo eles: amarantho, vermelho de eritrosina, vermelho 40, ponceau4R, amarelo crepúsculo, amarelo tartrazina, azul de indigotina, azul brilhante, azorrubina, verde rápido e azul patente V. (INSUMOS, 2009; PRADO; GODOY, 2003).

## Uso de microrganismos na produção de pigmentos

Estatisticamente 50% das drogas existentes utilizadas no tratamento de doenças humanas são derivadas de produtos naturais, a maioria das quais são derivadas de organismos terrestres. Embora muitos dos compostos têm demonstrado atividades biológicas promissoras, é difícil nomear qualquer agente bioativo que tem sido comercializado como medicamento ou no uso em alimentos devido ao número de testes que devem ser feitos previamente. Conseguiram-se isolar até hoje compostos naturais de diferentes fontes com pigmentação farmacologicamente ativa, e muita pesquisa ainda deve ser feita para procurar novas fontes de produtos de interesse (SOLIEV *et al.*, 2011).

Pigmentos naturais são obtidos de minerais, plantas, insetos e microrganismos. As duas maiores fontes de pigmentos são as plantas e os microrganismos (YUANG *et al.*, 2009; VENIL *et al.*, 2014). Uma via alternativa para a produção de corantes naturais é através da aplicação de ferramentas biotecnológicas utilizando microrganismos. Quando as células microbianas são utilizadas para a produção de cor, o termo utilizado é pigmentos microbianos (BABITHA, 2009).

O acesso aos pigmentos de plantas possuem desvantagens tais como instabilidade à luz, calor e pH extremo, baixa solubilidade em água e não têm disponibilidade durante todo o ano (VIKAS *et al.*, 2013). Em geral, pigmentos, que são produzidos pelos organismos maiores como, animais, plantas e fungos podem ser menos acessíveis dada a complexidade do tecido produtor do pigmento, ou pelo fato do pigmento ser produzido somente em determinadas fases do desenvolvimento do organismo dentro do ciclo de vida (VIKAS *et al.*, 2013).

Um método promissor é a produção de biopigmentos por microrganismos que apresentam uma alta taxa de crescimento e viabilidade no desenvolvimento de bioprocessos (YUANG *et al.*, 2009). A utilização de microrganismos na produção de pigmentos traz muitas vantagens, não só pela característica natural deles senão também pelo fato de não dependerem das condições climáticas nem geográficas para seu crescimento, sendo completamente controláveis e de rendimentos previsíveis (BABITHA, 2009). Os pigmentos microbianos são de interesse industrial, porque eles são mais estáveis e solúveis do que aqueles que são obtidos a partir de plantas e animais (VIKAS *et al.*, 2013), e o mais importante é que podem ser produzidos utilizando como matéria prima resíduos industriais e, assim, reduzir a poluição da água e do meio ambiente (BABITHA, 2009). Outras das vantagens de utilizar microrganismos, é que podem ser modificados geneticamente, e como resultado a produção

de pigmentos pelo microrganismo pode ser aumentada em grandes proporções (KUMAR *et al.* 2015).

Existem numerosas espécies de bactérias, fungos, leveduras e algas que podem produzir pigmentos, mas apenas alguns são considerados adequados para esta finalidade. Eles devem satisfazer critérios, tais como a capacidade de utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono e nitrogênio, devem ter tolerância às condições de crescimento desejadas de pH, temperatura e concentração de minerais, rendimento razoável do produto, não devem ser tóxicos e patogênicos, e devem ser facilmente separados da sua massa celular (BABITHA, 2009).

Fermentações para a obtenção de pigmentos têm sido realizadas em sua maioria em culturas sólidas, mas devido aos rendimentos muito baixos ainda não foi possível a obtenção de uma produção em escala industrial que seja econômica. Para aumentar o rendimento do pigmento, grandes partes das pesquisas centraram-se em culturas submersas ou líquidas. Estudos devem ser realizados de acordo com a cepa do microrganismo de interesse devido a possível influência no rendimento pelos parâmetros de crescimento, mesmo antes de extrair o pigmento de interesse (MUKHERJEE; SINGH, 2011). A tabela 1 mostra alguns microrganismos mais comuns produtores de pigmentos.

Tabela 1. Microrganismos produtores de alguns pigmentos específicos.

	<b>Microrganismo</b>	<b>Cor</b>
<b>Bactérias</b>	<i>Janthinobacterium lividum</i>	Roxo azulado
	<i>Achromobacter</i>	Creme
	<i>Bacillus sp</i>	Café
	<i>Brevibacterium sp</i>	Laranja-amarelo
	<i>Corynebacterium michiganense</i>	Cinza-creme
	<i>Pseudomonas sp</i>	Amarelo
	<i>Rhodococcus maris</i>	Vermelho-azulado
	<i>Streptomyces sp</i>	Amarelo, vermelho, azul
	<i>Serratia sp</i>	Vermelho
	<b>Fungos</b>	<i>Aspergillus sp</i>
<i>Blakeslea trispora</i>		Creme
<i>Monascus purpureus</i>		Amarelo, laranja, vermelho
<i>Helminthosporium catenarium</i>		Vermelho
<i>H. gramineum</i>		Vermelho

	<i>H. cynodontis</i>	Bronze
	<i>H. avenae</i>	Bronze
	<i>Penicillium cyclopium</i>	Laranja
	<i>P. nalgovnsis</i>	Amarelo
<b>Leveduras</b>	<i>Rhodotorula sp</i>	Vermelho
	<i>Yarrowialipolytica</i>	Café
	<i>Cryptococcus sp</i>	Vermelho
	<i>Phaffi rhodozyma</i>	Vermelho
<b>Algas</b>	<i>Dunaliella salina</i>	Vermelho

Fonte: Bbabitha (2009) modificada.

Os microrganismos podem produzir grandes variedades de pigmentos estáveis tais como carotenoides, flavonoides, quinonas e rubraminas (ALIHOSSEINI *et al.* 2008). Apesar dos microrganismos produtores de pigmentos serem comuns, há um longo caminho a partir da placa de Petri para o mercado. Antes de serem utilizados para fins comerciais, deve ser feito muito trabalho experimental, otimização de processos, estudos toxicológicos e as questões regulatórias. Apenas alguns pigmentos são produzidos em escala industrial, devido aos regulamentos existentes nem todos podem entrar no mercado internacional (DUFOSSÉ *et al.* 2005).

### **Mercado dos corantes naturais.**

Mesmo sendo em certos casos mais caros do que seus análogos sintéticos, os pigmentos naturais têm segmentos de mercado que procuram por pigmentos naturais. Os produtos são de grande valor comercial se são corados com compostos naturais (ABEROUMAND, 2011). Um exemplo é o  $\beta$ -caroteno produzido por bactéria tem um custo aproximado de \$1000/kg, frente a o produzido de forma sintética com um custo de \$500/kg. Apesar de ser um valor mais elevado, o  $\beta$ -caroteno produzido por meio de bactérias compete num segmento do mercado onde é indispensável que os pigmentos sejam de origem natural (VENIL *et al.* 2013).

Embora o mercado de pigmentos bacterianos seja difícil de estimar, a demanda global por pigmentos orgânicos e corantes é esperado atingir quase 10 milhões de toneladas no 2017 de acordo com a “Global Industry Analysts” (VENIL *et al.* 2013). A tabela 2 mostra alguns dos pigmentos naturais produzidos por bactérias e as aplicações de cada um.

Tabela 2. Pigmentos naturais produzidos por bactérias.

<b>Bactérias</b>	<b>Pigmento/ molécula</b>	<b>Cor</b>	<b>Aplicações</b>
<i>Agrobacterium aurantiacum</i> , <i>Paracoccus carotinifaciens</i> , <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Rosa-vermelho	Suplemento alimentício
<i>Rhodococcus maris</i>	$\beta$ -caroteno	Vermelho-azulado	Utilizado para tratar desordens como protoporfiria eritropoiética, reduz o risco de câncer de seio.
<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Haloferax alexandrinus</i>	Cantaxantina	Vermelho escuro	Corante utilizado em alimentos, bebidas e preparações farmacêuticas.
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Indigotina	Azul	Proteção de estresse oxidativo
<i>Rugamonas rubra</i> , <i>Streptovercillium rubrireticuli</i> , <i>Vibrio gaogenes</i> , <i>Alteromonas rubra</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia rubidaea</i>	Prodigiosina	Vermelho	Anticarcinogênico, imunossupressor, antifúngico, algicida, e para tingimento (têxteis, velas, papel, tinta).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piocianina	Azul-verde	No metabolismo oxidativo, redução de inflamação local.
<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Janthinobacterium lividum</i>	Violaceína	Roxo	Farmacêuticas (antioxidante, imunomodulador, antitumoral, atividade antiparasitária), tingimento (têxteis) e cosméticos (lociones).
<i>Flavobacterium</i> sp., <i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Zeaxantina	Amarelo	Utilizado para tratar distintas desordens, em sua maioria os que afetamos olhos.
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Xantomonadina	Amarelo	Marcadores quimiotaxonômicos e de diagnóstico.

Fonte: Venil *et al.* (2013)

O desenvolvimento de alimentos com aparência atrativa é uma meta importante na indústria de alimentos. Produtores de alimentos, cada vez mais, estão se virando para as cores naturais devido a que o consumo de certos aditivos coloridos tem mostrado efeitos negativos na saúde. Os corantes microbianos já estão sendo utilizados na indústria da pesca para melhorar a cor de rosa do salmão de criadouro, assim como também alguns tem potencial antioxidante que pode ser acrescentado nos alimentos ou bebidas (VENIL *et al.* 2013). Cor é agregada à comida pelas razões seguintes: para substituir a cor perdida ao longo do processo, para acrescentar a cor já presente, para minimizar as variações entre os lotes ou para corar os alimentos descoloridos (ABEROUMAND, 2011).

Alguns exemplos destes pigmentos utilizados na indústria alimentícia incluem o pigmento vermelho produzido pelo fungo *Monascus* que é utilizado para melhorar as características organolépticas dos produtos alimentícios. O  $\beta$ -caroteno, pigmentos com tonalidades amarelas são utilizados pelas propriedades antioxidantes sendo pro-vitamina A (KUMAR *et al.*, 2015; LATHA *et al.*, 2005). A riboflavina ou vitamina B2 é um corante utilizado em alimentos, de uso permitido em vários países. É utilizado principalmente em produtos a base de cereais (KUMAR *et al.*, 2015).

Utilizados na indústria farmacêutica encontramos compostos como antocianinas, pigmentos flavonoides solúveis em água com atividades biológicas como antioxidantes, redução de risco de câncer, e efeito inibitório no crescimento de tumores. A prodigiosina, produzida por *Vibrio psychroerythrus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas magnesorubra* e outras eubactérias, é um pigmento vermelho tripirrol que tem mostrado atividade imunossupressora, antibiótica, antimalárica e com efeitos citotóxicos em linhas de células tumorais (KUMAR *et al.* 2015, VENIL *et al.* 2013). A violaceína, um pigmento violeta isolado principalmente da bactéria *Chromobacterium violaceum*, tem mostrado atividade antitumoral, antiparasitária, antiprotozoária, anticarcinogênica, antiviral, antibacteriana y antioxidante (KUMAR *et al.*, 2015). Distintas espécies de *Monascus* são produtoras de pigmentos amarelos, laranjas e vermelhos, e é o *Monascus purpureus* a espécie utilizada para a produção de um produto utilizado na cozinha chinesa que resulta da fermentação do arroz junto com a levedura (“Red yeast rice”). É um microrganismo utilizado também como agente medicinal devido ao composto produzido, monacolina K uma lovastatina, utilizado para tratar a hipercolesterolemia (KUMAR *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2006).

A indústria têxtil produz aproximadamente 1,3 milhões de toneladas de corantes, pigmentos e precursores destes por ano, com um mercado anual estimado de U\$ 23 bilhões e a maioria fabricados de forma sintética. Porém os corantes sintéticos têm limitações tais como: o processo requer o uso de produtos químicos perigosos criando preocupações na segurança do trabalhador, geração de resíduos perigosos e esses corantes não são amigáveis com o ambiente (VENIL *et al.* 2013). Devido ao potencial comercial que alguns dos pigmentos possuem, há uma demanda para o desenvolvimento de bioprocessos de alto rendimento e custo efetivos para a produção de pigmentos naturais (WEI e CHEN, 2005).

Alguns corantes naturais como os compostos do tipo antraquinona têm mostrado notável atividade antibacteriana além de apresentar cores brilhantes, as quais podem ser utilizadas na produção de têxteis coloridos com características antimicrobianas (ALIHOSSEINI *et al.* 2008).

### **Propriedades dos pigmentos.**

Uma das características importantes dos pigmentos é a sua baixa solubilidade em água, sensibilidade ao calor e à luz, e instabilidade em certos pHs. As condições adequadas devem ser encontradas para manter um pigmento estável e que influa na produção de forma significativa: fonte de carbono e concentrações de nitrogênio ótimas, pH ótimo, temperatura ótima e níveis de oxigênio ou dióxido de carbono ótimos. As mudanças nas condições de crescimento podem aumentar a produção de pigmentos e até mesmo reduzir ou eliminar algum composto com efeitos colaterais indesejados como toxinas (DUFOSSE *et al.* 2005).

A presença de certos grupos atômicos favorece a absorção de luz em determinados comprimentos de onda, e produzem assim determinada cor. Estes grupos atômicos são chamados de cromóforos, e podem ser responsáveis pela cor por si só. Alguns cromóforos incluem os grupos azo ( $-N = N-$ ), o grupo nitro ( $-NO_2$ ), sistemas aromáticos, grupos carbonila e duplas e triplas ligações carbono-carbono (OTTERSTÄTTER, 1999). Segundo é a natureza química da molécula e seus grupos cromóforos, assim será a coloração desta (RODRIGUEZ, 2001).

A presença de grupos auxocromos, grupos com pares de elétrons não compartilhados pode acrescentar o efeito da cor, modificando a habilidade do cromóforo para absorver a luz. Se a inserção de um grupo atômico provoca uma modificação da cor na direção de amarelo-vermelho-violeta-azul, o efeito é chamado de efeito batocromo, e, se a direção é inversa, é

chamado efeito hipsocromo. Alguns grupos funcionais na molécula promovem a solubilização dos corantes em água, tal como o grupo  $-\text{SO}_3$  (OTTERSTÄTTER, 1999).

Os corantes naturais podem ser divididos em três grupos principais: os compostos heterocíclicos com estrutura tetra-pirrólica (clorofilas), os compostos de estrutura isoprenóide (carotenoides animais ou vegetais) e os compostos heterocíclicos que contem oxigênio (flavonóides) (INSUMOS, 2009). Dos grupos mais encontrados na natureza estão os carotenoides, os quais desempenham um papel fundamental na dieta humana com seus atos como provitamina e antioxidante (LATHA *et al.*, 2005). São sintetizados por muitos organismos incluindo animais, plantas e microrganismos e absorvem a luz na faixa de 400-550 nm, o que lhes confere a cor desde tons amarelos até tons de vermelhos (MOHAMMADI *et al.*, 2012; NUGRAHENI *et al.*, 2010).

### **Pigmentos nos microrganismos**

A pigmentação é uma característica em comum de bactérias de diferentes origens filogenéticas e ambientais. Há vários grupos de pigmentos bacterianos que estão geralmente ligados de forma não covalente a proteínas. Os complexos pigmento-proteína estão organizados em forma de unidades fotossintéticas e consistem em centros de reações fotossintéticas ou como complexos de captura de luz (GROSSART *et al.*, 2009).

Os pigmentos são sintetizados por alguns microrganismos, a fim de proteger as células contra danos pelo impacto dos raios de luz visível e ultravioleta. Tais pigmentos são sintetizados por vários tipos de microrganismos como metabólitos secundários, e alguns são constituintes do citoplasma bacteriano. Alguns pigmentos são subprodutos metabólicos sintetizados pelos microrganismos em circunstâncias especiais (RASHID *et al.*, 2014).

Pigmentos comumente produzidos como os carotenoides, são antioxidantes que podem proteger contra várias espécies reativas de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e ânions superóxido. Algumas bactérias associadas a plantas sintetizam carotenoides que ajudam a defender contra os efeitos nocivos de espécies reativas de oxigênio geradas pela clorofila durante a fotossíntese. Os carotenoides podem fornecer proteção contra o dano causado pela radiação UV, especificamente proveem proteção no comprimento de onda de 320-400 nm. (MOHAMMADI *et al.*, 2012).

Em estudos realizados foi demonstrado que os metabólitos bacterianos com propriedades antibióticas encontravam-se sempre pigmentados enquanto os não pigmentados

eram inativos (SOLIEV *et al.*, 2011). Estudos também tem reportado que espécies fitopatogênas deficientes em pigmentação apresentam uma redução na virulência nos cultivos, sugerindo que a pigmentação age de forma positiva aumentando a tolerância ao estresse ambiental do microrganismo (KARKI *et al.*, 2012). Em estudos com bactérias marinhas mostrou-se que os pigmentos possuem dois papéis importantes: a adaptação às condições ambientais e de defesa contra predadores. Vários pigmentos bacterianos atuam como antagonistas exibindo atividade antibiótica e antimicrobiana que podem ser considerados um arma poderosa para a sobrevivência e defesa contra outros organismos ou predadores eucariotos (SOLIEV *et al.*, 2011).

A demanda de antibióticos novos é muito grande e está aumentando pela resistência dos patógenos aos antibióticos causando ameaças de infecções. A mudança no padrão de doenças e o aparecimento de cepas bacterianas resistentes faz com que o uso de antibióticos seja contínuo e, portanto, aumenta a demanda por encontrar novos antibióticos como poderia ser o caso dos pigmentos bacterianos (RASHID *et al.*, 2014).

Mesmo conhecendo as fontes promissoras de compostos biologicamente ativos, tais como os pigmentos, os rendimentos para proporcionar material suficiente para desenvolver drogas permanecem sendo variáveis e, as vezes, muito baixos. A principal razão para o baixo rendimento é que estes compostos são metabólitos secundários e a sua produção as vezes depende de mecanismos de “quorumsensing” (SOLIEV *et al.*, 2011).

O “quorumsensing” pode ser definido como a capacidade das bactérias para se comunicar umas com as outras por meio de sinalização química. Em bactérias, a comunicação química envolve a produção, liberação, detecção e resposta a pequenas moléculas de tipo hormônios chamadas auto-indutores. Esta sinalização permite às bactérias monitorar o ambiente de outras bactérias e alterar o comportamento em grande escala populacional em resposta a alterações no número e/ou espécies presentes numa comunidade (WATERS e BASSLER, 2005).

Na natureza podemos observar uma diversidade de animais que apresentam várias cores para distintas finalidades, como por exemplo, as aves que exibem suas coloridas plumagens para atrair ao sexo oposto, o camaleão que adapta sua coloração para a cor do ambiente em torno de si, fazendo da cor um importante meio de camuflagem, e como a coloração brilhante de alguns sapos serve para advertir potenciais predadores, mantendo-os longe. Essas explicações não podem ser utilizadas para explicar por que certos microrganismos são

pigmentados. Devido a não apresentar percepção da cor, podem assumir pressões seletivas evolutivas por trás da aquisição desses pigmentos que, promovem a sobrevivência (LIU; NIZET, 2009).

