

# Prospecção, seleção e identificação de bactérias produtoras de corantes

*Gláucia Emy Okida Midorikawa*<sup>1</sup>, *Larissa Carmona Zonta Santos*<sup>2</sup>,  
*Patrícia Abrão de Oliveira*<sup>3</sup>, *Léia Cecília de Lima Fávoro*<sup>4</sup>

## Resumo

Os corantes naturais podem ser extraídos de uma variedade de plantas, animais e microrganismos. A maioria dos corantes naturais utilizados para diferentes fins é produzida a partir de plantas, entretanto, pigmentos extraídos de plantas para uso industrial possuem o gargalo da produção, estabilidade e custo. Uma alternativa mais sustentável para a produção de corantes naturais é a via biotecnológica utilizando microrganismos. O conhecimento de técnicas de cultivo, processamento e facilidade de manipulação, tornam a produção de corantes por microrganismos em larga escala um atrativo para a indústria de cosméticos, de alimentos, têxtil, de pintura, entre outras. Este trabalho apresenta a prospecção de uma coleção de bactérias associadas a plantas nativas e cultivadas de diferentes biomas quanto a sua capacidade de produzir corantes. A prospecção foi inicialmente realizada em dois meios de cultura sólidos, sendo selecionadas linhagens produtoras de colônias intensamente coloridas nas tonalidades de amarelo, rosa, vermelho e marrom em pelo menos um dos meios avaliados. A partir das linhagens de bactérias pré-selecionadas foram escolhidas 6 linhagens (Bioenzi B-132A, Bioenzi B-480A, Bioenzi B-586, Bioenzi B-648, Bioenzi B-652 e Bioenzi B-584) para avaliação da produção de corantes em condições de fermentação submersa em diferentes meios de cultura líquidos. A linhagem Bioenzi B-480A (*Serratia marcescens*) destacou-se por ser capaz de produzir corante vermelho intenso em meio NB já nas primeiras 6 h após a inoculação, intensificando a coloração nas horas subsequentes de cultivo (24, 48, 72h). A identificação taxonômica das bactérias selecionadas revelou novas linhagens de *Sphingomonas endophytica*, *Serratia marcescens*, *Streptomyces olivaceus*, *Luteibacter yejuensis*, *Brevibacterium siliguriense* e *Curtobacterium luteum* com potencial para serem futuramente caracterizadas quanto a identidade de seus metabólitos secundários visando a descoberta de novos corantes naturais com aplicação industrial.

**Palavras-chave:** bioprospecção, bactérias endofíticas, corantes naturais, metabólitos secundários.

## Introdução

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento na demanda pela troca de pigmentos sintéticos por pigmentos naturais devido a conscientização do consumidor por produtos ecológicos e sustentáveis. Os pigmentos oriundos de processos ecológicos e

<sup>1</sup> Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, [glaucaemy@gmail.com](mailto:glaucaemy@gmail.com)

<sup>2</sup> Farmacêutica, especialista em Cosmetologia, Grupo Boticário, [larissa.zonta@grupoboticario.com.br](mailto:larissa.zonta@grupoboticario.com.br)

<sup>3</sup> Farmacêutica, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, [patricia.oliveira@embrapa.br](mailto:patricia.oliveira@embrapa.br)

<sup>4</sup> Bióloga, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, [leia.favaro@embrapa.br](mailto:leia.favaro@embrapa.br)

que resultam em um bioproduto, além de aumentar a comercialização do produto, pode possuir propriedades de atividade biológica como as ações anticâncer e antioxidantes (Tuli et al., 2015).

Os pigmentos naturais podem ser extraídos de uma variedade de plantas, animais e microrganismos, entretanto, pigmentos extraídos de plantas para uso industrial, possuem o gargalo da produção e custo. Já os pigmentos extraídos a partir de microrganismos (fungos, leveduras, bactérias) são fontes em potencial, conhecidos por produzirem uma variedade de pigmentos, de fácil escalonamento e baixo custo de produção (Galaffu, et al., 2015), sendo promissores como fonte de pigmentos para cosméticos. A fermentação é uma estratégia importante e muito utilizada na obtenção dos pigmentos de microrganismos. Ela pode ser por meio de cultivos de fermentação estado sólido (SSF) ou fermentação submersa (SmF), onde fatores como: temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio, tipo de fermentação, minerais e taxa de aeração, podem influenciar na produção de pigmentos (Kumar et al., 2015).

