

## **PRODUÇÃO DE PIGMENTOS A PARTIR DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO CULTIVO DE MICRORGANISMO FOTOSSINTETIZANTE**

**Bruna Nagamine Zanini**

**Eleane de Almeida Cezare-Gomes**

**Marina Ishii**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

bruna.nzanini@usp.br

### **Objetivos**

Pigmentos naturais são metabólitos secundários produzidos durante o crescimento de microrganismos, sendo que são modulados pelas condições de crescimento [1].

Os pigmentos obtidos a partir de bactérias são estratégicos do ponto de vista de produção, devido ao ciclo de vida relativamente curto destes microrganismos, à facilidade de manipulação genética e considerável resistência a variações de condições ambientais<sup>[2]</sup>.

O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias a partir do meio residual de cultivo de microrganismo fotossintetizante, identificá-las, obter e extrair os pigmentos produzidos por estas bactérias.

### **Métodos e Procedimentos**

Realizou-se cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* em agitador orbital 100 rpm, luminosidade 50  $\mu\text{mol fôtons. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , a 21 ( $\pm 1$ ) °C durante 30 dias. Foram adicionados 3,3L de meio Bold e 0,2L de inóculo em fotobiorreator, cultivando-as a 21°C, em ciclos de claro/escuro (12h/12h) e pH 7,0 ajustado com injeção de gás carbônico.

Para análise das bactérias presentes no meio residual, foram coletadas amostras de

meio residual de *H. pluvialis* (fases verde e vermelha).

Aliquotas de 1mL das amostras foram inoculadas em 2mL de TSB e incubadas a 37°C em estufa por até 3 dias. As amostras que apresentaram crescimento foram estriadas em placas de Petri com 20mL de PCA e mantidas em estufa a 37°C por até 48h. As colônias isoladas obtidas foram identificadas com extração, amplificação da região 16S do DNA e sequenciamento de Sanger.

Para conservação das cepas, as colônias previamente selecionadas foram inoculadas em 2mL de TSB e mantidas em estufa a 37°C por até 2 dias, sendo submetidas à crioproteção com glicerol (20% do volume).

Inoculou-se alíquota de 200  $\mu\text{L}$  da cultura de cada bactéria em 2mL de TSB, mantido em estufa a 37°C por 24h. Realizou-se o repique para tubos contendo meio ágar inclinado à base de caseína hidrolisada e peptona, os quais foram incubados em estufa a 37°C por 24h. Cada tubo de meio inclinado foi lavado com 5mL de solução salina, de modo que a suspensão de células foi transferida para frascos com pérolas e barra de agitação magnética e agitada a 600 rpm por 15 minutos.

Inoculou-se 1 mL da suspensão de células em Erlenmeyers contendo 100 mL de meio caldo King's A mantidos em estufa ou shaker (100 rpm) por até 3 dias a 37°C.

As culturas foram submetidas à centrifugação (4000 rpm, 30 min) e o sobrenadante recolhido para extração dos pigmentos com clorofórmio. A 10 mL de sobrenadante foi adicionado igual volume de clorofórmio, sendo agitado em vórtex por 4 minutos. A fase orgânica foi transferida para novo tubo de centrifuga e adicionou-se 2 mL de HCl 0,2 M, seguido de agitação em vórtex por 1 minuto. Com auxílio de seringa e agulha, separou-se a fase aquosa na qual encontra-se o pigmento, sendo dispensada em um vial.

## Resultados

As bactérias isoladas do cultivo de *H. pluvialis* foram identificadas como *Pseudomonas alcaligenes* na fase verde e *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudacidovorax intermedius* e *Achromobacter xylosoxidans* na fase vermelha.

As culturas de bactérias do gênero *Pseudomonas* em meio ágar inclinado à base de caseína hidrolisada resultaram em coloração verde fluorescente para uma das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 1). Tal coloração pode ser associada à produção de pioverdina pelas células.

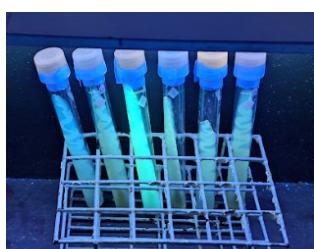


Figura 1 - Cultivos de *Pseudomonas sp.* em meio ágar à base de caseína hidrolisada vistos sob radiação UV (Fonte: autor)

Após adição de clorofórmio e agitação, os extratos dos sobrenadantes provenientes dos cultivos de uma das cepas de *P. aeruginosa* em meio caldo King's A apresentaram coloração azul na fase orgânica.

A expressão de pigmentos foi proporcional ao tempo de incubação e favorecida pela agitação em shaker. Após a adição de ácido, o pigmento migrou para a fase aquosa e adquiriu coloração avermelhada (Figura 2). Tal observação coincide com as descrições do pigmento piocianina.

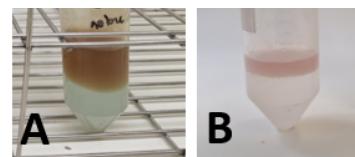


Figura 2 - Extração de piocianina de cultivos de *P. aeruginosa*. A - Sobrenadante do cultivo com clorofórmio após agitação, B - Fase orgânica acrescida de HCl 0,2 M após agitação (Fonte: autor).

## Conclusões

Foi possível isolar e identificar bactérias presentes em cultivos de *H. pluvialis*, sendo identificadas cepas do gênero *Pseudomonas*, as quais produziram pigmentos que foram extraídos.

## Agradecimentos

Agradeço ao Programa PUB-USP pela bolsa de estudos concedida.

## Referências

- [1] AGARWAL, H., et al. Bacterial pigments and their multifaceted roles in contemporary biotechnology and pharmacological applications. *Microorganisms*, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms1103061>

- [2] CELEDÓN, R.S.; DÍAZ, L.B., Natural pigments of bacterial origin and their possible biomedical applications. *Microorganisms* 2021, 9, 739. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040739>