Com os avanços na biotecnologia, os pesquisadores contemporâneos estão dedicados a estudar as bases moleculares e genéticas da coloração microbiana. Pesquisas utilizando pigmentos purificados ou mutantes isogênicos com pigmentação alterada começaram a revelar o papel destas moléculas no patógeno dentro do ambiente hospedeiro e quais são as alterações nas células hospedeiras e a resposta imunológica (LIU; NIZET, 2009).

### **Fatores que influenciam na produção de pigmentos**

Vários estudos têm testado as fontes nutricionais na obtenção de pigmentos por microrganismos. Distintas fontes de carbono, nitrogênio, até mesmo a relação C/N, e concentração de sais no meio são fatores que tem demonstrado afetar de forma positiva ou negativa a produção de pigmentos. Um dos fatores ambientais mais importantes no crescimento e desenvolvimento dos microrganismos é a temperatura, causando alterações nas vias biossintéticas (KUMAR *et al.* 2015; VALDUGA *et al.*, 2009). Estudos tem encontrado que a temperatura pode exercer controle na concentração ou mudanças enzimáticas que estão diretamente relacionadas com a produção dos pigmentos. O pH do meio de cultura também é um dos parâmetros físicos ou ambientais de maior importância, exercendo influencia no crescimento celular e na formação do produto. Alguns autores indicam que as condições ótimas para a produção de pigmentos, como o caso dos carotenoides, não são as mesmas que para o crescimento celular (VALDUGA *et al.*, 2009).

Com relação à luminosidade, esta pode ser avaliada desde o ponto de vista que o efeito da luz exerce um papel fundamental sobre o crescimento do microrganismo estimulando a produção dos pigmentos, ou simplesmente a acumulação destes na célula se encontra associado com o aumento da atividade das enzimas responsáveis da síntese de pigmentos. A taxa de arejamento para a oxigenação é também um fator que influi diretamente com os rendimentos na produção dos metabolitos de interesse (KUMAR *et al.* 2015; VALDUGA *et al.*, 2009).

### 3. OBJETIVOS

#### **Geral**

Avaliar o efeito de parâmetros de crescimento de três bactérias isoladas de solos amazônicos (*Serratia marcescens*, *Microbacterium* sp. e *Burkholderia* sp.) na produção de pigmentos e biomassa.

#### **Específicos**

- Avaliar a influência de distintas fontes de carbono no crescimento celular e na produção de pigmentos.
- Avaliar a influência de distintas fontes de nitrogênio no crescimento celular e na produção de pigmentos.
- Avaliar a influência da temperatura no crescimento celular e na produção de pigmentos.
- Avaliar a influência do pH no crescimento celular e na produção de pigmentos.

**CAPITULO I**

**Efeito de parâmetros nutricionais e físicos no crescimento celular e produção de pigmento por *Serratia marcescens* isolada de nódulo de leguminosa**

Efeito de parâmetros nutricionais e físicos no crescimento celular e produção de pigmento por *Serratia marcescens* isolada de nódulo de leguminosa

Ana C. Monroy<sup>1</sup>, Luiz A. Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-Brasil. <sup>2</sup> Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus-Brasil.

## Resumo

Atualmente o interesse nos pigmentos produzidos por microrganismos tem aumentado pelas várias propriedades que eles possuem. *Serratia marcescens* é uma das espécies que produzem a prodigiosina e as suas isoformas, pigmentos de coloração vermelha com características de interesse na área farmacêutica, alimentar e têxtil. No presente trabalho objetivou-se testar distintos parâmetros de crescimento, identificando aqueles que influenciam de forma positiva no crescimento celular e produção do pigmento, de uma espécie de *Serratia* isolada de nódulo de leguminosa. Os testes foram realizados por meio de fermentação submersa em caldo nutritivo selecionado como meio base, testando distintas fontes de carbono, nitrogênio, temperaturas e pH. Foram retiradas amostras cada 24, 48 e 72h, medindo o crescimento celular por meio de OD (densidade óptica) a 600nm, e a produção do pigmento através da extração com metanol e a leitura da OD a 470nm. Concluiu-se que a produção do pigmento foi favorecida pelo uso de amido solúvel, como fonte de carbono, extrato de malte como fonte de nitrogênio, em uma temperatura de 25°C e um pH de 8 no meio de cultura base. Foi comprovado que nem sempre os melhores parâmetros para o crescimento celular são os mais favoráveis para a produção do pigmento. Estes resultados podem ser utilizados para obter melhores rendimentos na produção do pigmento de interesse.

Palavras chaves: Amazônia, biopigmento, metabolismo microbiano.

## 1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Serratia marcescens*, bacilo gram-negativo que pertence à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbio facultativo, quimiorganotrófico que pode ou não apresentar mobilidade (LAPENDA, 2010). Espécies do gênero *Serratia* se encontram amplamente distribuídas no ar, solo, água incluindo plantas e animais. É uma das causas importantes e comuns de infecções nosocomiais, sendo mais frequentes nos isolados clínicos, as estirpes não pigmentadas. A maior parte dos biótipos de *S. marcescens* pigmentados é encontrada em ambientes naturais e raramente são responsáveis por surtos (CARBONELL *et al.* 2000; HEJAZI e FALINER, 1997; RYAZANTSEVA *et al.* 2012).

Espécies como *S. marcescens* são capazes de produzir diferentes produtos extracelulares como enzimas e metabolitos secundários tais como a produção de pigmentos vermelhos (CARBONELL *et al.* 2000; ZANG *et al.* 2014). Os pigmentos naturais de coloração vermelha têm sido encontrados na biomassa de algumas espécies de *Pseudomonas*, *Serratia* e *Streptomyces*. Um dos pigmentos produzidos é a prodigiosina e suas isoformas, como a undecilprodigiosina, metacicloprodigiosina, nonilprodigiosina, norprodigiosina e rosefilina. Estudos tem demonstrado que tais compostos possuem propriedades bactericida, antitumoral, antifúngica, antimalárica, inseticida, antioxidante e atividade imunossupressora pela indução da apoptose em linfócitos T y B (KURBANOGLU *et al.* 2015; ZANG *et al.* 2014; LAPENDA 2010).

Diferentes estudos tem mostrado como as mudanças nas condições de crescimento das bactérias podem alterar a produção do pigmento e o crescimento celular. Distintos fatores nutricionais e físicos foram testados para o melhoramento da produção de pigmentos, como a prodigiosina, tais como: oxigênio dissolvido, pH, iluminação, temperatura e fontes de carbono, nitrogênio ou ácidos graxos como fontes de energia (GULANI *et al.*, 2012; KURBANOGLU *et al.*, 2015; WEI e CHEN, 2005; ZANG *et al.*, 2014).

Considerando as abundantes atividades biológicas apresentadas pela prodigiosina e as suas isoformas, o presente trabalho visou identificar os fatores que influenciam de forma positiva no crescimento e a produção do pigmento de *S. marcescens* isolada de nódulo de leguminosa.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

A espécie de *Serratia* utilizada no estudo foi obtida da coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos da Amazônia (LEBMAM) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). A bactéria foi isolada de nódulo de *Pueraria phaseoloides*. Devido á coloração vermelha brilhante que apresentou no meio de cultura utilizado para o isolamento, foi selecionada pelo potencial para produzir pigmento.

### **2.1 Crescimento da bactéria em meio líquido**

Foi usado como meio de crescimento base, o caldo nutritivo, contendo 2,5g peptona, 2,5g extrato de levedura e 1,25g de NaCl. Antes de cada teste foi preparado um pré-cultivo da bactéria em 50 mL de meio, com agitação a 120 rpm, durante 24h a temperatura ambiente de laboratório (26-28°C). Utilizando o pré-cultivo, foi preparada uma solução matriz com uma concentração celular equivalente a um McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^3$  células por mL), da qual foram retiradas alíquotas de 1 mL e distribuídas nos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio. Para cada teste foi realizado um delineamento com quatro repetições, tomando alíquotas a cada 24, 48 e 72 horas para as avaliações de crescimento celular e produção do pigmento. Foram testadas diferentes fontes de carbono, nitrogênio, diferentes temperaturas e pHs.

### **2.2 Teste de fontes de carbono**

Foram avaliadas quatro fontes de carbono (5g/L meio): sacarose, glicose, amido solúvel e lactose. As fontes de carbono foram adicionadas ao meio de cultura de forma separada, previamente esterilizadas por filtração (0,2 $\mu$ ). Foi inoculado 1 mL da solução matriz preparada em cada erlenmeyer, com agitação a 120 rpm, à temperatura ambiente de laboratório (26-28°C), retirando alíquotas nos tempos estabelecidos para os testes posteriores.

### **2.3 Test de fontes de nitrogênio**

Foram avaliadas cinco fontes de nitrogênio (2,5g/L meio): cloreto de amônio, sulfato de amônio, extrato de levedura, ureia e nitrato de sódio. O meio de cultura base foi modificado substituindo o extrato de levedura pelas outras fontes de nitrogênio mencionadas, com a mesma proporção. As condições de crescimento seguiram a determinação da metodologia anterior.

## **2.4 Teste de temperaturas**

Foram avaliadas cinco temperaturas: 20, 25, 30, 35 e 40°C. Para este teste foi utilizado o caldo nutritivo sem modificações (2,5g peptona, 2,5g extrato de levedura e 1,25g de NaCl), em seguida procedeu-se à agitação das amostras a 120rpm em um shaker com temperatura controlada (Thermo Scientific MaxQ6000), tomando alíquotas nos tempos anteriormente estabelecidos.

## **2.5 Teste de pH**

Foram testados cinco pHs: 6, 7, 8, 9 e 10. O pH do caldo nutritivo (2,5g peptona, 2,5g extrato de levedura e 1,25g de NaCl) foi modificado adicionando NaOH 0,1M e HCl 0,1M antes de ser esterilizado. As condições de crescimento foram as mesmas das metodologias anteriores.

## **2.6 Extração e quantificação do pigmento**

Para cada um dos testes foram recolhidas alíquotas de 4 mL e colocadas em tubos falcon de 15 mL cada 24, 48 e 72 horas. As amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5430) a 7600 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 4 mL de metanol (99%) utilizando o sonicador de ponta (Hielscher UP200Ht) durante 4 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas durante 8 minutos a 7600rpm, e o sobrenadante obtido foi recuperado para a posterior quantificação do pigmento. O pigmento extraído com o metanol foi quantificado utilizando o espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 470nm (comprimento de onda encontrado como máximo para o extrato metanólico trabalhado). Como branco foi utilizado o mesmo solvente.

## **2.7 Avaliação do crescimento celular**

Para cada um dos testes foram retiradas alíquotas de 1 mL e colocadas em micro tubos de 1,5 mL cada 24, 48 e 72 horas. O crescimento celular foi medido por meio da OD (densidade óptica) utilizando o espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 600nm.

## **2.8 Identificação molecular**

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit de extração Purelink Invitrogen. Foi amplificada a região 16S rRNA seguindo o procedimento do Borneman e Triplett (1997), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: 530F (5' - TGA CTG ACT GAG TGC CAG

CMG CCG CGG - 3') e 1492R (5' - TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT - 3'). Como controle de teste, foi utilizado o DNA bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922. O sistema de amplificação foi realizado em termociclador Biocycle, e o perfil térmico do PCR foi: um ciclo inicial a 95°C/2 minutos, 35 ciclos a 95°C/40s, 60°C/40s e 72°C/2 e finalmente um ciclo de extensão a 72°C/5 min. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% para a verificação dos fragmentos. O produto do PCR foi purificado utilizando polietilenoglicol 20% (NaCl 2,5M, PEG 20%) e quantificado em gel de agarose 0,8%. A amostra foi sequenciada (ABI 3130- Applied Biosystems DNA sequence) e a sequência obtida foi editada e avaliada utilizando o programa PHRED disponível no endereço (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). Após a obtenção das sequências F (forward) e R (reverse), foi realizado alinhamento comparativo no banco de dados de genomas bacterianos depositados no "GeneBank" utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) (SHAEFFER *et al.* 2001) do "National Center for Biotechnology Information"(NCBI) e também foram comparadas com o banco de dados do "Ribossomal Database Project"(RDP).

## 2.9 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas com quatro repetições. Para os dados foi submetida análise de variância, e as médias dos resultados comparados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram avaliados no programa *Assistat 7.7 Beta*

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho centrou-se na avaliação de distintas fontes nutricionais e fatores físicos que podem influenciar no crescimento e produção do pigmento. O crescimento celular da bactéria foi monitorado por meio de medições da OD a 600nm, e a produção do pigmento a 470nm. Como tem sido reportado em outros estudos, a produção de pigmento das espécies de *Serratia* encontra-se diretamente relacionado com a composição do meio de cultura (ZANG *et al.* 2014) Os pigmentos produzidos por *S. marcescens* podem sofrer alterações de cor dependendo do pH do meio. Segundo Guimarães (2011), em pH ácido o pigmento pode apresentar uma cor vermelho intenso que pode ter absorvância máxima de 537nm e em meios alcalinos a pigmentação pode variar de laranja a amarelo com absorvância máxima em 470nm, como foi evidenciado na pesquisa.

A análise de sequência, utilizando “GeneBank” da ferramenta BLAST, revelou que o isolado pertence a o gênero *Serratia*, apresentando uma porcentagem de similaridade no rDNA 16S do 99% com *Serratia marcescens* WW4, e 99% com *Serratia marcescens* subsp sakuensis KRED.

### 3.1 Efeito das fontes de carbono

Como pode ser observado na Figura 1, *S. marcescens* apresentou melhor crescimento celular utilizando sacarose e glicose como fontes de carbono, demonstrando diferença significativa quando comparado ao crescimento celular utilizando as outras fontes de carbono. No entanto, para a produção de pigmento, a bactéria apresentou maior produção utilizando o amido solúvel, mostrando diferença significativa frente às outras fontes utilizadas (Figura 2). Apesar da glicose ser a fonte de carbono comumente utilizada, estudos tem identificado um efeito de inibição da produção dos pigmentos produzidos por espécies de *Serratia* (ZANG *et al.* 2014; WEI e CHEN 2005). Utilizando a glicose como fonte de carbono na *S. marcescens* MO-1, Kurbanoglu *et al.* (2015) verificaram que a produção de prodigiosina diminuiu significativamente. O meio de cultura que contem glicose como fonte de energia não permite a síntese de prodigiosina devido a diminuição do pH do meio ou impedimento de sínteses de certos catabolitos (KURBANOGLU *et al.* 2015; HEJAZI e FALKINER 1997). Conforme o trabalho de Zang *et al.* (2014), a fonte de carbono que mostrou os melhores resultados, tanto para o crescimento celular quanto para a produção do pigmento de *S. marcescens* foi a sacarose.

Observou-se que a melhor fonte de carbono na produção do pigmento não mostrou os mesmos rendimentos para o crescimento celular. Os resultados demonstram que quantidade do pigmento produzido é independente da quantidade de células. Resultados similares foram demonstrados por Wei e Chen (2005) utilizando uma espécie geneticamente modificada de *Serratia* (*S. marcescens* SMΔR) testando diferentes concentrações de componentes no meio Luria Bertani (LB). Contudo, na pesquisa realizada por Ryazantseva *et al.* (2012), foi comprovado que a taxa de biossíntese do pigmento analisado, foi aproximadamente igual à taxa de crescimento bacteriano.

Diferentes estudos tem sido realizados com outras fontes de carbono para a otimização da produção da prodigiosina. No trabalho de Gulani *et al.* (2012), a máxima

produção do pigmento foi obtida na presença de maltose, seguido pela lactose, fructose, sacarose e manitol. Sundaramoorthy *et al.* (2009) avaliaram as condições de crescimento de *Serratia marcescens* NY1 e obtiveram os melhores rendimentos na produção de pigmento utilizando a maltose como fonte de carbono. Uma pigmentação moderada foi obtida com a lactose e sacarose, e a produção mais baixa com a glicose.

O amido é o polissacarídeo mais importante de reserva vegetal, e tendo cerca de 2.000.000 unidades de glicose, é uma das maiores moléculas encontradas na natureza (GUIMARÃES, 2011). Evidenciado que a fonte de carbono com melhores rendimentos para a produção de pigmento foi o amido solúvel, sugere-se que outras fontes de carbono complexas, com menores custos ou resíduos industriais, podem ser utilizados para produzir o pigmento de interesse. Constatou-se que a maior quantidade do pigmento foi produzida às 24h de crescimento, demonstrando diferença significativa em relação aos outros tempos. Um fator importante é o tempo que a bactéria leva para sintetizar o composto, possibilitando a praticidade de um planejamento em grande escala, levando em consideração o tempo relativamente curto na produção.

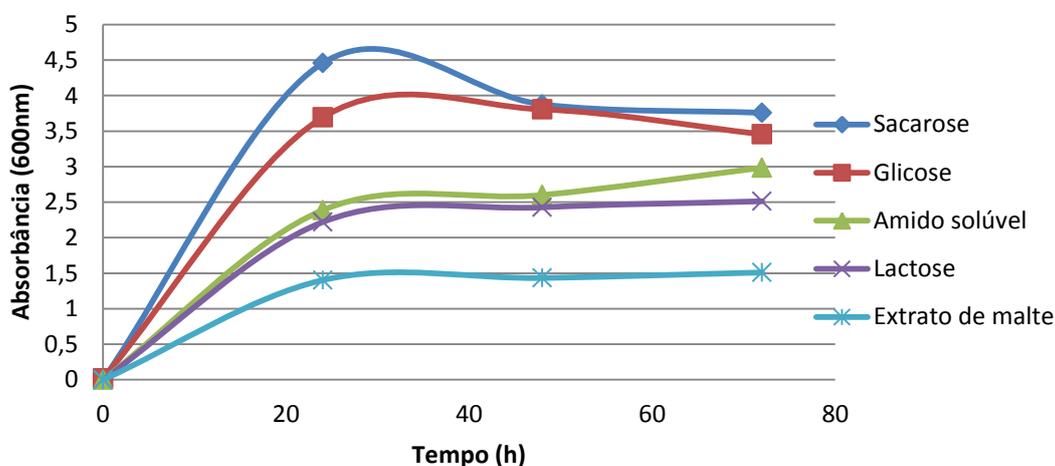


Figura 1. Efeito das fontes de carbono no crescimento celular de *Serratia marcescens*.