Diversos grupos de bactérias, fungos, leveduras e algas têm sido amplamente estudados pelo seu potencial como fonte de pigmentos (Malik et al., 2012). As bactérias podem produzir uma variedade de pigmentos como, os carotenoides, melaninas, violaceína, prodigiosina, piocianina, actinorodina e zeaxantina (Venil et al., 2014). Além da ampla variedade de pigmentos, as bactérias apresentam ciclo de vida curto e fácil manipulação, características vantajosas para uso em escala industrial. Dentre os microrganismos presentes no banco de dados de germoplasma da Embrapa, oriundo de diversos nichos ecológicos, estão presentes cepas de bactérias de diversas cores e biomas brasileiros.

## Material e Métodos

As bactérias avaliadas quanto à capacidade de produzir corantes foram coletadas em diversos ambientes (endofíticas, epifíticas e da rizosfera) e associadas a plantas de diferentes regiões e biomas do Brasil. As linhagens encontravam-se preservadas na “*Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias*” (CMMAABio) da Embrapa Agroenergia.

A estratégia de prospecção de bactérias produtoras de corantes foi baseada no cultivo em 2 meios de cultura sólidos, seguido de seleção de linhagens promissoras e cultivo em diferentes meios líquidos. Na etapa de prospecção em meio sólido, os meios utilizados foram: Tryptic Soy Agar – TSA (Sigma-Aldrich) e Luria Bertani Agar – LBA (Composição por Litro: 10 g de triptona; 5 g de extrato de levedura; 10 g de NaCl; 15 g de ágar bacteriológico; pH 7,2). As bactérias avaliadas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C na ausência de luz por 7 dias. A avaliação das colônias quanto à coloração das células foi realizada após 3 e 7 dias de incubação por inspeção visual.

A análise da produção de corantes em fermentação submersa foi realizada nos meios Tryptic Soy Broth – TSB (Difco), Luria Bertani Broth Lennox – LB (Sigma-Aldrich) e Nutrient Broth – NB (Difco). O pré -inóculo foi realizado no meio líquido correspondente (TSB, LB e NB) com incubação à 28°C, 200 rpm por 16 h. Após o período de incubação cada linhagem foi inoculada (em triplicata) em um volume final de 50 mL do respectivo meio obtendo-se  $OD_{600nm}$  inicial igual a 0,1. Os inóculos foram incubados a 28°C, 180 rpm. As

curvas de crescimento foram obtidas a partir de medições da OD<sub>600nm</sub> realizadas a cada 2 h no intervalo de 8 h, seguidas de medições após 24, 48 e 72 h de cultivo.

A linhagem *Streptomyces* sp. Bioenzi B-584, devido às suas características morfológicas (bactéria filamentosa), teve o seu crescimento avaliado por meio de medição da biomassa seca em 6 diferentes meios de cultura: Tryptic Soy Broth – TSB (Difco), Luria Bertani Broth Lennox – LB (Sigma-Aldrich), Nutrient Broth – NB (Difco), Mueller Hinton Broth – MH (Difco), M9 Broth - M9 (Fluka) e Peptone Yeast Extract Iron Broth (ISP Medium n° 6) (Tresner; Danga, 1958). A inoculação nos meios líquidos (em triplicata) foi realizada com três discos (8 mm) recortados da cultura crescida em placas completamente preenchidas de colônias. Os frascos foram incubados a 28°C, 180 rpm, por 7 dias. Ao final do cultivo a biomassa bacteriana foi recuperada e seca em estufa por 3 dias à 60°C. Os valores obtidos (três repetições) para o peso seco da massa bacteriana foram submetidos à análise estatística.

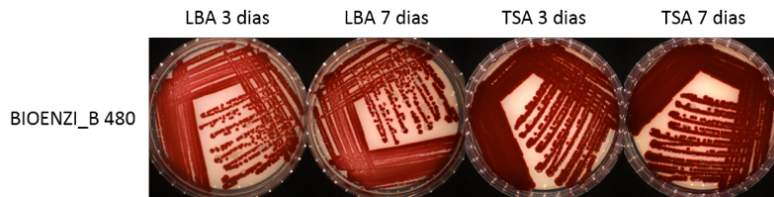
O DNA genômico das bactérias selecionadas foi extraído com o Puregene® Yeast/Bact. Kit B (Qiagen). As reações de PCR foram realizadas utilizando como molde a região 16S do DNA ribossômico (Lane, 1999) das bactérias selecionadas. Cada reação foi conduzida em 50 µL de volume final contendo: 20ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada *primer* P0 (27F) e R1378, 1 X do Tampão da Taq (Promega), 2,0 U da Taq polimerase (Promega), 0,2 mM de dNTPs e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. As condições de amplificação utilizadas em termociclador (Applied Biosystems) foi iniciada por 94°C por 4 min; seguida de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 30 seg, 67°C por 1 min, 72°C por 1 min; extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram submetidas à purificação, utilizando o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). As sequências foram analisadas com auxílio do software Geneious R11 (<https://www.geneious.com>) para verificação da qualidade e obtenção das sequências consenso. As sequências de boa qualidade foram analisadas com a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) contra diferentes bases de dados indicadas para identificação de bactérias, tais como GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/>).