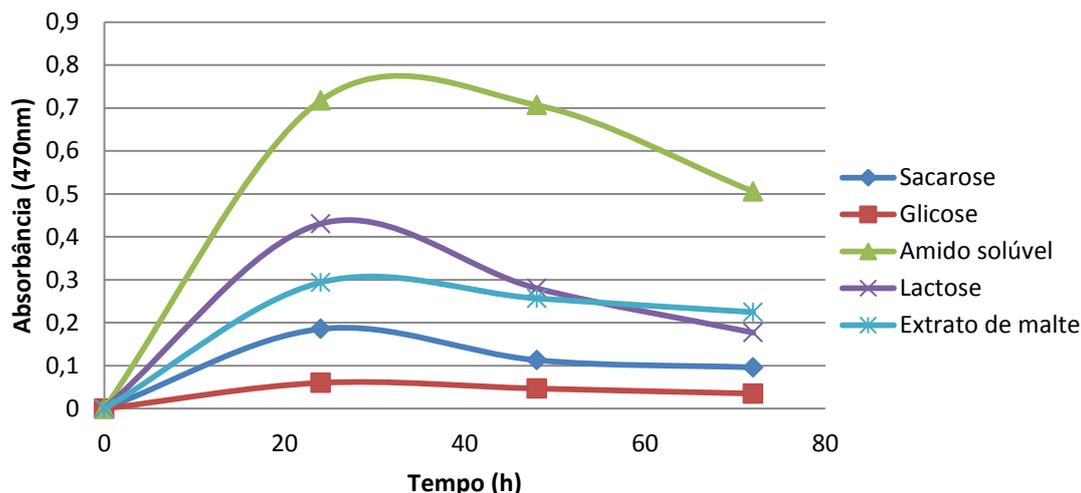


Figura 2. Efeito das fontes de carbono na produção de pigmento de *Serratia marcescens*.

### 3.2 Efeito das fontes de nitrogênio

Com a finalidade de testar diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e produção de pigmento, o extrato de levedura do meio de cultura base foi substituído por outras cinco fontes. O teste identificou que a fonte de nitrogênio mais relevante foi o extrato de levedura para ambos os parâmetros avaliados, às 24h de crescimento da bactéria como demonstrado nas Figuras 3 e 4 Houve diferença significativa no crescimento celular e produção do pigmento utilizando extrato de levedura quando comparado às outras fontes testadas. O extrato de levedura é um composto celular considerado como ótima fonte de proteínas, nucleotídeos livres e vitaminas (SILVA, 2006). O extrato de levedura possui a vantagem de ser um material de custo baixo e facilmente encontrado no mercado, e junto com o fato de ser rico em nutrientes fornece uma fonte ótima para a produção de pigmentos, como foi o caso da *S. marcescens* estudada (RABELO *et al.*, 2009)

Com resultados inferiores, o cloreto de amônio e sulfato de amônio não mostraram diferença significativa para a o crescimento celular. No entanto, quando comparados quanto às médias da produção de pigmento, o uso do cloreto de amônio foi melhor. Fontes inorgânicas de nitrogênio, em especial os sais de amônia (cloreto de amônio, sulfato de amônio e até ureia) inibem a produção de pigmento devido ao comportamento químico do amônio como doador fraco de nitrogênio, como foi demonstrado na pesquisa de Kurbanoglu *et al.* (2015).

Os resultados concluem que no meio suplementado com a ureia e nitrato de sódio, *S. marcescens* não produziu pigmento (Figura 4). Contudo, utilizando o meio com sais de amônio, os resultados demonstraram crescimento e produção de pigmento em quantidades limitadas. Resultados diferentes foram obtidos por Gulani *et al.* (2012), onde o máximo de pigmentação foi na presença de peptona e a síntese do pigmento foi mais lenta no meio suplementado com ureia e oxalato de amônio. No meio suplementado com sais de amônio, como cloreto de amônio e sulfato de amônio, os autores concluíram que a bactéria não conseguiu crescer.

Zang *et al.* (2014) testaram várias combinações de compostos no meio de cultura e reportaram o melhor crescimento celular e produção de pigmento com a combinação de peptona e extrato de levedura. Devido aos efeitos positivos observados ao utilizar a peptona e o extrato de levedura no meio de cultura, o caldo nutritivo foi selecionado como meio base para o crescimento e produção do pigmento da espécie trabalhada, o que coincide com o resultado do trabalho mencionado anteriormente.

A busca por alternativas de fontes orgânicas de nitrogênio de baixo custo, com potencial de resposta na produção de pigmento por *S. marcescens*, tem motivado estudos como Kurbanoglu *et al.* (2015) que testaram fontes de peptona provenientes de chifre de carneiro. Para os autores, a peptona de chifre de carneiro é uma fonte rica em nutrientes tanto orgânicos quanto inorgânicos e aminoácidos, demonstrando um rendimento na produção do pigmento sete vezes maior (com a dose adequada) quando comparado com um meio base composto de extrato de levedura e manitol (KURBANOGLU *et al.* 2015).

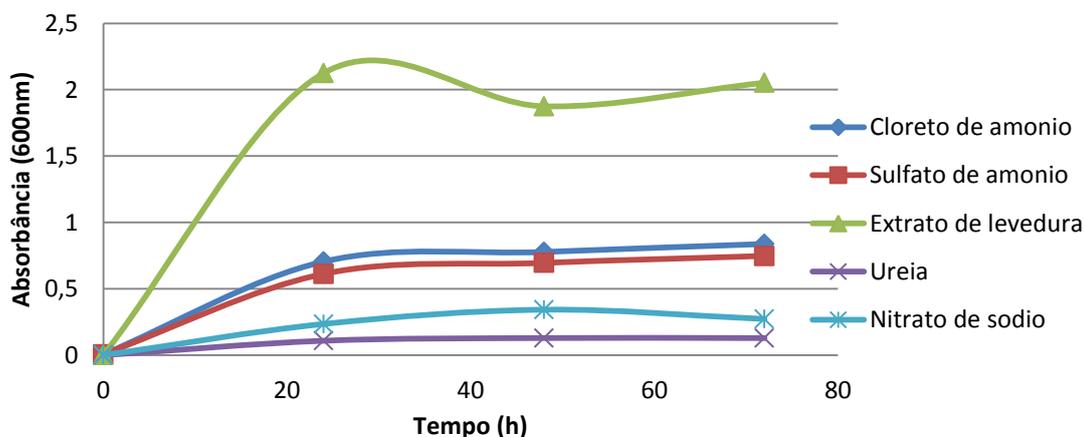


Figura 3. Efeito das fontes de nitrogênio no crescimento celular de *Serratia marcescens*.

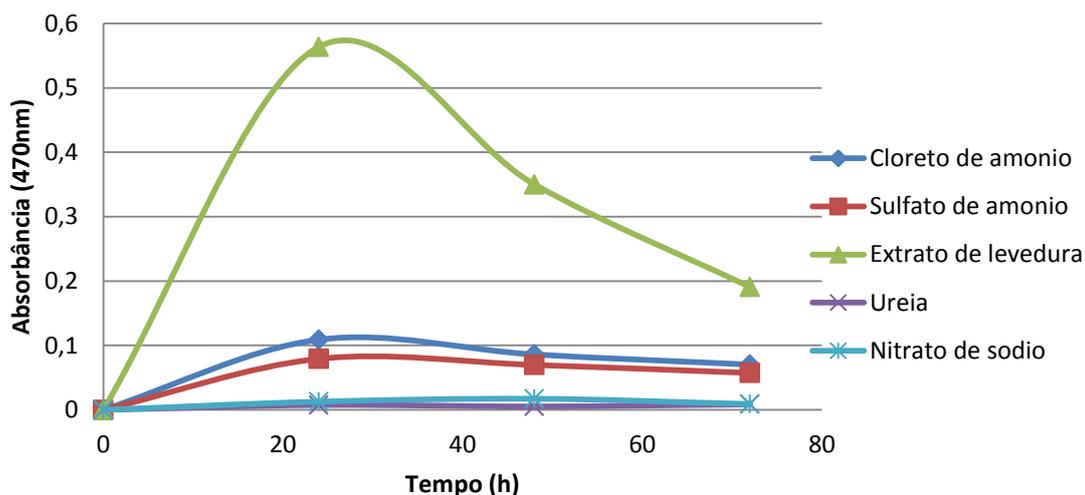


Figura 4. Efeito das fontes de nitrogênio na produção de pigmento de *Serratia marcescens*.

### 3.3 Efeito da temperatura

Para determinar o efeito de parâmetros físicos no crescimento e produção do pigmento, *S. marcescens* foi cultivada sob várias temperaturas usando o meio de cultura base. A temperatura ótima de crescimento e produção do pigmento foi a 25°C, confirmando diferença significativa com relação às outras temperaturas testadas, às 24h de crescimento (Figuras 5 e 6). A bactéria apresentou crescimento em todas as temperaturas testadas, porém, a produção do pigmento foi quase nula em temperaturas inferiores a 25°C e maiores a 30°C como pode ser observado na figura 6.

Giri *et al.* (2004) testaram diferentes meios de cultura em três temperaturas para analisar a produção de prodigiosina, sendo a produção máxima a 28°C e 30°C em caldo nutritivo. Segundo Wei e Chen (2005), a produção de pigmentos como a prodigiosina em *S. marcescens*, pode ser inibida em temperaturas acima de 37°C. No meio de cultura sintético utilizado por Gulani *et al.* (2012), composto de maltose, peptona, NaCl e glicerol, a produção máxima do pigmento por *S. marcescens* foi obtida a 25°C. Segundo Gulani *et al.* (2012), a biossíntese da prodigiosina e outros pigmentos similares ocorreu em uma faixa estreita com produção máxima entre 24 e 28°C, embora a bactéria apresentasse crescimento em uma faixa ampla de temperaturas, sendo os resultados compatíveis com os obtidos neste estudo. O mesmo estudo mencionado reportou um bloqueio na produção do pigmento quando a bactéria foi incubada a 35°C ou acima dessa temperatura (GULANI *et al.* 2012).

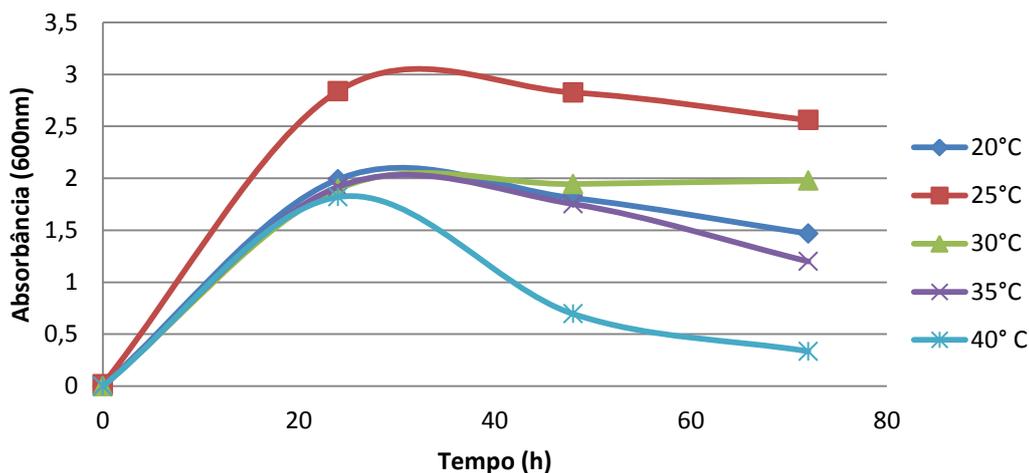


Figura 5 Efeito da temperatura no crescimento celular de *Serratia marcescens*.

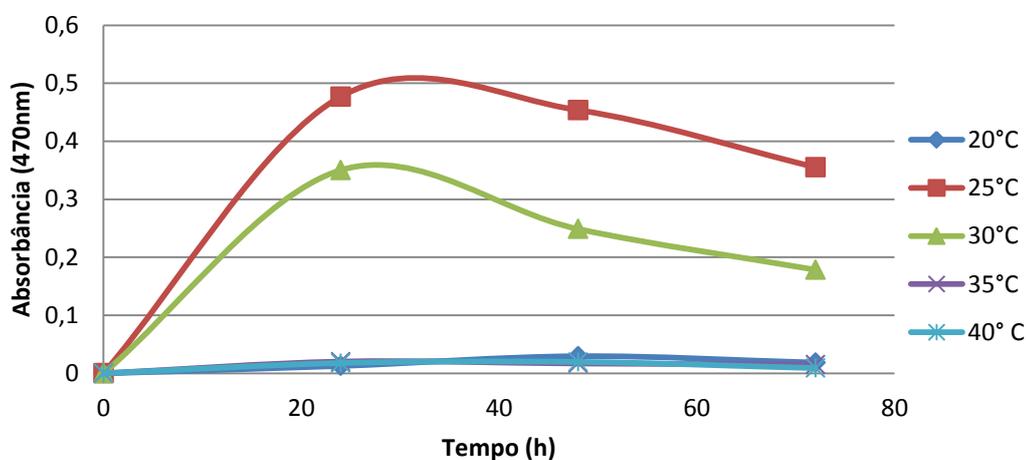


Figura 6 Efeito da temperatura na produção de pigmento de *Serratia marcescens*.

### 3.4 Efeito do pH

Outro parâmetro físico avaliado foi o pH, e no teste desenvolvido, *S. marcescens* apresentou melhores resultados quando o pH do meio de cultura foi entre 7 e 8 para o crescimento celular. Para a produção do pigmento, o pH 8 teve a melhor resposta, comprovando diferença significativa em relação aos outros pHs testados (Figura 8).

O pH do meio desempenha um trabalho crucial na síntese de metabólitos secundários e portanto, afeta a biossíntese dos pigmentos. O máximo rendimento na produção da prodigiosina foi observado no pH 7, segundo as pesquisas de Gulani *et al.* (2012) e Sundaramoorthy *et al.* (2009). Estudos tem corroborado que ao diminuir o pH pode ocorrer inibição na síntese de prodigiosina devido à repressão catabólica que ocorre (Wei e Chen, 2005). Solé *et al.* (1997) mostraram que existe uma correlação entre a inibição na produção

da prodigiosina e o tempo no qual a bactéria é submetida a um pH baixo, efeito inibitório que pode ser modificado mediante o uso de soluções tampão no meio de cultura.

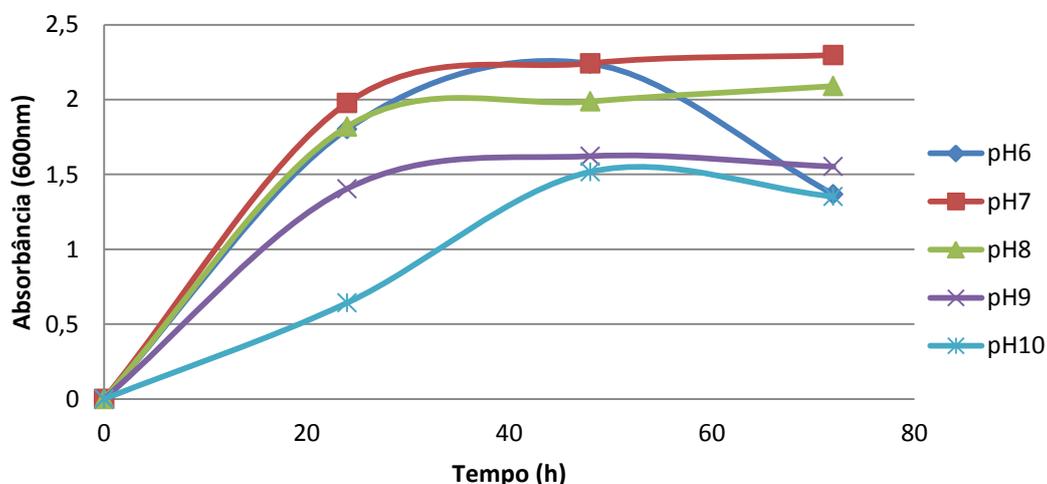


Figura 7. Efeito do pH no crescimento celular de *Serratia marcescens*.

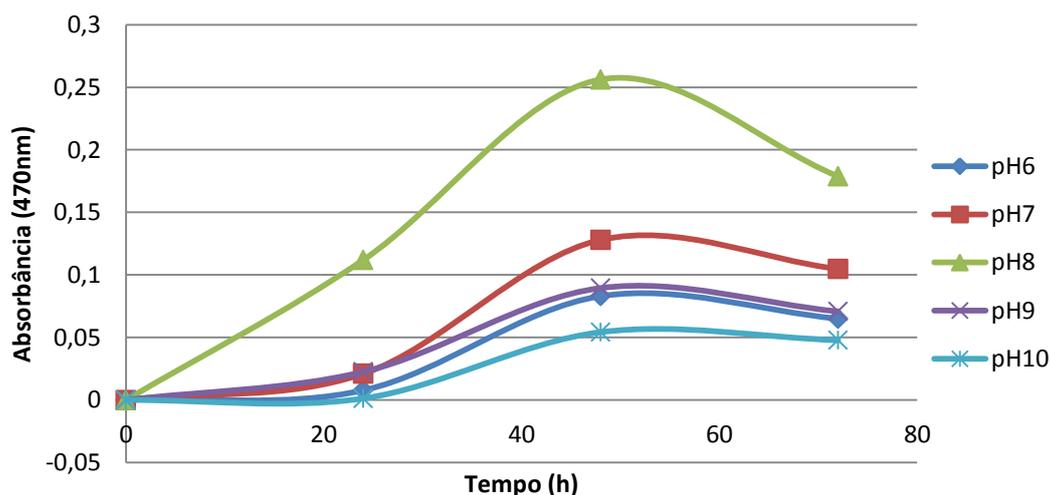


Figura 8. Efeito da temperatura na produção de pigmento de *Serratia marcescens*.

Devido às limitações da pesquisa, um fator importante a ser analisado em futuros trabalhos sobre a produção dos pigmentos, produzidos por *S. marcescens* é a concentração de NaCl no meio de cultura. Para este estudo, foi identificada inicialmente a quantidade de NaCl adequada para desenvolver os testes de análise de crescimento e produção do pigmento. No estudo de Wei e Chen (2005), foram feitas modificações no meio base Luria Bertani, com a melhor produção do pigmento ocorrendo quando foi retirado o NaCl do meio de cultura. Por outro lado, a ausência de NaCl não afetou o crescimento celular, porém aumentou a produção da prodigiosina, sugerindo que o NaCl pode ser um inibidor do metabolismo da prodigiosina.

Estudos tem mostrado que o NaCl pode inibir a rota metabólica da biossíntese do monopirrol e o bipirrol, que são os precursores da prodigiosina, além de inibir a atividade de uma enzima necessária para ativar um passo terminal na produção de prodigiosina (WEI e CHEN, 2005).

Outros estudos tem demonstrado que a produção do pigmento vermelho pode ser bloqueada quando a sua quantidade atinge uma concentração específica, observando que a acumulação do pigmento consegue inibir a produção posterior (CHANG-HO *et al.*, 1999).



Figura 9. Produção do pigmento por *Serratia marcescens* em placa com meio LB (esquerda). Extrato metanólico do pigmento (direita).

#### 4. CONCLUSÕES

Os testes desenvolvidos foram capazes de determinar que compostos nutricionais e fatores físicos, envolvidos no crescimento da espécie de *S. marcescens*, podem influenciar de forma positiva ou negativa na biomassa e na produção do pigmento.

A maior produção de biomassa foi obtida utilizando sacarose e glicose como fontes de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, em uma temperatura de 25°C e um pH que pode variar entre 7 e 8.

Os parâmetros de crescimento que influenciaram de forma positiva na produção do pigmento foram o amido solúvel como fonte de carbono, o extrato de levedura como fonte de nitrogênio, a uma temperatura de 25°C e com um pH 8 no meio de cultura.

## 5. REFERÊNCIAS

CARBONELL C. V. *et al.* Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. FEMS Immunology and medical microbiology. v. 28. 2000. p. 143-149.

CHANG-HO K., SEUNG-WOOK K. e SUK-IN H. An integrated fermentation-separation process for the production of red pigment by *Serratia sp.* KH-95. Process Biochemistry. v. 35. 1999. p. 485-490.

GIRI A. V. *et al.* A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. BioMed Central. v. 4. 2004.

GUIMARÃES de Oliveira L. Metabolismo do amido em ruminates. Seminario aplicado-Escola de Veterinaria, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011. 23 p.

GULANI C., BHATTACHARYA S. e DAS A. Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidante and dyeing potentials. Malaysian journal of microbiology. v. 8. n. 2. 2012. p. 116-122.

HEJAZI A. e FALKINER F. R. *Serratia marcescens*. Journal of medical microbiology. v. 46. 1997. p. 903-912.

KURBANOGLU E. B. *et al.* Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. Brazilian Journal of microbiology. v. 46. n. 2. 2015. p. 631-637.

LAPENDA Jeanne Cristina. Produção e caracterização de prodigiosina isolada de *Serratia marcescens* UCP 1549. Dissertação programa de Pós-graduação em ciências biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. 2010. p. 43

RABELO C. A. *et al.* Uso de extrato de levedura como fonte de carbon e de mediadores redox, para a degradação anaeróbica de corante azo. Engenharia sanitaria y ambiental. v. 14. n. 4. 2009. p. 559-568.

RYAZANTSEVA I. N. *et al.* Response of pigmented *Serratia marcescens* to the illumination. Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. v. 106. 2012. p. 18-23.

SILVA Vanessa. Extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e prebiótico na dieta pré-inicial para frangos de corte criados em diferentes temperaturas. Dissertação de mestrado da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita filho”. Jaboticabal-São Paulo. 2006. p. 151.

SOLÉ M. *et al.* The role of pH in the ‘glucose effect’ on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. Letters in applied microbiology. v. 25. 1997. p. 81-84

SUNDARAMOORTHY N., YOGESH P. e DHANDAPANI R. Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. Indian journal of science and technology. v. 2. n. 10. 2009. p. 32-34.

WEI Y. e CHEN W. Enhanced production of prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMΔR by medium improvement and oil-supplementation strategies. Journal of bioscience and bioengineering. v. 99. n. 6. 2005. p. 616-622.

ZANG *et al.* Identification and enhanced production of prodigiosin isoform pigment from *Serratia marcescens* N10612. Journal of the Taiwan Institute of chemical engineers. v. 45. 2014. p. 1133-1139.

**CAPITULO 2**

**Efeito de parâmetros nutricionais e físicos no crescimento celular e produção de pigmento amarelo por *Microbacterium* sp. isolada de nódulo de leguminosa**

Efeito de parâmetros nutricionais e físicos no crescimento celular e produção de pigmento amarelo por *Microbacterium* sp. isolada de nódulo de leguminosa

Ana C. Monroy<sup>1</sup>, Luiz A. Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-Brasil.* <sup>2</sup> *Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus-Brasil.*

### Resumo

A indústria biotecnológica tem crescido muito na área de produção de metabolitos primários por bactérias, leveduras e fungos filamentosos para a obtenção de produtos como álcoois, aminoácidos, enzimas e vitaminas. Porém, o mercado é muito amplo para os metabolitos secundários produzidos por estes microrganismos, entre os quais encontramos produção de antibióticos, toxinas, pigmentos entre outros. A maioria dos membros da família *Microbacteriaceae* produzem pigmentos laranja, vermelho, e amarelo sendo determinados por compostos e estruturas diferentes, que vários estudos realizados têm descrito como carotenoides, compostos amplamente trabalhados nas distintas áreas da indústria. Este trabalho objetivou avaliar distintos fatores de crescimento, detectando os efeitos no crescimento celular e produção do pigmento por uma espécie de *Microbacterium* isolada de nódulo de planta. Os testes foram realizados por meio de crescimento em caldo nutritivo selecionado como meio base, testando distintas fontes de carbono, nitrogênio, temperaturas e pH. Amostras foram retiradas cada 24, 48 e 72h, medindo o crescimento celular por meio de OD (densidade optica) a 600nm, e a produção do pigmento através da extração com etanol e a leitura da OD a 440nm. A bactéria isolada mostrou maior produção do pigmento quando o amido soluvel foi utilizado como fonte de carbono, o extrato de levedura como fonte de nitrogênio, em uma faixa entre 20-30°C, e um pH entre 6 e 9. Estes dados podem ser utilizados como base para otimizar a produção do pigmento amarelo produzido pela bactéria isolada.

Palavras chaves: Amazônia, metabolismo microbiano, biopigmentos.

## 1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Microbacterium* são bactérias cocos Gram-positivo, não formadoras de esporas, raramente associadas com doenças humanas. Noventa e seis espécies de *Microbacterium* têm sido descritas (“List of prokaryotic names with standing in nomenclature”, [www.bacterio.net](http://www.bacterio.net) acessado em março 2016) sendo associadas comumente com solo, plantas, produtos animais, água e insetos (BUSS; STARLIN; IWEN, 2014). É reconhecido que as microbacterias não são encontradas frequentemente como patógenos em espécimes clínicos humanos (GNEIDING *et al.*, 2008).

A maioria dos membros da família *Microbacteriaceae* produzem pigmentos laranja, vermelho, amarelo claro e amarelo com tonalidade branca sendo determinados por isoprenoides (carotenoides), quinonas, prodigiosina e derivados da antraciclina, fenazinas e outros compostos heterocíclicos (GODINHO e BHOSLE, 2008; TRUTKO *et al.*, 2005). Diferentes estudos tem demonstrado que o gênero *Microbacterium* é caracterizado pela produção de carotenoides. Esses pigmentos podem formar parte integral da estrutura da membrana de uma gama de microrganismos mesófilos e termófilos, influenciando na fluidez da membrana, o que aumenta a rigidez e força mecânica. Tem sugerido que a presença de carotenoides pode alterar a permeabilidade da membrana como uma barreira à água, oxigênio e outras moléculas (GODINHO e BHOSLE, 2008).

A natureza química dos pigmentos tem sido investigada apenas em alguns grupos taxonômicos, e particularmente, poucos trabalhos têm abordado a produção de biocorantes por *Microbacterium*. Em alguns casos, as características dos espectros dos pigmentos podem ser utilizadas para diferenciar os gêneros da família *Microbacteriaceae* (TRUTKO *et al.*, 2005).

Estudos têm testado distintas condições de crescimento com relação à produção de bioemulsificante por *Microbacterium*, no entanto, poucos trabalhos foram encontrados sobre avaliações de fatores de crescimento no desempenho da produção do pigmento (ANISZEWSKI *et al.*, 2010; GNEIDING *et al.*, 2008). O estudo objetivou avaliar distintos fatores nutricionais e físicos no crescimento celular e produção do pigmento de uma espécie bacteriana do gênero *Microbacterium*, isolada de nódulo de leguminosa.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A espécie de *Microbacterium* utilizada no estudo foi obtida da coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos da Amazônia (LEBMAM) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). A bactéria foi isolada de nódulo de *Pueraria phaseoloides*.

### 2.1 Crescimento da bactéria em meio líquido

Foi usado um meio de crescimento base, o caldo nutritivo (2,5g peptone, 2,5g extrato de levedura e 1,25g de NaCl). Antes de cada teste foi preparado um pré-cultivo da bactéria em 50 mL de meio, com agitação a 120 rpm, durante 24h a temperatura ambiente de laboratório (26-28°C). Utilizando o pré-cultivo foi preparada uma solução matriz com uma concentração celular equivalente a um McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^3$  células por mL), da qual eram retiradas alíquotas de 1 mL e distribuídas nos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio. Para cada testes foi realizado um delineamento com quatro repetições, tomando alíquotas a cada 24, 48 e 72 horas para as avaliações de crescimento celular e produção de pigmento. Foram testadas diferentes fontes de carbono, nitrogênio, temperaturas e pH.

### 2.2 Teste de fontes de carbono

Foram avaliadas quatro fontes de carbono (5g/L meio): sacarose, glicose, amido solúvel e lactose. As fontes de carbono foram adicionadas ao meio de cultura de forma separada, previamente esterilizadas por filtração (0,2 $\mu$ ). Foi inoculado 1 mL da solução matriz preparada em cada erlenmeyer, com agitação a 120 rpm, a temperatura ambiente de laboratório (26-28°C), retirando alíquotas nos tempos estabelecidos para os testes posteriores.

### 2.3 Teste de fontes de nitrogênio

Foram avaliadas cinco fontes de nitrogênio (2,5g/L meio): cloreto de amônio, sulfato de amônio, extrato de malte, ureia e nitrato de sódio. O meio de cultura base foi modificado substituindo o extrato de levedura pelas outras fontes de nitrogênio mencionadas, com a mesma proporção. As condições de crescimento seguiram a determinação da metodologia anterior.

## **2.4 Teste de temperaturas**

Foram avaliadas cinco temperaturas: 20, 25, 30, 35 e 40°C. Para este teste foi utilizado o caldo nutritivo (2,5g peptona, 2,5g extrato de levedura e 1,25g de NaCl) sem modificações, em seguida procedeu-se a agitação das amostras a 120rpm em um shaker com temperatura controlada (Thermo Scientific MaxQ 6000), tomando alíquotas nos tempos anteriormente estabelecidos.

## **2.5 Teste de pH**

Foram testados cinco pH: 6, 7, 8, 9 e 10. O pH do caldo nutritivo (2,5g peptona, 2,5g extrato de levedura e 1,25g de NaCl) foi modificado adicionando NaOH 0,1M e HCl 0,1M antes de ser esterilizado. As condições de crescimento foram às mesmas das metodologias anteriores.

## **2.6 Extração e quantificação do pigmento**

Para cada um dos testes foram recolhidas alíquotas de 4 ml e colocadas em tubos falcon de 15 mL cada 24, 48 e 72 horas. As amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5430) a 7600 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi resuspenso em 4 ml de etanol (99%) utilizando o sonicador de ponta (Hielscher, UP200Ht) durante 4 minutos, em imersão de gelo. Em seguida as amostras foram centrifugadas durante 8 minutos a 7600rpm, e o sobrenadante obtido foi recuperado para a posterior quantificação do pigmento. O pigmento extraído com o etanol foi quantificado utilizando o espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 440nm (comprimento de onda encontrado como máximo para o extrato etanólico trabalhado).

## **2.7 Avaliação do crescimento celular**

Para cada um dos testes foram retiradas alíquotas de 1 ml e colocadas em micro tubos de 1,5 mL cada 24, 48 e 72 horas. O crescimento celular foi medido por meio da OD (densidade óptica) utilizando o espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 600nm.

## **2.8 Identificação molecular**

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit de extração Purelink Invitrogen. Foi amplificada a região 16S rRNA seguindo o procedimento do Borneman e Triplett (1997) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: 530F (5' - TGA CTG ACT GAG TGC CAG

CMG CCG CGG - 3') e 1492R (5' - TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT - 3'). Como controle de teste, foi utilizado o DNA bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922. O sistema de amplificação foi realizado em termociclador Biocycle, e o perfil térmico do PCR foi: um ciclo inicial a 95°C/2 minutos, 35 ciclos a 95°C/40s, 60°C/40s e 72°C/2 e finalmente um ciclo de extensão a 72°C/5 min. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% para a verificação dos fragmentos. O produto do PCR foi purificado utilizando polietilenglicol 20% (NaCl 2,5M, PEG 20%) e quantificado em gel de agarose 0,8%. A amostra foi sequenciada (ABI 3130- Applied Biosystems DNA sequence) e a sequência obtida foi editada e avaliada utilizando o programa PHRED disponível no endereço (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). Após a obtenção das sequências F(forward) e R (reverse) foi realizado alinhamento comparativo no banco de dados de genomas bacterianos depositados no "GeneBank" utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) (SHAEFFER *et al.* 2001) do "National Center for Biotechnology Information"(NCBI) e também foram comparadas com o banco de dados do "Ribossomal Database Project"(RDP).

## 2.9 Análises estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas com quatro repetições. Para os dados foi submetida análise de variância, e as médias dos resultados comparados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram avaliados no programa *Assitat 7.7 Beta*

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bactéria isolada apresentou uma cor amarelo brilhante no meio de cultura base selecionado, e em meio solido as colônias mostraram aparência circular com borda lisa e textura viscosa. O crescimento celular foi identificado mediante leituras da OD a 600nm e a produção do pigmento, no extrato etanólico a 440 nm, estabelecido como o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{max}$ ). Estudos têm identificado que as bases para as cores características de amarelo até vermelho, são os cromóforos de polienos (compostos orgânicos poli-insaturados) que absorvem luz na faixa de 400 a 500 nm. Quanto maior a quantidade de ligações duplas, maiores são os valores do  $\lambda_{max}$  (GODINHO e BHOSLE, 2008).

A análise de sequência, utilizando “GeneBank” da ferramenta BLAST, revelou que o isolado pertence a o gênero *Microbacterium*, apresentando uma porcentagem de similaridade no rDNA 16S do 99% com *Microbacterium neimengense* 7087, e 99% com *Microbacterium binotii* CIP 101303.

### 3.1 Efeito das fontes de carbono

Constatou-se que a fonte que apresentou os melhores resultados na produção do pigmento, não foi a mesma que demonstrou o melhor crescimento celular. Como pode ser observado na Figura 1, o crescimento celular teve melhor resposta com a sacarose como fonte de carbono, demonstrando diferença significativa em relação às outras fontes. No entanto, a fonte de carbono que apresentou maior produção do pigmento foi o amido solúvel, sendo significativamente diferente das outras fontes utilizadas (Figura 2). Estes resultados expressam que a quantidade do pigmento produzido não depende apenas da quantidade de células, havendo também, o efeito do metabolismo da bactéria em resposta ao tipo de fonte de carbono disponível para o seu crescimento. Esta relação de crescimento celular- pigmento tem sido observada em estudos de síntese por outras bactérias, como é o caso de *Serratia marcescens*, produtora de biocorantes vermelhos (WEI e CHEN, 2005).

Considerando que a fonte de carbono que obteve melhores resultados na produção do pigmento foi o amido solúvel, sugere-se que fontes de moléculas complexas de carbono com menores custos podem ser utilizadas para a produção do pigmento de interesse.

Como pode ser observada na Figura 2, a produção do pigmento alcançou a produção máxima às 72h de crescimento. Pelas limitações do estudo, não foram coletadas amostras em tempos posteriores, porém, afere-se que devido ao comportamento da bactéria, a produção do pigmento pode continuar em tempos posteriores aos analisados. Os resultados em relação ao pigmento produzido e o tempo foram igual para os testes com glicose, amido solúvel e lactose.

Pesquisas vêm sendo realizadas com foco em outros subprodutos obtidos a partir de espécies de *Microbacterium*, além dos pigmentos produzidos. Estudos têm evidenciado interesse na produção de bioemulsificante por algumas espécies de *Microbacterium*, devido a estes exopolímeros exibirem maior atividade surfactante quando comparado aos compostos comerciais (ORTEGA *et al.* 2006). Estudos como Aniszewski *et al.* (2010) tem testado

distintas fontes de carbono para avaliar a produção de bioemulsificante na remoção de metais pesados, mas poucas pesquisas foram encontradas sobre a produção dos pigmentos.

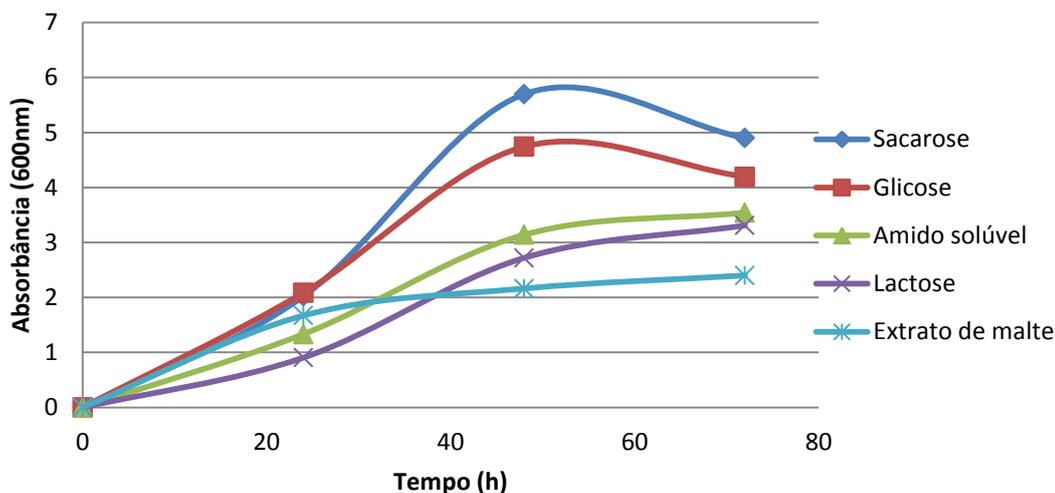


Figura 1. Efeito das fontes de carbono no crescimento celular da *Microbacterium* sp.

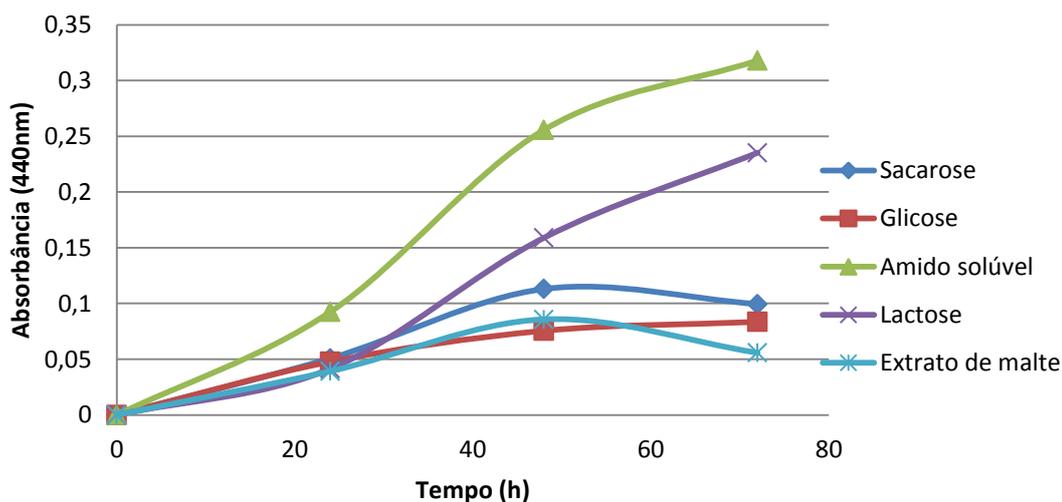


Figura 2. Efeito das fontes de carbono na produção de pigmento de *Microbacterium* sp.