## Resultados e Discussão

Os resultados da prospecção em meio sólido mostraram que todas as 332 bactérias estavam viáveis e a maioria delas estava pura. Das 332 linhagens avaliadas, 26 produziram colônias intensamente coloridas nas tonalidades de amarelo, rosa, vermelho e marrom em pelo menos um dos meios avaliados (LBA e TSA). Em geral, as bactérias produziram pigmentação intracelular, com exceção a bactéria *Streptomyces* sp. Bioenzi B-584, que além de apresentar colônias de cor marrom/castanha, também secretou compostos de cor marrom/castanha ao redor das colônias.

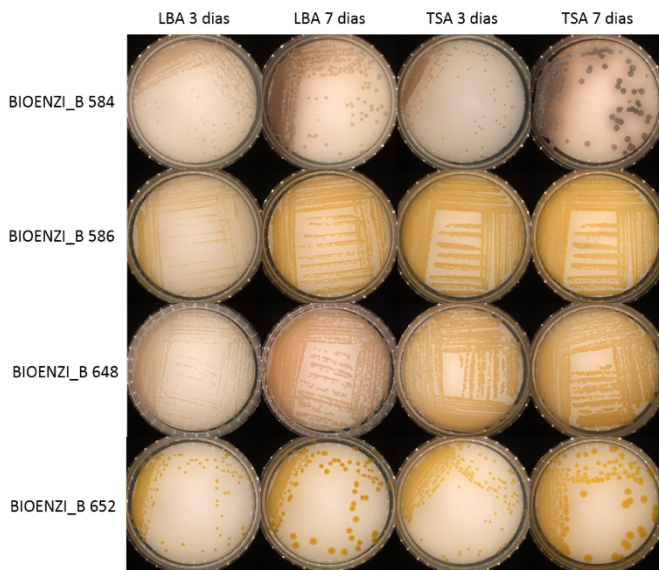
Das 26 bactérias coloridas pré-selecionadas na etapa de prospecção em meio sólido, foram selecionadas 6 linhagens (Figuras 1 e 2) para avaliação da produção de corantes em condições de fermentação submersa (Bioenzi B-132A, Bioenzi B-480A, Bioenzi B-586, Bioenzi B-648, Bioenzi B-652 e Bioenzi B-584) (Figura 3). A linhagem Bioenzi B-132A não apresentou crescimento no pré-inóculo, portanto não foi cultivada na fermentação submersa.

Foto: Gláucia Emy Okida Midorikawa



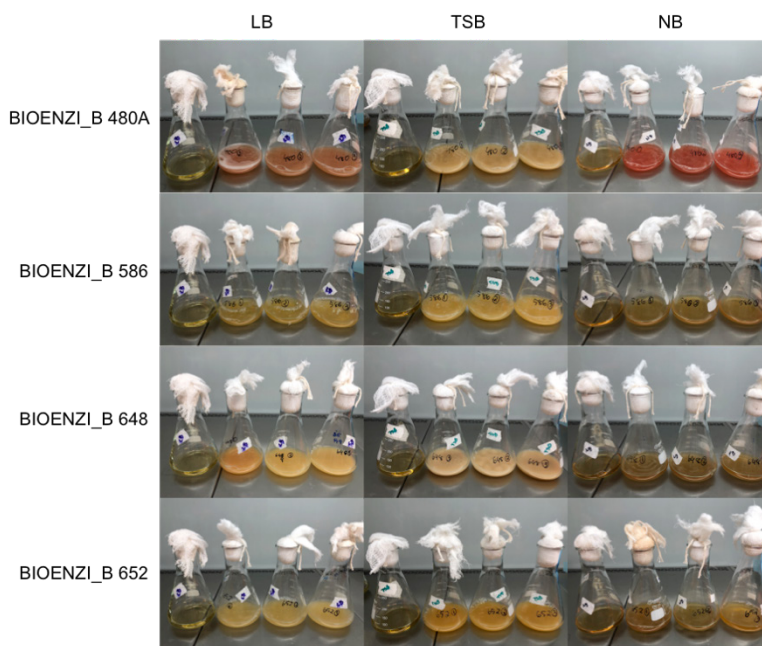
**Figura 1.** Linhagem de bactéria *Serratia marcescens* Bioenzi B-480A selecionada pela capacidade de produzir colônias de coloração vermelha intensa em meio de cultura sólido. A figura mostra o aspecto do crescimento nos meios sólidos LBA e TSA após 3 e 7 dias de cultivo à 28°C na ausência de luz.