### 3.2 Efeito das fontes de nitrogênio

Das fontes de nitrogênio testadas destacou-se o extrato de levedura, sendo a fonte com resultados mais favoráveis para o crescimento celular e produção do pigmento, apresentando diferença significativa com relação às outras fontes avaliadas (Figura 3 e 4). A resposta obtida pelas outras fontes de nitrogênio foi muito similar, tanto para o crescimento celular quanto para a produção do pigmento, não revelando diferença significativa entre elas. A produção do pigmento apresentou os melhores resultados às 72h de crescimento da bactéria.

Esse comportamento também foi observado no teste anterior, aferindo que após as 72h de crescimento a bactéria pode continuar sintetizando o biocorante.

O melhor resultado obtido com o extrato de levedura pode ser pelo fato do mesmo ser constituído de uma ampla variedade de componentes (sais, vitaminas, etc) essenciais para um maior crescimento bacteriano, ao contrário das outras fontes de nitrogênio testadas. O extrato de levedura, obtido de *Saccharomyces cerevisiae*, é um composto celular considerado como ótima fonte de proteínas, nucleotídeos livres e vitaminas (SILVA, 2006). No Brasil, o mercado de produção de extrato de levedura vem crescendo devido aos vários usos deste composto, utilizando normalmente resíduos de indústrias de bebidas fermentadas como matéria prima de baixo custo. A maioria das produtoras do extrato de levedura utilizam como matéria prima os resíduos da indústria de cerveja, porém não é o único resíduo que pode ser aproveitado como fonte de crescimento deste microrganismo (RÉVILLION *et al.*, 2000).

Devido ao extrato de levedura ter apresentado os melhores resultados para ambos os parâmetros avaliados, com *Microbacterium sp.*, sugere-se que novas pesquisas possam ser realizadas futuramente utilizando esta fonte de crescimento. Com perspectiva de reaproveitamento de resíduos industriais, o extrato de levedura pode ser produzido servindo como fonte de crescimento ideal para a síntese de pigmentos por este e outros microrganismos produtores de biocorantes de interesse.

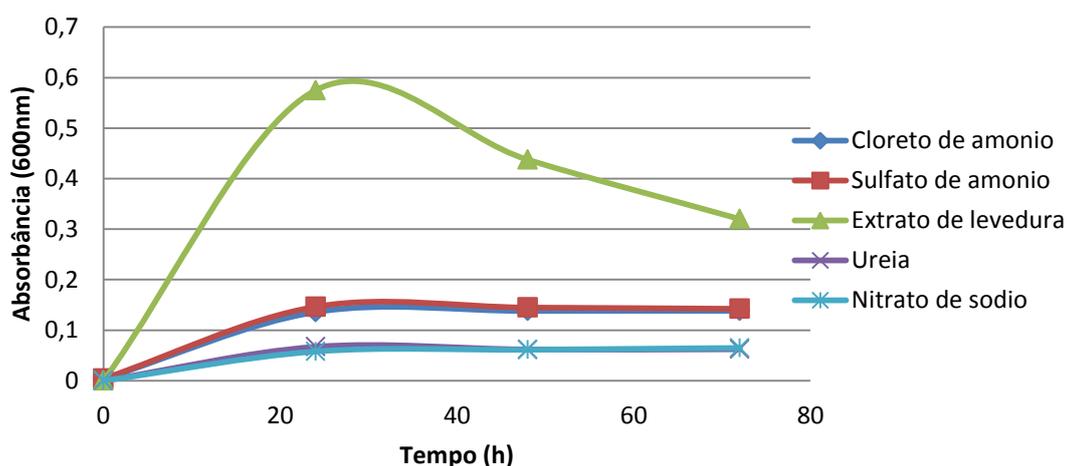


Figura 3. Efeito das fontes de nitrogênio no crescimento celular da *Microbacterium sp.*

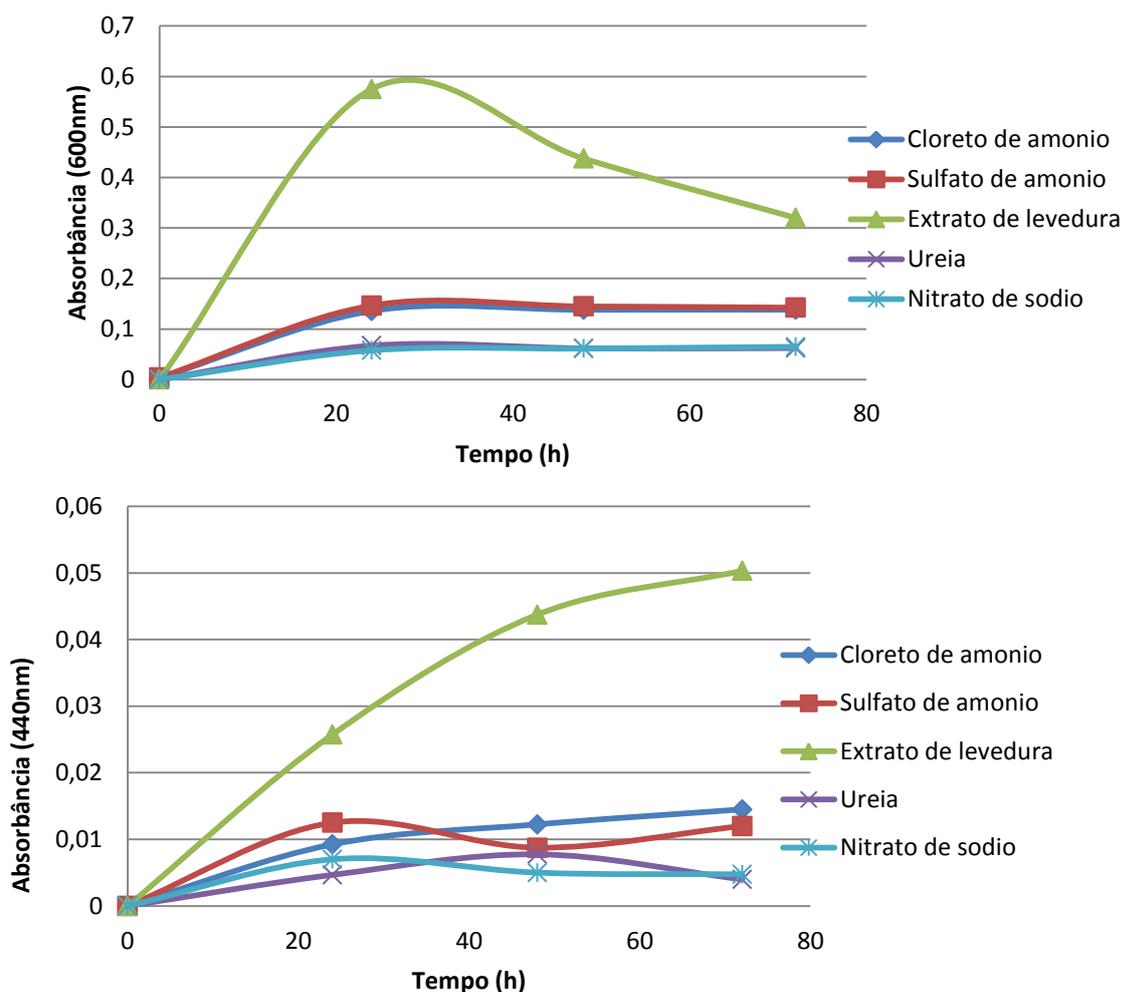


Figura 4. Efeito das fontes de nitrogênio na produção de pigmento de *Microbacterium* sp.

### 3.3 Efeito da temperatura

Um dos fatores físicos avaliados para a produção de pigmentos e crescimento celular foi a temperatura. Os resultados demonstrados nas Figuras 5 e 6 apresentaram crescimento celular e produção de pigmento em todas as temperaturas testadas. As temperaturas com melhor resposta no crescimento celular foi 25 e 30°C, e na produção de pigmento a faixa entre 20 e 30°C, expressando diferença significativa com relação às outras temperaturas. Mesmo não obtendo os resultados mais altos, as outras temperaturas testadas também resultaram em respostas positivas no crescimento e síntese do pigmento pela bactéria. Com estes resultados afere-se que a bactéria possa crescer e produzir o pigmento de interesse em uma faixa ampla de temperaturas.

Ortega *et al.* (2006), avaliaram a produção de polímeros extracelulares, outro metabolito secundário, com propriedades surfactantes utilizando uma temperatura de 30°C para o crescimento das espécies de *Microbacterium* trabalhadas. Outro trabalho testou a remoção de metais pesados pela ação dos biosurfactantes produzidos por *Microbacterium* spp. a uma temperatura de 28°C (ANISZEWSKI *et al.*, 2010). Na produção de carotenos por *Microbacterium arborescens*, a bactéria foi cultivada a 28°C para a produção do pigmento laranja próprio da espécie (GODINHO e BHOSLE, 2008). As temperaturas utilizadas nos trabalhos mencionados para a produção de metabolitos secundários entram na faixa de temperatura encontrada como ótima na produção de pigmento para este estudo (20-30°C).

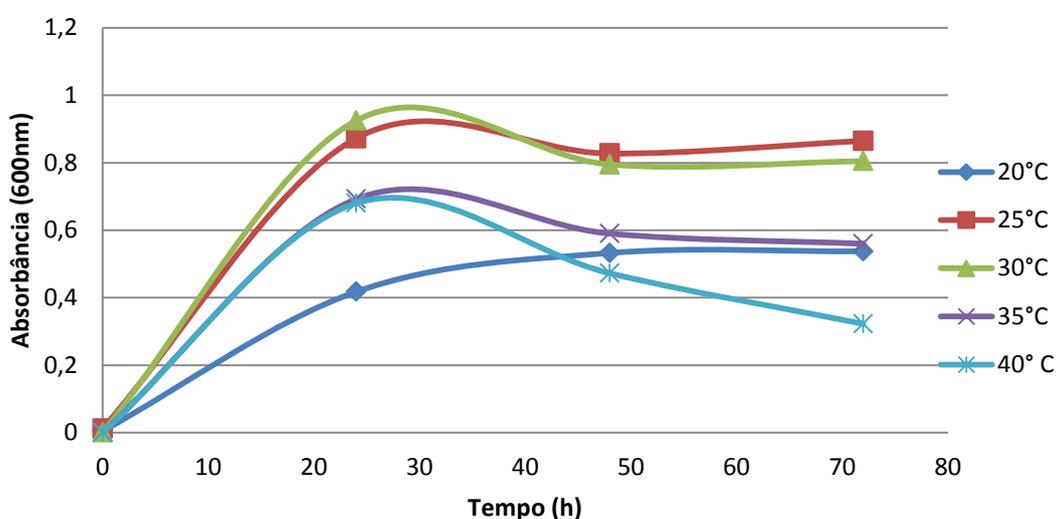


Figura 5. Efeito da temperatura no crescimento celular de *Microbacterium* sp.

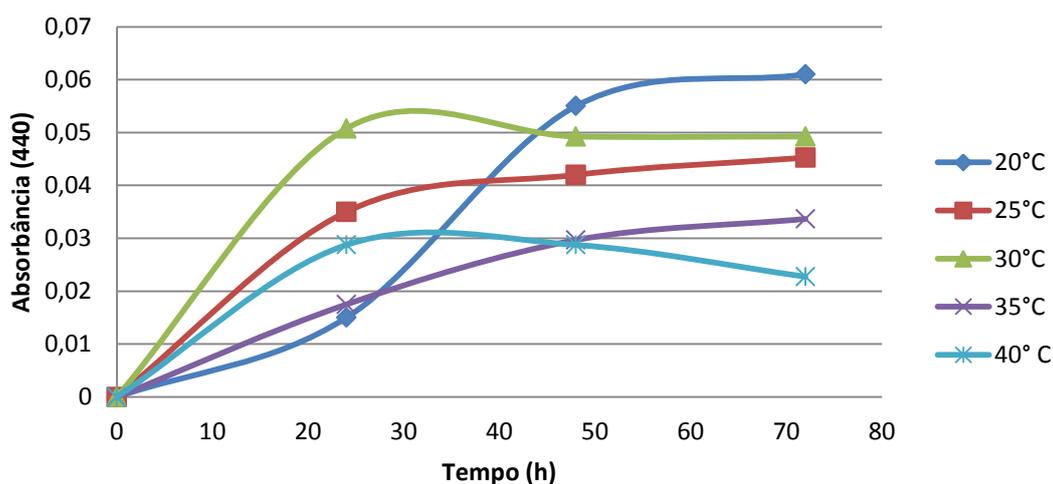


Figura 6. Efeito da temperatura na produção de pigmento de *Microbacterium* sp.

## 2.1. Efeito do pH

O teste de pH apresentou os maiores valores de crescimento celular utilizando pH de 6, 7 e 8 sem no entanto, haver diferença significativa entre eles. Para a síntese de pigmento, a bactéria apresentou bons resultados na maioria dos pH testados, sendo a melhor resposta no pH entre 6 e 9, não diferindo estatisticamente entre eles. Como pode ser observado na Figura 7, o pH 10 também expressou crescimento e produção do pigmento, porém foi mais lento e em quantidades menores. Com relação à idade do cultivo, a produção de pigmento foi maior às 72 h de crescimento da bactéria (Figura 8).

No estudo realizado por Godinho e Bhosle (2008) a bactéria *M. arborescens* foi submetida para crescer e produzir o pigmento laranja, licopeno (pigmento de tipo carotenoide), tanto em ágar sólido quanto em ágar líquido em um pH de 10,5. Diferindo do estudo mencionado, a espécie de *Microbacterium* trabalhada não apresentou resultados positivos na produção de pigmento com um pH de 10.

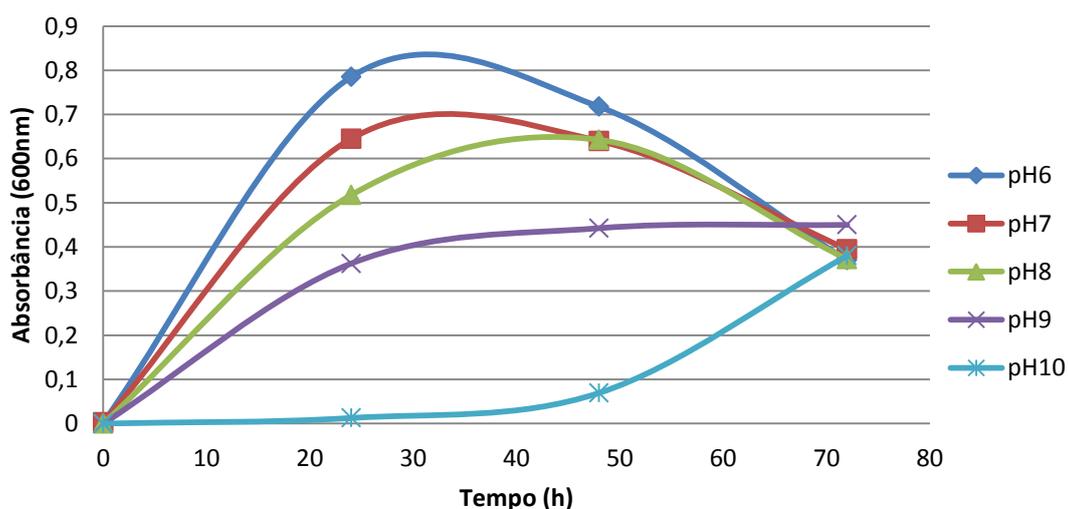


Figura 7. Efeito do pH no crescimento celular de *Microbacterium* sp.

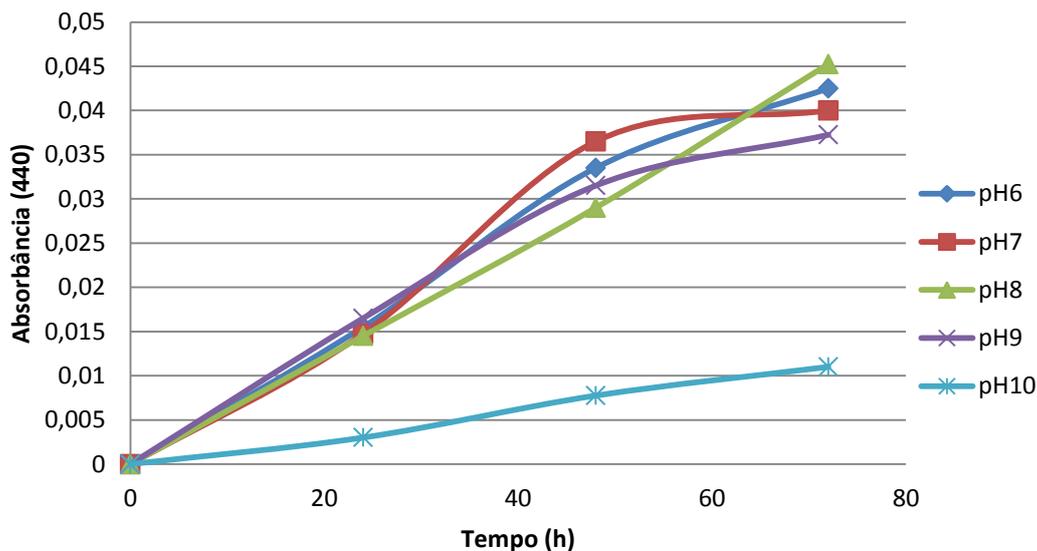


Figura 8. Efeito do pH na produção de pigmento de *Microbacterium* sp.

Estudos têm caracterizado pigmentos produzidos por bactérias do gênero *Microbacterium*, como o caso de *M. arborescens* produtora de licopeno, e a produção de neurosporeno (pigmentos de tipo de carotenoide) por várias outras espécies do gênero (GODINHO e BHOSLE, 2008; TRUTKO *et al.* 2005). Tem sido reportado que a pigmentação de muitos membros de actinobacteria se encontra determinada por compostos de tipo carotenoide (TRUTKO *et al.*, 2005). Leiva *et al.* (2015) isolaram bactérias gram-positivas pigmentadas de microalgas coletadas na Antártica, encontrando produção de pigmento amarelo por vários gêneros incluindo *Microbacterium*. No estudo de Kamarudin *et al.* (2009) foi feita uma prospecção na coleção de estirpes ambientais da Nova Zelândia, na busca de espécies produtoras de pigmentos. Entre as espécies escolhidas foram identificados 20 gêneros diferente, entre estes *Microbacterium*.

A ampla ocorrência de carotenoides em bactérias heterotróficas tem sugerido que eles tem um papel importante incrementando a resistência a estresse ambiental (DIESER; GREENWOOD; FOREMAN, 2010). A presença de carotenoides pode fornecer proteção contra radiação solar, ou contra danos oxidativos (LEIVA *et al.*, 2015). Devido às diversas propriedades dos carotenoides, estes são utilizados como corantes naturais e aditivos de alimentos, suplementos em ração animal, e para propósitos farmacêuticos e cosméticos (LEE; SCHMIDT-DANNERT, 2002). Pelas diversas aplicações nas diferentes áreas é necessária a pesquisa de novas fontes produtoras destes compostos de interesse.

Devido às limitações do estudo não foi possível caracterizar o pigmento obtido da *Microbacterium sp.* isolada, pelo qual é difícil indicar uma aplicação direta para o composto produzido pela bactéria. As pesquisas levantadas sugerem que o pigmento ou pigmentos que estão sendo produzidos podem pertencer ao grupo dos carotenoides. Poucos trabalhos têm avaliado e caracterizado os pigmentos produzidos por espécies do gênero *Microbacterium*, porém, as pesquisas não vêm investigando fatores físicos e nutricionais com a finalidade de otimizar a produção do pigmento.

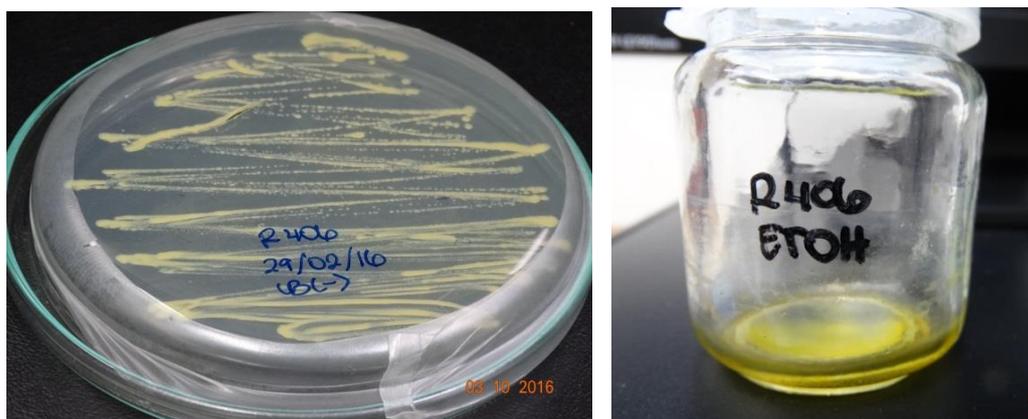


Figura 9. Produção do pigmento por *Microbacterium sp.* em placa com meio agar nutritivo (esquerda). Extrato etanólico do pigmento (direita).

#### 4. CONCLUSÕES

A bactéria apresentou um melhor crescimento celular em presença de sacarose como fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, em 25 e 30 °C com um pH entre 6 e 8.

A bactéria expressou maior produção utilizando o amido solúvel como fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, em uma faixa entre 20-30°C, e um pH entre 6 e 9.

## 5. REFERÊNCIAS

ANISZEWSKI E. *et al.* Bioemulsifier production by *Microbacterium sp.* strains isolated from mangrove and their application to remove cadmium and zinc from hazardous industrial residue. *Brazilian journal of microbiology*. v. 41. 2010. p. 235-245.

BUSS S. N., STARLIN R. e IWEN P. C. Bacteremia caused by *Microbacterium binotii* in a patient with sickle cell anemia. *Journal of clinical microbiology*. v. 52. n. 1. 2014. p. 379-381.

DIESER M., GREENWOOD M. e FOREMAN C. Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arctic, Antarctic and Alpine research*. v. 42. n. 4. 2010. p. 396-405.

GNEIDING K., FRODL R e FUNKE G. Identities of *Microbacterium spp.* Encountered in human clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*. v. 46. n. 11. 2008. p. 3646-3652.

GODINHO A. e BHOSLE S. Carotenes produced by alkaliphilic Orange-pigmented strain of *Microbacterium arborescens*- AGSB isolated from coastal sand dunes. *Indian journal of marine sciences*. v. 37. n. 3. 2008. p. 307-312.

KAMARUDIN K. R. *et al.* Pigment production by New Zealand microbes: screening and industrial application. *New Biotechnology*. v. 25S. 2009. p. S70.

LEIVA S. *et al.* Diversity of pigmented gram-positive bacteria associated with marine microalgae from Antarctica. *FEMS Microbiology letters*. 2015.

ORTEGA B. O. *et al.* Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. *Journal of applied microbiology*. v. 102. p. 254-264. 2006.

RÉVILLION J.P., BRANDELLI A. e AYUB M. Produção de extratos de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes. *Ciência y tecnologia de alimentos*. v. 20. n. 2. 2000.

SILVA Vanessa. Extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e prebiótico na dieta pré-inicial para frangos de corte criados em diferentes temperaturas. Dissertação de mestrado da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita filho”. Jaboticabal-São Paulo. 2006. p. 151.

**CAPITULO 3**

**Efeito de parâmetros nutricionais e físicos no crescimento celular e produção de pigmento por *Burkholderia* sp. isolada de solo contaminado com petróleo**

Efeito de parâmetros nutricionais e físicos no crescimento celular e produção de pigmento por *Burkholderia* sp. isolada de solo contaminado com petróleo

Ana C. Monroy<sup>1</sup>, Luiz A. Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-Brasil.* <sup>2</sup> *Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus-Brasil.*

## Resumo

O gênero *Burkholderia* inclui cocos Gram negativo, geralmente moveis quando suspensas em meio líquido. Possuem genomas grandes e complexos com elementos característicos que contribuem à plasticidade do genoma e à habilidade para adquirir uma faixa ampla de rotas metabólicas. São espécies com um amplo potencial na bioremediação de poluentes, promotoras de crescimento em plantas devido à nodulação de raízes e fixação de nitrogênio, no controle biológico em distintos cultivos, pela produção de biopolímeros. Além de apresentar propriedades interesse econômico, varias espécies são conhecidas por serem patógenos oportunistas, característica que impede a aplicação destes microrganismos e seus produtos nas possíveis áreas de aplicação. Pouco foi encontrado a literatura com relação a estudos de pigmentos produzidos por espécies deste gênero, sendo necessária a bioprospecção de novos organismos produtores destes compostos, procurando uma aplicação nas distintas áreas de interesse. No presente trabalho objetivou-se testar distintos parâmetros de crescimento, identificando aqueles que influenciam de forma positiva no crescimento celular e produção do pigmento roxo, de uma espécie de *Burkholderia* isolada de solo contaminado com petróleo na Província Petrolífera Geólogo Pedro de Moura, Urucu. Os testes foram realizados por meio de crescimento em caldo nutritivo selecionado como meio base, testando distintas fontes de carbono, nitrogênio, temperaturas e pH. Foram retiradas amostras às 24, 48 e 72h após incubação, medindo o crescimento celular por meio de OD (densidade ótica) a 600nm, e a produção do pigmento através da leitura da OD a 470nm utilizando espectrofotômetro. Concluiu-se que a produção do pigmento foi favorecida pelo uso de lactose como fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, em uma temperatura de 20 e 25°C e um pH entre 6 e 7 no meio de cultura base.

Palavras chaves: Amazônia, metabolismo microbiano, biopigmentos.

## 1. INTRODUÇÃO

Os membros do gênero *Burkholderia* incluem cocos gram negativo, retos ou ligeiramente encurvados, com as extremidades arredondadas, geralmente moveis quando suspensas em meio líquido. *Burkholderia spp.* são das bactérias mais abundantes no meio ambiente, e a plasticidade do seus genomas e a capacidade de adaptação em condições diferentes permitem que colonizem diversos nichos ecológicos. As espécies deste gênero possuem uns dos maiores e mais complexos genomas. Em condições de estresse *in vitro* ou durante infecções, os genomas destes microrganismos podem sofrer mutações rapidamente (LOUTET e VALVANO, 2010).

Este gênero tem sido muito estudado pelo amplo potencial de algumas espécies na bioremediação de poluentes comuns, pelo controle biológico de doenças de plantas, por serem promotoras de crescimento em plantas, assim como também por serem patógenos oportunistas capazes de causar infecções em pacientes com fibrose cística e outros pacientes vulneráveis (COMPANT *et al.*, 2008; O'SULLIVAN e MAHENTHIRALINGAM, 2005). Espécies do gênero *Burkholderia* têm sido vinculadas com distintas relações de endossimbiose em fungos patogênicos, endossimbiose com insetos, associadas á rizosfera de espécies vegetais, como endófitos em plantas (tanto nos órgãos vegetativos quanto os reprodutivos), na nodulação de raízes e fixação de nitrogênio entre outras. Contudo, o uso de organismos que possam ser patógenos oportunistas para humanos encontra-se em debate (COMPANT *et al.*, 2008; LOUET e VALVANO, 2010).

A pigmentação não é uma característica universal de *Burkholderia*. Algumas estirpes da mesma espécie podem ou não ser pigmentadas, apresentando uma grande variedade de cores quando são cultivadas em meios que contem diferentes fontes de carbono. As estirpes podem ser divididas em dois tipos quanto á pigmentação: algumas são amarelas e outras de vários tons de marrom, vermelho, violeta e roxo. Estirpes de *Burkholderia* crescem em meios com um mínimo de compostos, sem adição de fatores orgânicos de crescimento (GARRITY, 2005).

O potencial biotecnológico das *Burkholderia spp.* permite a estes microrganismos serem de importância ecológica e /ou econômica, porém a difusão deles como biofertilizantes (como uma das aplicações no controle biológico) aumentaria a exposição dos humanos a bactérias potencialmente perigosas. A principal preocupação da aplicação das estirpes deste

gênero na agricultura e biotecnologia, é que ainda permanece incerto, o que faz que algumas estirpes sejam virulentas (COMPANT *et al.*, 2008).

Sendo o gênero *Burkholderia* de grande importância biotecnológica e havendo escassa informação dos pigmentos sintetizados por espécies do gênero, é necessária a pesquisa de novas espécies produtoras de pigmentos para uma possível aplicação nas distintas áreas de interesse. O estudo objetivou avaliar distintos fatores nutricionais e físicos no crescimento celular e produção do pigmento de uma espécie bacteriana do gênero *Burkholderia*, isolada de solo contaminado com petróleo na Província Petrolífera Geólogo Pedro de Moura, Uruçu.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

A *Burkholderia* sp. utilizada no estudo foi obtida da coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos da Amazônia (LEBMAM) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Apresentou uma coloração roxo escuro no meio de cultura utilizado para o isolamento, pelo qual foi selecionada para o estudo.

### **2.1 Crescimento da bactéria em meio líquido**

Foi selecionado como meio de crescimento base, o caldo nutritivo (10 g peptone, 5g extrato de levedura e 10g de NaCl). Antes de cada teste foi preparado um pré-cultivo da bactéria em 50 mL de meio, com agitação a 120 rpm, durante 24h a temperatura ambiente ( $27\pm 1^\circ\text{C}$ ). Utilizando o pré-cultivo foi preparada uma solução matriz com uma concentração celular equivalente a um McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^3$  células por mL), da qual foram retiradas alíquotas de 1 mL e distribuídas nos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio. Para cada testes foi realizado um delineamento com quatro repetições, tomando alíquotas a cada 24, 48 e 72 horas para as avaliações de crescimento celular e produção de pigmento. Foram testadas diferentes fontes de carbono, nitrogênio, temperaturas e pH.

### **2.2 Teste de fontes de carbono**

Foram avaliadas quatro fontes de carbono (10g/L meio): sacarose, glicose, amido solúvel e lactose. As fontes de carbono foram adicionadas ao meio de cultura de forma separada, previamente esterilizadas por filtração ( $0,2\mu$ ). Foi inoculado 1 mL da solução

matriz preparada em cada erlenmeyer, com agitação a 120 rpm, a temperatura ambiente de laboratório (26-28°C), retirando alíquotas nos tempos estabelecidos para os testes posteriores.

### **2.3 Test de fontes de nitrogênio**

Foram avaliadas cinco fontes de nitrogênio (5g/L meio): cloreto de amônio, sulfato de amônio, extrato de malte, ureia e nitrato de sódio. O meio de cultura base foi modificado substituindo o extrato de levedura pelas outras fontes de nitrogênio mencionadas, com a mesma proporção. As condições de crescimento seguiram a determinação da metodologia anterior.

### **2.4 Test de temperaturas**

Foram avaliadas cinco temperaturas: 20, 25, 30, 35 e 40°C. Para este teste foi utilizado o caldo nutritivo (2,5g peptona, 2,5g extrato de levedura e 1,25g de NaCl) sem modificações, em seguida procedeu-se a agitação das amostras a 120rpm em um shaker com temperatura controlada (Thermo Scientific MaxQ6000), tomando alíquotas nos tempos anteriormente estabelecidos.

### **2.5 Test de pH**

Foram testados cinco pH: 6, 7, 8, 9 e 10. O pH do caldo nutritivo (2,5g peptona, 2,5g extrato de levedura e 1,25g de NaCl) foi modificado adicionando NaOH 0,1M e HCl 0,1M antes de ser esterilizado. As condições de crescimento foram às mesmas das metodologias anteriores.

### **2.6 Obtenção e quantificação do pigmento**

Para cada um dos testes foram recolhidas alíquotas de 4 ml e colocadas em tubos falcon de 15 mL cada 24, 48 e 72 horas. As amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5430) a 7600 rpm durante 10 minutos. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi recuperado em outro tubo falcon de 15 mL. Devido ao pigmento ser extracelular, ele permaneceu no sobrenadante junto com o meio de cultura, sem precisar de uma extração para a obtenção dele. O pigmento resuspenso no meio de cultura foi quantificado utilizando o espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 540nm (comprimento de onda encontrado como máximo para o pigmento trabalhado). O caldo nutritivo sem inoculo foi utilizado como branco na hora das medições no espectrofotômetro.

Devido ao pigmento produzido pela bactéria estudada ser solúvel em água, este permaneceu no meio de cultura suspenso pelo qual foi adicionado um volume de etanol (99%) igual à quantidade do meio, e colocado na geladeira durante 24h. Para recolher o pigmento, a mistura foi centrifugada durante 10 min a 7600 rpm (Eppendorf 5430), e o sobrenadante (mistura de etanol e meio) foi descartado permanecendo o pigmento aderido às paredes do tubo. O pigmento aderido foi resuspenso com quantidades pequenas de água destilada estéril e de novo centrifugado durante 5 min a 7600 rpm. O pellet obtido era o pigmento.

## 2.7 Avaliação do crescimento celular

Para cada um dos testes foram retiradas alíquotas de 1 ml e colocadas em micro tubos de 1,5 mL cada 24, 48 e 72 horas. Quando houve necessidade foram feitas diluições de 1:10 e 1:100. O crescimento celular foi medido por meio da OD (densidade óptica) utilizando o espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 600nm.

## 2.8 Identificação molecular

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit de extração Purelink Invitrogen. Foi amplificada a região 16S rRNA seguindo o procedimento do Borneman e Triplett (1997) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: 530F (5' - TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG - 3') e 1492R (5' - TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT - 3'). Como controle de teste, foi utilizado o DNA bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922. O sistema de amplificação foi realizado em termociclador Biocycle, e o perfil térmico do PCR foi: um ciclo inicial a 95°C/2 minutos, 35 ciclos a 95°C/40s, 60°C/40s e 72°C/2 e finalmente um ciclo de extensão a 72°C/5 min. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% para a verificação dos fragmentos. O produto do PCR foi purificado utilizando polietilenglicol 20% (NaCl 2,5M, PEG 20%) e quantificado em gel de agarose 0,8%. A amostra foi sequenciada (ABI 3130- Applied Biosystems DNA sequence) e a sequência obtida foi editada e avaliada utilizando o programa PHRED disponível no endereço (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). Após a obtenção das sequências F(forward) e R (reverse) foi realizado alinhamento comparativo no banco de dados de genomas bacterianos depositados no "GeneBank" utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) (SHAEFFER *et al.* 2001) do "National Center for

Biotechnology Information”(NCBI) e também foram comparadas com o banco de dados do “Ribossomal Database Project”(RDP).

## **2.9 Análises estatísticas**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas com quatro repetições. Para os dados foi submetida análise de variância, e as médias dos resultados comparados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram avaliados no programa *Assitat 7.7 Beta*

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise de sequência, utilizando “GeneBank” da ferramenta BLAST, revelou que o isolado pertence a o gênero *Burkholderia*, apresentando uma porcentagem de similaridade no rDNA 16S do 99% com *Burkholderia cepacia* GG4, 99% com *Burkholderia contaminans* J2956 e 99% com *Burkholderia arboris* R-24201.

Como foi mencionado, a bactéria estudada foi isolada de solo contaminado com petróleo. No trabalho de Carrasco (2007) foram isoladas e identificadas bactérias com capacidade de degradar hidrocarbonetos, de sítios contaminados com petróleo na região equatoriana, sendo que entre os gêneros encontrados estava *Burkholderia*.

### **3.1 Efeito das fontes de carbono**

A fonte de carbono que apresentou melhores resultados para crescimento celular foi a glicose demonstrando diferença significativa com relação às outras fontes testadas (Figura 1). No entanto a produção do pigmento foi favorecida pelo uso da lactose como fonte de carbono, sendo diferente de forma significativa às outras fontes (Figura 2). Em relação à idade da cultura, tanto o crescimento celular quanto a produção do pigmento atingiu os níveis mais altos entre as 48 e as 72 horas de crescimento.

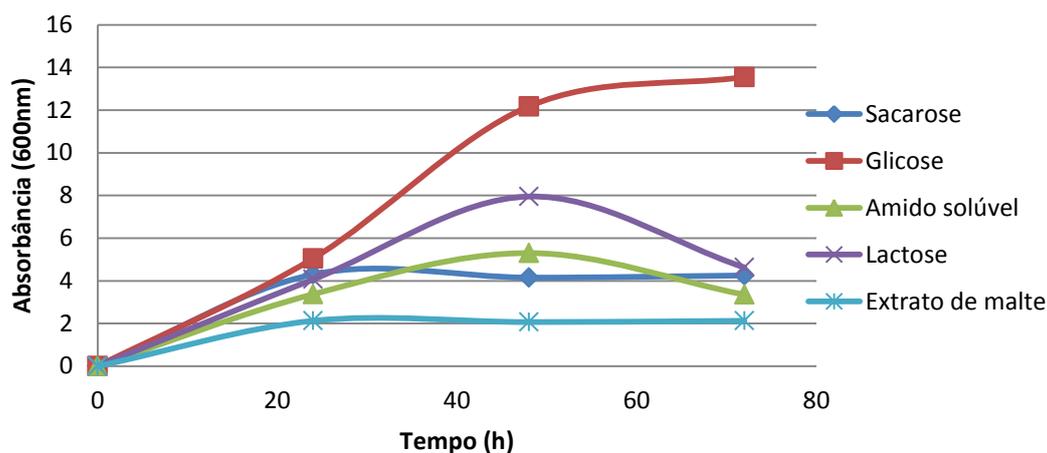


Figura 1. Efeito das fontes de carbono no crescimento celular da *Burkholderia* sp.