Foto: Gláucia Emy Okida Midorikawa



**Figura 2.** Linhagens de bactérias *Streptomyces* sp. Bioenzi B-584, Bioenzi B-586, Bioenzi B-648 e Bioenzi B-652 selecionadas pela capacidade de produzir colônias de coloração marrom (*Streptomyces* sp. Bioenzi B-584) e amarela (Bioenzi B-586, Bioenzi B-648 e Bioenzi B-652) em meio sólido. A figura mostra o aspecto do crescimento nos meios sólidos LBA e TSA após 3 e 7 dias de cultivo a 28°C na ausência de luz.

Foto: Gláucia Emy Okida Midorikawa



**Figura 3.** Aspecto visual do crescimento durante 72 horas (28°C, 180 rpm, na ausência de luz) das bactérias selecionadas Bioenzi B-480A, Bioenzi B-586, Bioenzi B-648 e Bioenzi B-652 nos meios Tryptic Soy Broth (TSB), Luria Bertani Broth (LB) e Nutrient Broth (NB). O controle (meio sem inóculo) é mostrado do lado esquerdo das imagens.

A linhagem *Serratia marcescens* Bioenzi B-480A apresentou coloração avermelhada no meio de cultura NB nas primeiras 6 h após a inoculação, intensificando demasiadamente essa coloração nas horas subsequentes de cultivo (24, 48, 72 h). Em 24 h após a inoculação a mesma linhagem apresentou coloração avermelhada no meio LB. No entanto, no meio TSB (Difco, o qual contém glicose na composição) a produção de corante não foi observada mesmo após 72 h de cultivo. Vale ressaltar que no meio sólido TSA (Sigma-Aldrich, o qual não tem glicose na sua composição) essa linhagem produziu colônias intensamente coloridas com 72 h dias de cultivo. De fato, a presença de glicose em alguns meios de cultivo leva a uma diminuição na produção ou inibe a produção de corantes vermelhos por *Serratia marcescens* provavelmente devido ao mecanismo de repressão catabólica por glicose (Darshan et al., 2015).

As linhagens Bioenzi B-586, Bioenzi B-648 e Bioenzi B-652 apresentaram coloração amarelada, levemente amarela/alaranjada e amarelada nos meios TSB, LB e TSB, respectivamente, ao final das 72 h de cultivo. De acordo com os valores de absorvância foi traçado um perfil de crescimento, onde foi possível concluir que a linhagem *Serratia marcescens* Bioenzi B-480A teve um crescimento mais rápido nos três meios de cultura (NB, TSB e LB), quando comparada com as linhagens Bioenzi B-586; Bioenzi B-648; Bioenzi B-652.

A linhagem *Streptomyces* sp. Bioenzi B-584 foi selecionada por produzir colônias de coloração castanha/marrom principalmente no meio TSA (Sigma-Aldrich) e também por ser a única bactéria selecionada capaz de secretar corantes no meio sólido. Por ser uma bactéria filamentosa, o perfil de crescimento em diferentes meios líquidos foi avaliado pela determinação de peso seco da biomassa bacteriana, ao invés de medições da absorvância. Não foi observada coloração visível das células ou do sobrenadante em nenhum dos meios (TSB, LB, NB, MH, M9 e ISP), embora uma tonalidade levemente alaranjada/acastanhada tenha sido observada no cultivo em TSB após 7 dias. A ausência de produção de compostos melanoides pela linhagem Bioenzi B-584 nos meios líquidos avaliados, pode estar relacionada a diferente composição do meio TSA (peptona de caseína, peptona de soja e cloreto de sódio), meio em que foi observada colônias de coloração castanha/marrom. A medição do peso seco da biomassa bacteriana obtida após 7 dias de cultivo nos 6 diferentes meios mostrou que os meios que melhor estimularam o crescimento e formação de biomassa da bactéria *Streptomyces* sp. Bioenzi B-584 foram ISP Medium 6, o qual é um meio específico para *Streptomyces*, MH e TSB, os quais são amplamente usados para cultivo de bactérias.