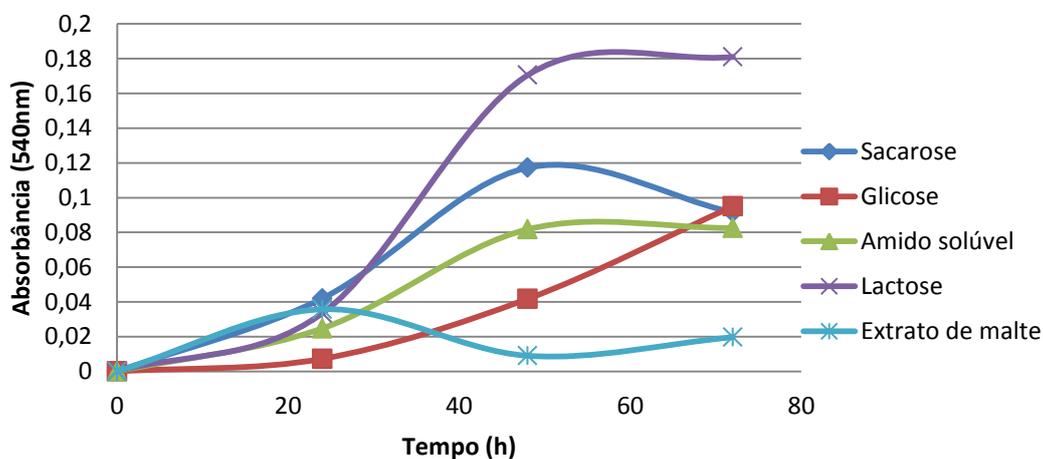


Figura 2. Efeito das fontes de carbono na produção de pigmento de *Burkholderia* sp.

### 3.2 Efeito das fontes de nitrogênio

O teste identificou que a fonte de nitrogênio mais relevante foi o extrato de levedura para ambos os parâmetros avaliados. Houve diferença significativa no crescimento celular e produção do pigmento utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio quando comparado às outras fontes testadas (Figuras 3 e 4). Como pode ser observado na Figura 4, a produção de pigmento foi maior entre as 48 e 72 horas de crescimento da bactéria.

Ocasionalmente as estirpes que são isoladas da natureza são de crescimento lento, por tanto podem ser estimuladas adicionando compostos como extrato de levedura (GARRITY, 2005). O estudo realizado compartilha a ideia apresentada anteriormente, já que a fonte que

forneceu a melhor condição para o crescimento celular foi o extrato de levedura, sendo positivo também para a síntese do pigmento.

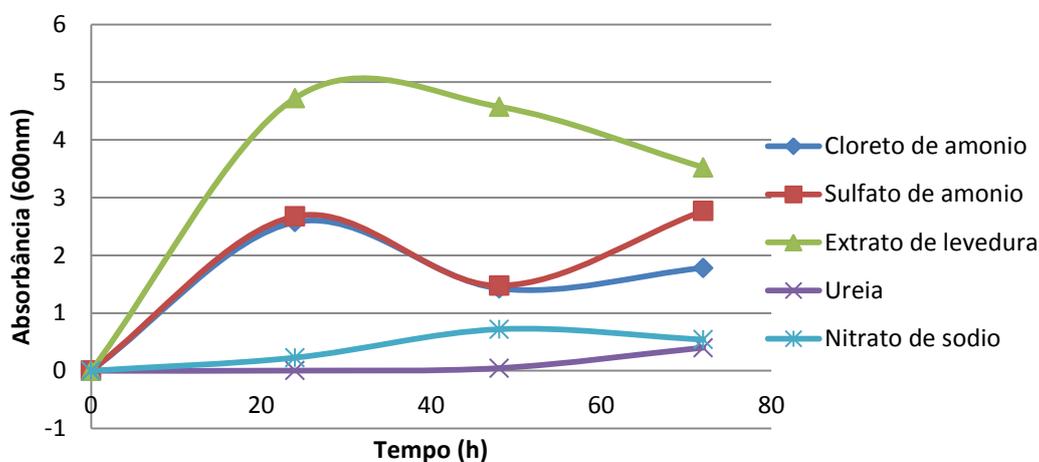


Figura 3. Efeito das fontes de nitrogênio no crescimento celular da *Burkholderia* sp.

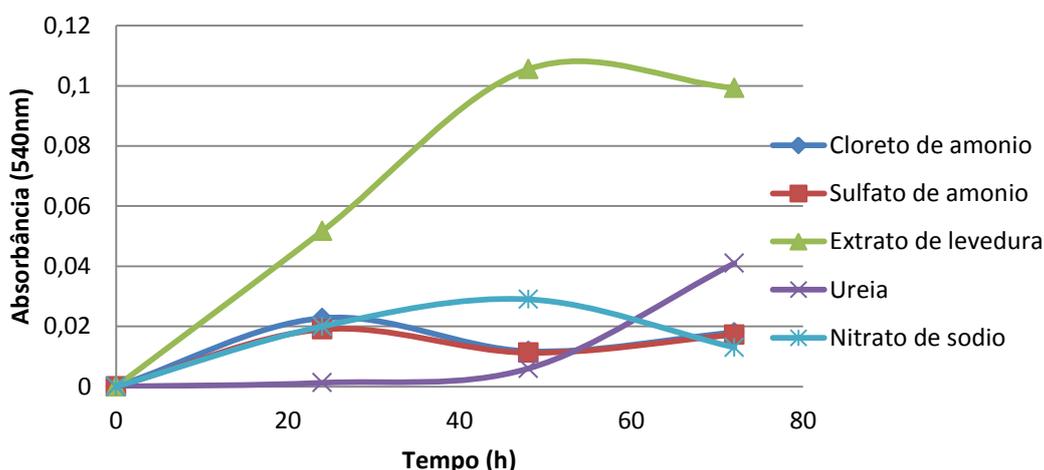


Figura 4. Efeito das fontes de nitrogênio na produção de pigmento de *Burkholderia* sp.

### 3.3 Efeito da temperatura

Na avaliação da influencia dos fatores físicos no crescimento e produção do pigmento, foram testadas cinco temperaturas. Tanto para o crescimento celular quanto para a síntese do pigmento, as temperaturas de 20 e 25°C foram as que apresentaram melhores resultados (Figuras 5 e 6). Geralmente para as espécies do gênero *Burkholderia*, é utilizada uma temperatura de 30°C para o crescimento, embora possam crescer também a 37°C e até 40°C (GARRITY, 2005).

No estudo realizado por Karki *et al.* (2012) foram testadas estirpes virulentas e avirulentas da espécie *Burkholderia glumae*, sendo a pigmentação um dos fatores de virulência testados. Para determinar o fenótipo da pigmentação as estirpes de *B. glumae* estudadas foram inoculadas em meio casamino ácido-peptona-glicose (CPG) e incubado a 30°C durante 48h (KARKI *et al.*, 2012). A estirpe de *Burkholderia cepacia* estudada por Zughailer *et al.* (1999) foi cultivada a 37°C durante 48h para a obtenção do pigmento de tipo melanina produzido. Em um estudo com *B. cenocepacia*, produtora de um pigmento de tipo melanina usualmente marrom ou preto, a bactéria foi inoculada para a síntese do pigmento de interesse a 37°C entre 36 e 48 horas de crescimento (KEITH *et al.* 2007).

Embora a bactéria trabalhada tenha apresentado crescimento a 30 e 35°C, os resultados mais relevantes foram obtidos em temperaturas mais baixas que as estabelecidas nas pesquisas mencionadas anteriormente. A produção do pigmento das espécies trabalhadas nos estudos mencionados, é obtida às 48h de crescimento, resultado que coincide com o tempo de crescimento estabelecido como ótimo na síntese do pigmento para a *Burkholderia* sp. deste estudo (48-72h).

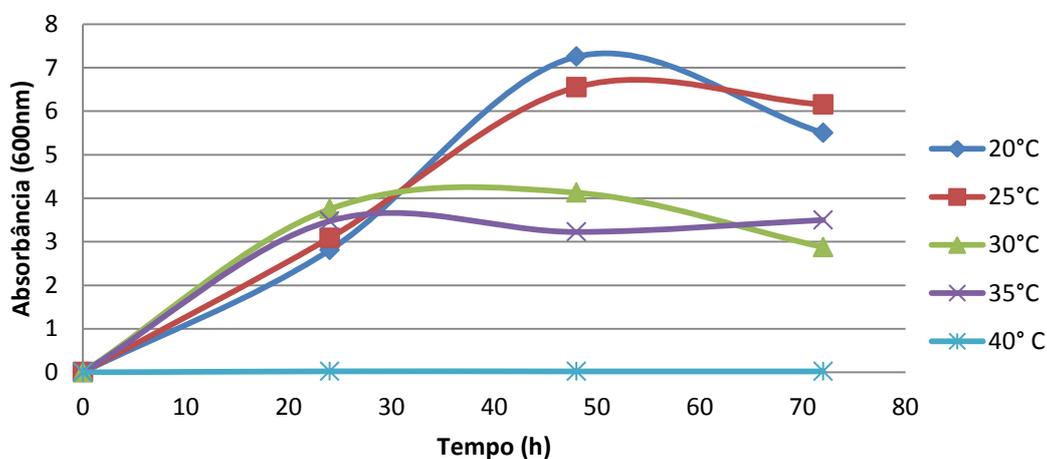


Figura 5. Efeito da temperatura no crescimento celular de *Burkholderia* sp.

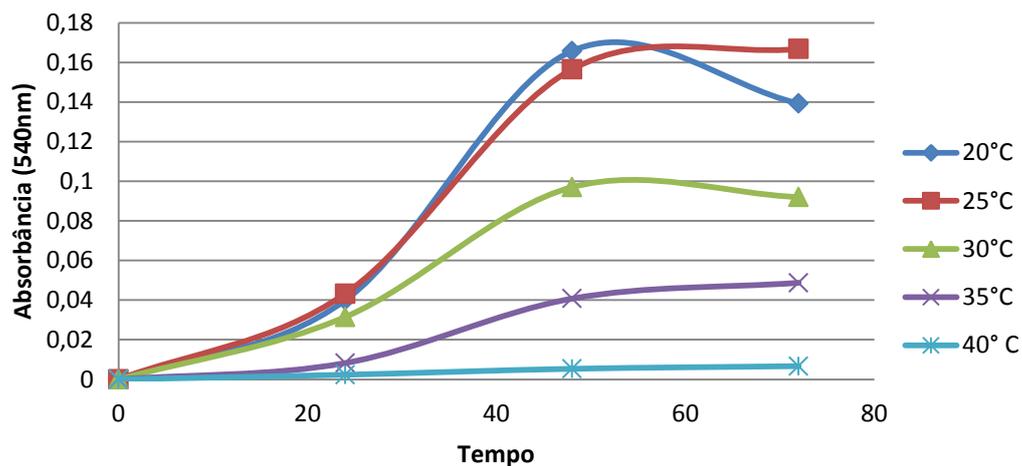


Figura 6. Efeito da temperatura na produção de pigmento de *Burkholderia* sp.

### 3.4 Efeito do pH

Outro parâmetro físico avaliado foi o pH, e no teste desenvolvido, *Burkholderia* sp. mostrou melhores resultados quando o pH do meio de cultura foi de 6 para o crescimento celular. Para a produção do pigmento o pH entre 6 e 7 teve a melhor resposta, comprovando diferença significativa em relação aos outros pH testados (Figuras 7 e 8).

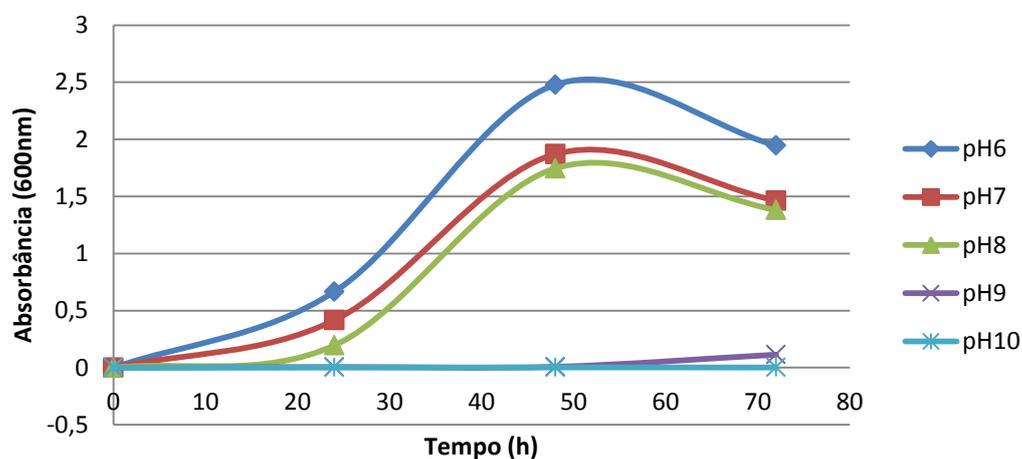


Figura 7. Efeito do pH no crescimento celular de *Burkholderia* sp.

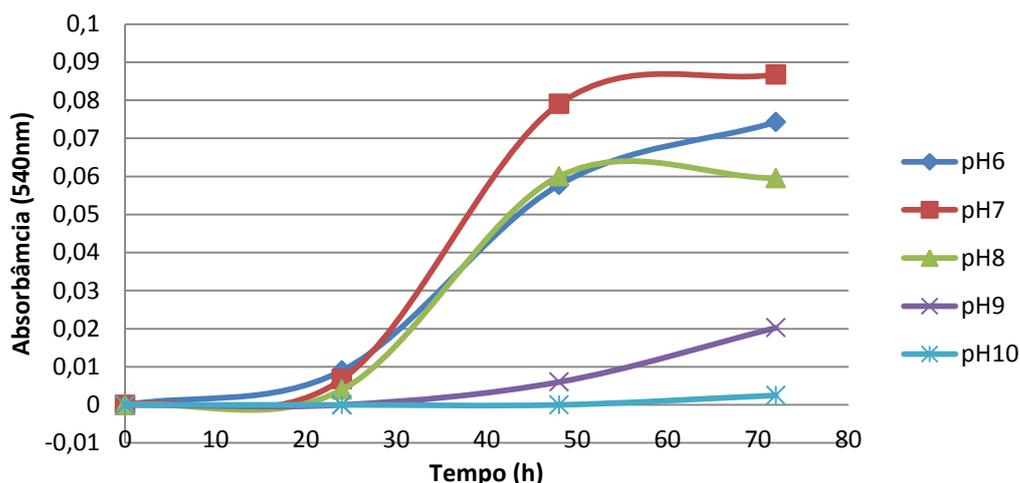


Figura 8 Efeito do pH na produção de pigmento de *Burkholderia* sp.

A bactéria apresentou uma pigmentação roxa junto com um pigmento amarelo que permanecia nas bordas em meio Luria Bertani e ágar nutritivo (Figura 9) e coloração roxa escura quando cultivada em meio líquido. Coloração similar foi encontrada em uma das estirpes da espécie *Burkholderia glumae* estudadas em Karki *et al.* (2012), apresentando uma cor roxo forte no centro das colônias e uma borda de pigmento amarelo.

Karki *et al.* (2012) testaram estirpes virulentas e avirulentas da espécie *Burkholderia glumae*, um agente causante de doenças nos cachos do arroz, determinando alguns fatores fenotípicos e de virulência. Além da produção da toxoflavina, fator de virulência com pigmentação amarela brilhante que possui atividade antibiótica e fitotóxica, algumas das estirpes apresentaram outro tipo de pigmentação. Com uma purificação parcial dos pigmentos foram obtidas três frações com diferentes cores: amarelo-verde, roxo e marrom. O pigmento amarelo encontrava-se restrito às colônias bacterianas enquanto o pigmento amarelo-verde se encontrava difundido no ágar (toxoflavina). As estirpes avirulentas testadas que apresentaram pigmento de algum tipo exibiram atividade antifúngica sugerindo que a produção do pigmento contribui com a atividade antifúngica das estirpes de *B. glumae* testadas. O pigmento roxo em especial exibiu uma atividade antifúngica forte.

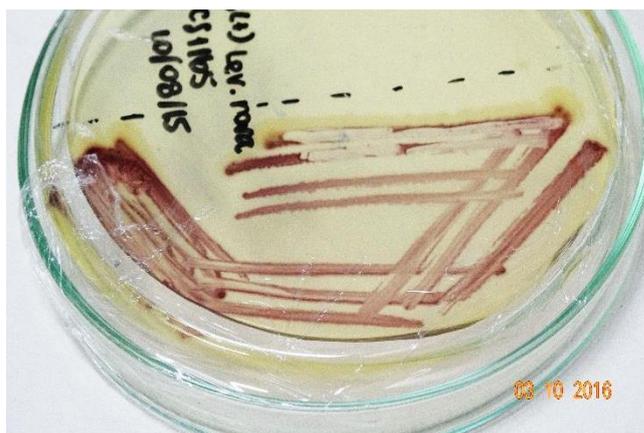


Figura 9. Crescimento de *Burkholderia* sp. em agar nutritivo.

Outras espécies de *Burkholderia* tem apresentado algum tipo de pigmentação particular. Por exemplo, a espécie *B. cenocepacia* produz um pigmento de tipo melanina, hidrofóbico usualmente marrom ou preto que também pode ser produzido por variedade de fungo, bactéria e helmintos. O pigmento produzido pela espécie *B. cenocepacia* C5424 era marrom escuro, solúvel em água e podia ser precipitado pela adição de etanol (KEITH *et al.* 2007). Como o caso do estudo mencionado, a bactéria estudada neste trabalho apresentou alta solubilidade em água e para a obtenção do pigmento, este foi precipitado utilizando etanol também.

No estudo de Zughair *et al.* (1999) a estirpe *B. cepacia*, produtora também de um pigmento de tipo melanina, estabeleceu que o pigmento possui propriedades para atenuar a produção do ânion superóxido pelos macrófagos. Uma ruptura do gene codificador da enzima requerida para a produção de pigmento, resultou em uma estirpe não-pigmentada da espécie *B. cenocepacia* incrementando a sensibilidade na frente de peróxido de hidrogênio e superóxido diminuindo a sobrevivência. Estudos tem sugerido que o pigmento protege *B. cenocepacia* de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (LOUTET e VALVANO, 2010).

Karki *et al.* (2012) observaram que a estirpe *B. glumae* 411gr-6, produziu três pigmentos diferentes (marrom, roxo e compostos fluorescentes), mas não pode afirmar que sejam de tipo melanina devido à ausência da caracterização química das moléculas. Adicionalmente o estudo reportou que as espécies deficientes em pigmentação apresentaram uma redução na virulência em plantas de arroz, sugerindo que a pigmentação age de forma positiva aumentando a tolerância ao estresse ambiental do microrganismo.

Além da pigmentação, outras propriedades ou subprodutos têm chamado a atenção do gênero *Burkholderia*. Muitas das espécies desse gênero que têm sido examinadas são capazes de acumular PHB (polihidroxibutirato) ou biopolímeros em geral como reserva de carbono, podendo acumular até um 90% do seu peso, o qual podem degradar quando os nutrientes no meio acabam (GARRITY, 2005). Esta e outras características mencionadas fazem deste gênero, um alvo importante de pesquisa na área da biotecnologia e agrícola.

Poucos estudos foram encontrados com relação ao uso de pigmentos ou estudos da obtenção de pigmentos do gênero *Burkholderia*, no levantamento bibliográfico realizado. Conhecendo o potencial biotecnológico que apresentam varias das espécies deste gênero, muito ainda deve ser estudado sobre os pigmentos sintetizados por estes microrganismos, incluindo a caracterização química que permitam encontrar um possível uso para estas biomoléculas de interesse.



Figura 10. Pigmento resuspendido em agua destilada (esquerda). Pigmento suspendido no meio de cultura base (direita).

#### 4. CONCLUSÕES

Compostos nutricionais e fatores físicos, envolvidos no crescimento da espécie de *Burkholderia*, podem influenciar de forma positiva ou negativa na biomassa e na produção do pigmento.

O crescimento celular da bactéria foi favorecido pelo uso de glicose como fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, a uma temperatura de 20 e 25°C e um pH de 6.

As maiores produções de pigmento foram observadas quando a lactose foi utilizada como fonte de carbono, extrato levedura como fonte de nitrogênio, a uma temperatura de 20 e 25°C e um pH entre 6 e 7.

## 5. REFERÊNCIAS

CARRASCO Daniel Guillermo. Aislamiento e identificación de bacterias con capacidade degradadora de hidrocarburos, comprovando su actividad enzimática. Universidad San Francisco de Quito, Ecuador. 2007. p. 39.

COMPANT S. et al. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. Federation of european microbiological societies (FEMS). 2008. p. 607-626.

GARRITY George. Bergey's Manual of systematic bacteriology. The proteobacteria (part C). v. 2. 2005.

KARKI H. S. et al. Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA fingerprint among strains of *Burkholderia glumae*. Plos One. v. 7. n. 9. 2012.

KARKI H. S., BARPAGHA I. K. e HAM J. H. A conserved two-component regulatory system, PidS/PidR, globally regulates pigmentation and virulence-related phenotypes of *Burkholderia glumae*. Molecular plant pathology. v. 13. n. 7. 2012. p. 785-794.

KEITH K. E. et al. *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. Journal of bacteriology. v. 189. n. 24. 2007. p. 9057-9065.

LOUTET S.A. e VALVANO M.A. A decade of *Burkholderia cenocepacia* virulence determinant research. Infection and immunity. v. 78. n. 10. 2010. p. 4088-4100.

O'SULLIVAN L.A. e MAHENTHIRALINGAM E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. Letters in applied microbiology. v. 41. 2005. p. 8-11.

ZUGHAIER S. M., RYLEY H. C. e JACKSON S. K. A melanin pigment purified from an epidemic strain of *Burkholderia cepacia* attenuates monocyte respiratory burst activity by scavenging superoxide anion. Infection and immunity. v. 67. n. 2. 1999. p. 908-913.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

Tal como foi definido na literatura, fatores ambientais e nutricionais no crescimento de um microrganismo podem influenciar de forma direta na produção de metabolitos primários e secundários, como é o caso dos pigmentos. Os resultados deste estudo demonstraram que o crescimento celular foi influenciado de forma positiva utilizando a glicose e a sacarose como fontes de carbono. Estas são fontes de carbono comumente utilizadas em processos de fermentação, e apresentaram os melhores resultados para o crescimento celular das bactérias trabalhadas, porém não foram as fontes mais eficientes na produção de pigmentos. Estudos tem identificado um efeito de inibição ou diminuição da produção dos pigmentos produzidos por algumas espécies do gênero *Serratia* ao utilizar como fonte de crescimento a glicose. (ZANG *et al.* 2014; WEI e CHEN 2005).

Para *Serratia* sp. e *Microbacterium* sp. foi evidenciado que a fonte de carbono com melhores rendimentos para a produção de pigmento foi o amido solúvel, e no caso da *Burkholderia* sp. a lactose. O amido é o polissacarídeo mais importante de reserva vegetal, é uma das maiores moléculas encontradas na natureza (GUIMARÃES, 2011). Considerando que as bactérias apresentaram resultados relevantes na produção de pigmento utilizando o amido solúvel, sugere-se que esta e outras fontes de carbono complexas ou resíduos industriais com conteúdo de amido (fécula de batata, fécula de mandioca entre outros), podem ser utilizadas para produzir os pigmentos de interesse.

Na avaliação das fontes de nitrogênio, as três bactérias apresentaram os melhores resultados no crescimento celular e produção de pigmentos utilizando o extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Ao contrario das outras fontes de nitrogênio testadas, o extrato de levedura se encontra constituído por proteínas, nucleotídeos livres, sais e vitaminas fornecendo os componentes essenciais para o desenvolvimento adequado das bactérias. Além das vantagens que apresenta o extrato de levedura com relação aos nutrientes que o compõem, é um composto que pode ser produzido a partir de resíduos de indústrias de bebidas fermentadas entre outras matérias primas de baixo custo. Este fato pode ser aproveitado para produzir o extrato de levedura, servindo como fonte de crescimento ideal para a síntese de pigmentos por estes e outros microrganismos de interesse (RÉVILLION *et al.*, 2000).

Ambos os fatores ambientais testados, mostraram ter influência tanto no crescimento das bactérias quanto à produção dos pigmentos. Mesmo as bactérias tenham apresentado

crescimento na maioria das temperaturas e pH testados, houveram faixas onde o crescimento celular e a síntese de pigmentos foi maior. No caso da temperatura, as bactérias exibiram melhores resultados em temperaturas de 20-30°C. Quando a temperatura foi aumentada, a quantidade de pigmento diminuía de forma significativa.

O teste de pH mostrou resultados um pouco mais variados entre as três bactérias trabalhadas. No caso da *Serratia marcescens*, o pH no qual o crescimento celular e a produção de pigmento resultou melhor, foi entre 7 e 8. A *Burkholderia* sp. mostrou melhores resultados em um pH entre 6 e 7, e a *Microbacterium* sp. em uma faixa um pouco mais ampla que variou desde 6 a 9.

Muitos estudos têm sido feitos com relação às espécies de *Serratia* produtoras de pigmentos devido à importância comercial destes compostos, no entanto poucos trabalhos foram encontrados dos pigmentos de gêneros como *Microbacterium* e *Burkholderia*. Devido às limitações do estudo não foi possível caracterizar os pigmentos obtidos das bactérias trabalhadas, pelo qual é difícil indicar uma aplicação direta para os compostos produzidos por elas. As pesquisas levantadas sugerem que os pigmentos estão presentes nos microrganismos por vários motivos. Pigmentos como os carotenoides, são antioxidantes que podem proteger o organismo contra várias espécies reativas de oxigênio (mohammadi *et al.*, 2012), outros estudos tem sugerido que a pigmentação fornece virulência em certas espécies microbianas que lhes permite tolerar o estresse ambiental (KARKI *et al.*, 2012), ou que jogam um papel de defesa contra predadores exibindo atividade antibiótica e antimicrobiana (SOLIEV *et al.*, 2011). Por estes e outros motivos, os pigmentos microbianos são um alvo de pesquisa importante.

. O cenário para o uso de pigmentos microbianos nas distintas áreas de interesse destaca a importância de procurar estratégias para produções em grande escala, novas estirpes de microrganismos produtores de pigmentos, e processos e meios para a obtenção de rendimentos altos, como foi o caso das avaliações dos fatores físicos e químicos realizados. A extração e purificação dos pigmentos continuam sendo um desafio, sendo que características como a pigmentação intracelular adiciona a etapa de rompimento celular no processo de extração (NIGAM; LUKE, 2016).

## **7. CONCLUSÕES GERAIS**

Os testes desenvolvidos foram capazes de determinar que compostos nutricionais e fatores físicos, envolvidos no crescimento de três espécies de bactérias diferentes, podem influenciar de forma positiva ou negativa na biomassa e na produção do pigmento.

Foi comprovado que nem sempre os melhores parâmetros para o crescimento celular são os mais favoráveis para a produção do pigmento. Estes resultados podem ser utilizados para obter melhores rendimentos na produção do pigmento de interesse.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABEROUMAND A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *World journal of dairy & food sciences*. v. 6. n. 1. p. 71-78. 2011.
- ALIHOSSEINI F. *et al.* Antibacterial colorants: Characterization of prodiginines and their applications on textile materials. *Biotechnology Progress*, v. 24, n. 3, 2008.
- BABITHA S. Microbial Pigments. *Biotechnology for Agro-industrial residues utilization*. Editorial Springer, Capitulo 8, p. 147-160, 2009.
- DUFOSSÉ L. *et al.* Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in food science & technology*. n.16. 2005. p. 389-406.
- GROSSART Hans-Peter *et al.* Production of a blue pigment (Glaukothalin) by marine *Rheinheimera* spp. *International Journal of microbiology*.ID701735, 2009.
- INSUMOS. Os corantes alimentícios: Revista aditivos ingredientes. Ed. Insumos LTDA. n. 62, maio/junho 2009, p. 28-39.
- KARKI H. S. *et al.* Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA fingerprint among strains of *Burkholderia glumae*. *Plos One*. v. 7. n. 9. 2012.
- KUMAR A. *et al.* Microbial pigments: production and their applications in various industries. *International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences*. v. 5.. n. 1. 2015. p. 203-212.
- KURBANOGLU E. B. *et al.* Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. *Brazilian Journal of microbiology*. v. 46. n. 2. 2015. p. 631-637.
- LAPENDA Jeanne Cristina. Produção e caracterização de prodigiosina isolada de *Serratia marcescens* UCP 1549. Dissertação programa de Pós-graduação em ciências biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. 2010. p. 43

- LATHA B. V. *et al.* Influence of growth factor on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. Indian journal of biotechnology. v. 4. 2005. p 353-357.
- LIU G. e NIZET V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. Trends in microbiology, v. 19, n. 9, 2009. p. 406-413.
- LIU J. *et al.* Chinese red yeast rice (*Monascus purpureus*) for primary hyperlipidemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. Chinese medicine. v. 1. n. 4. 2006.
- MOHAMMADI M., BURBANK L. e ROPER M. C.. Biological role of pigment production for the bacterial phytopathogen *Pantoeastewartii* subsp. *Stewartii*. Applied and environmental microbiology. v. 78, n. 19, 2012. p. 6859-6865.
- MUKHERJEE G. e SINGH S. K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. Process Biochemistry. v. 46. 2011 p. 188-192.
- NUGRAHENI *et al.* Characterization of carotenoid pigments from bacterial symbionts of seagrass *Thalassia hemprichii*. Journal of coastal development. v. 14. n. 1. 2010. p. 51-60.
- OTTERSTÄTTER Gisbert. Coloring of food, drugs, and cosmetics. Marcel Dekker, Inc. Estados Unidos, 1999.
- PEREIRA David M.; VALENTÃO Patrícia; ANDRADE Paula B. Marine natural pigments: Chemistry, distribution and analysis. Dyes and Pigment. vol. 111, p. 124-134, 2014.
- PRADO M. A. e GODOY H. T. Corantes artificiais em alimentos. Alimentos e nutrição, Araraquara. v.14, n.2. 2003. p. 237-250.
- RASHID M. *et al.* Anti-bacterial activity of pigments isolated from pigment-forming soil bacteria. British Journal of pharmaceutical research, v. 4, n. 8. 2014. p.880-894.
- RODRIGUEZ D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. Universidade Estadual de Campinas, SP. Teses. 2001.

- SOLIEV A. B., HOSOKAWA K. e ENOMOTO K. Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2011.
- VALDUGA E. *et al.* Produção de carotenoids: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Quimica nova*. v. 32. n. 9. 2009. p. 2429-2436.
- VELMURUGAN P. *et al.* Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 109, n.4, p. 346-350, 2010.
- VENIL C. K.; ZAKARIA Z. A. e AHMAD W. A. Bacterial pigments and their applications (Review). *Process biochemistry*, v. 48, p.1065-1079. 2013.
- VENIL C. K. *et al.* Isolation and characterization of flexirubin type pigment from *Chryseobacterium* sp. UTM-3<sup>T</sup>. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2014.
- VIKAS S, *et al.* Isolation and characterization of pigment producing bacteria from various foods for their possible use as biocolours. *International Journal of recent scientific research*, v. 4, n. 10, p. 1605-1609, 2013.
- WATERS Christopher e Bassler Bonnie. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell and developmental biology*. v. 21. 2005. p. 319-346.
- WEI e CHEN. Enhanced production of prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMAR by medium improvement and oil-supplementation strategies. *Journal of bioscience and bioengineering*. v. 99. n. 6. 2005. p. 616-622.
- YUANG Lu *et al.* Production of violet pigment by a new isolated psychotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochemical Engineering Journal*, v. 43, p. 135-141, 2009.
- ZANG *et al.* Identification and enhanced production of prodigiosin isoform pigment from *Serratia marcescens* N10612. *Journal of the Taiwan Institute of chemical engineers*. v. 45. 2014. p. 1133-1139.



## 9. ANEXOS

Tabela 3. Efeito dos parâmetros nutricionais e físicos no crescimento celular e produção de pigmento por *Serratia marcescens*

Testes		Crescimento celular	Produção de pigmento
		Absorbância	Absorbância
<b>Fontes de carbono</b>	Sacarose	4,030 a	0,131 c
	Glicose	3,651 a	0,047 d
	Amido Solúvel	2,658 b	0,643 a
	Lactose	2,387 b	0,296 b
	Extrato de malte	1,448 d	0,256 b
<b>Fontes de nitrogênio</b>	Cloreto de amônio	0,773 b	0,088 b
	Sulfato de amônio	0,685 b	0,069 c
	Extrato de levedura	2,017 a	0,368 a
	Ureia	0,007 d	0,007 d
	Nitrato de sódio	0,283 c	0,013 d
<b>Temperaturas</b>	20°C	1,756 bc	0,020 c
	25°C	2,741 a	0,391 a
	30°C	1,940 b	0,259 b
	35°C	1,623 c	0,017 c
	40°C	0,950 d	0,014 c
<b>pH</b>	pH 6,0	1,803 b	0,052 bc
	pH 7,0	2,172 a	0,084 b
	pH 8,0	1,966 ab	0,182 a
	pH 9,0	1,527 c	0,061 bc
	pH 10,0	1,171 d	0,034 c

Medias na coluna, para cada tratamento, seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4. Crescimento celular e produção do pigmento por *Serratia marcescens* nas diferentes idades do cultivo.

Testes	Crescimento celular			Produção de pigmento		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
	Absorbância			Absorbância		
<b>Fontes de carbono</b>	2,832 a	2,828 a	2,833 a	0,337 a	0,281 b	0,206 c
<b>Fontes de nitrogênio</b>	0,737 a	0,739 a	0,784 a	0,154 a	0,106 b	0,067 b
<b>Temperaturas</b>	2,092 a	1,805 b	1,508 c	0,176 a	0,130 ab	0,115 b
<b>pH</b>	1,529 c	1,922 a	1,732 b	0,033 b	0,122 a	0,093 a

Medias na coluna, para cada tratamento, seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5. Efeito dos parâmetros nutricionais e físicos no crescimento celular e produção de pigmento por *Microbacterium* sp.

Testes		Crescimento Celular	Produção de pigmento
		Absorbância	Absorbância
<b>Fontes de carbono</b>	Sacarose	4,207 a	0,088 c
	Glicose	3,674 b	0,069 c
	Amido Solúvel	2,672 c	0,222 a
	Lactose	2,312 cd	0,145 b
	Extrato de malte	2,077 d	0,060 c
<b>Fontes de nitrogênio</b>	Cloreto de amônio	0,137 b	0,012 b
	Sulfato de amônio	0,144 b	0,011 b
	Extrato de levedura	1,404 a	0,130 a
	Ureia	0,064 b	0,005 b
	Nitrato de sódio	0,061 b	0,006 b
<b>Temperaturas</b>	20°C	0,496 b	0,044 a
	25°C	0,855 a	0,041 a
	30°C	0,842 a	0,050 a
	35°C	0,518 b	0,022 b
	40°C	0,492 b	0,027 b
<b>pH</b>	pH6	0,624 a	0,030 a
	pH 7	0,560 a	0,030 a
	pH 8	0,511 ab	0,029 a
	pH 9	0,418 b	0,028 a
	pH 10	0,154 c	0,007 b

Medias na coluna, para cada tratamento, seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6. Crescimento celular e produção do pigmento nas diferentes idades do cultivo.

Testes	Crescimento celular			Produção de pigmento			
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
		Absorbância			Absorbância		
<b>Fontes de carbono</b>	1,603 b	3,692 a	3,669 a	0,054 b	0,138 a	0,158 a	
<b>Fontes de nitrogênio</b>	0,196 b	0,169 b	0,721 a	0,012 b	0,015 b	0,071 a	
<b>Temperaturas</b>	0,717 a	0,614 b	0,590 b	0,029 b	0,039 a	0,041 a	
<b>pH</b>	0,464 ab	0,502 a	0,393 b	0,013 c	0,028 b	0,035 a	

Medias na coluna, para cada tratamento, seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7. Efeito dos parâmetros nutricionais e físicos no crescimento celular e produção de pigmento por *Burkholderia* sp.

Testes	Crescimento Celular		Produção de pigmento
<b>Fontes de carbono</b>	Sacarose	4,233 bc	0,083 b
	Glicose	10,259 a	0,048 cd
	Amido Solúvel	4,007 c	0,063 bc
	Lactose	5,547 b	0,128 a
	Extrato de malte	2,105 d	0,021 d
<b>Fontes de nitrogênio</b>	Cloreto de amônio	1,927 b	0,017 b
	Sulfato de amônio	2,307 b	0,014 b
	Extrato de levedura	4,275 a	0,085 a
	Ureia	0,149 c	0,016 b
	Nitrato de sódio	0,496 c	0,021 b
<b>Temperaturas</b>	20°C	4,727 ab	0,115 a
	25°C	5,262 a	0,122 a
	30°C	3,583 bc	0,073 b
	35°C	3,400 c	0,032 c
	40°C	0,022 d	0,004 d
<b>pH</b>	pH6	1,696 a	0,047 ab
	pH 7	1,249 b	0,057 a
	pH 8	1,107 b	0,041 b
	pH 9	0,042 c	0,009 c
	pH 10	0,002 c	0,002 c

Medias na coluna, para cada tratamento, seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 8. Crescimento celular e produção do pigmento nas diferentes idades do cultivo.

Testes	Crescimento celular			Produção de pigmento		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<b>Fontes de carbono</b>	3,783 b	6,328 a	5,580 a	0,028 b	0,084 a	0,094 a
<b>Fontes de nitrogênio</b>	2,041 a	1,648 a	1,803 a	0,022 b	0,033 a	0,038 a
<b>Temperaturas</b>	2,629 b	4,234 a	3,334 b	0,025 b	0,093 a	0,090 a
<b>Ph</b>	0,256 c	1,221 a	0,981 b	0,004 c	0,041 b	0,049 a

Medias na coluna, para cada tratamento, seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.