A fim de caracterizar de maneira mais detalhada, as 6 linhagens de bactérias coloridas selecionadas da biodiversidade brasileira, tiveram a sua identidade taxonômica revelada a partir da região 16S do DNA ribossômico (1.500 pb). De acordo com diferentes bases de dados, GenBank (Type strain e Nucleotide database) e RDP (Classifier tool), as linhagens foram classificadas como: Bioenzi B-132A (*Sphingomonas endophytica*), Bioenzi B-480A (*Serratia marcescens*), Bioenzi B-584 (*Streptomyces olivaceus*), Bioenzi B-586 (*Luteibacter yejuensis*), Bioenzi B-648 (*Brevibacterium siliguriense*) e Bioenzi B-652 (*Curtobacterium luteum*). Todas as sequências apresentaram homologia de 99-100% de identidade com os bancos de dados.

Dentre as linhagens promissoras, a *Serratia marcescens* Bioenzi B-480A, é conhecida pela produção de metabólitos da família das prodigiosinas, que conferem a coloração avermelhada típica dessa espécie, são insolúveis em água e possuem ampla aplicação biotecnológica (Darshan et al., 2015). A produção da coloração avermelhada pela

linhagem *Serratia marcescens* Bioenzi B-480A na fase inicial do cultivo em meio NB é um diferencial, visto que é reconhecido que a produção de prodigiosinas por *Serratia* spp. ocorre na fase estacionária de crescimento (Harris et al., 2004).

A linhagem *Streptomyces olivaceus* Bioenzi B-584 foi selecionada pela capacidade de produzir células de cor marrom e por secretar compostos marrons no meio TSA. A secreção de compostos marrons, como a melanina e similares, é típica do gênero *Streptomyces* e é um critério taxonômico desse grupo. Diferentes espécies de *Streptomyces* produzem melanina e compostos semelhantes. Embora não existam estudos detalhados sobre a produção de melaninas por *Streptomyces olivaceus* e sua caracterização química, essa espécie possui em seu genoma um *cluster* gênico responsável pela síntese de melanina (ZHANG et al., 2019). Além disso, esse actinomiceto produz dezenas de antibióticos conhecidos, muitos de uso comercial, bem como químicos de importância para bioeconomia, como ácidos orgânicos diversos.

As linhagens Bioenzi B-132A (*Sphingomonas endophytica*), Bioenzi B-586 (*Luteibacter yejuensis*), Bioenzi B-648 (*Brevibacterium siliguriense*) e Bioenzi B-652 (*Curtobacterium luteum*), selecionadas por apresentar cor em diferentes tonalidade de amarelo nos meios TSA e LBA, possuem poucos estudos com ênfase na produção de carotenoides (Forquin-Gomez et al., 2014).

## Conclusão

Os resultados da triagem de bactérias, tanto em meio sólido como em meio líquido, revelaram várias linhagens com potencial para serem investigadas quanto à extração dos metabólitos secundários e investigação da identidade química dos corantes produzidos. Essas linhagens também são candidatas para o desenvolvimento de bioprocessos visando aumento da produção de corantes de interesse.

## Agradecimentos

Este projeto obteve apoio financeiro do Grupo Boticário, Embrapii e Embrapa.

## Referências

- DARSHAN N, MANONMANI HK. (2015) Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol*. 52:5393-5407.
- FORQUIN-GOMEZ MP., WEIMER B.C., SORIEUL L., KALINOWSKI J., VALLAEYS T. (2014) *The Family Brevibacteriaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- GALAFFU N, BORTLIK K, MICHEL M. (2015). An industry perspective on natural food colour stability. *Colour additives for foods and beverages*. Woodhead Publishing Series in Food Science, *Technology and Nutrition*. p. 91–130.
- HARRIS AKP, WILLIAMSON NR, SLATER H, et al. (2004). The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology*.; 150:3547–60.
- MALIK K, TOKKAS J, GOYAL S. (2012). Microbial Pigments: A review. *International Journal of Microbial Resource Technology*. v. 1, n. 4, p. 361-365.
- SHIRLING EB, GOTTLIEB D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16:313-340.
- TULI HS, CHAUDHARY P, BENIWAL V, SHARMA AK. (2015). *Microbial pigments as natural color sources*: current trends and future perspectives. v. 52, n. 8, p. 4669–4678.

VENIL CK, ARULDASS CA, DUFOSSÉ L, ZAKARIA ZA, AHMAD WA. (2014). **Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry-an incisive evaluation.** v. 4, p. 39523–39529.

ZHANG C, DING W, QIN X, JU J. (2019). Genome Sequencing of *Streptomyces olivaceus* SCSIO T05 and Activated Production of Lobophorin CR4 via Metabolic Engineering and Genome Mining. **Mar Drugs.**; 17(10):593. Published 2019 Oct 20. doi:10.3390/md17100593.