

## **Efeito de parâmetros nutricionais e físicos no crescimento celular e produção de pigmento de *Serratia marcescens* isolada de um nódulo de leguminosa da Amazônia**

**Effect of nutritional and physical parameters on cell growth and pigment production of *Serratia marcescens* isolated from a legume nodule from Amazonia**

**Efecto de los parámetros nutricionales y físicos sobre el crecimiento celular y la producción de pigmentos de *Serratia marcescens* aislada de un nódulo de leguminosa de la Amazonia**

Recebido: 04/10/2021 | Revisado: 10/10/2021 | Aceito: 14/10/2021 | Publicado: 17/10/2021

**José Carlos Ipuchima da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3628-7985>  
Universidade do Estado do Amazonas, Brasil  
E-mail: [carlos.silva.jcids@gmail.com](mailto:carlos.silva.jcids@gmail.com)

**Ana Carolina Monroy Humphrey**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5590-4603>  
Universidade do Estado do Amazonas, Brasil  
E-mail: [acarolinamh@gmail.com](mailto:acarolinamh@gmail.com)

**Suziane Pinto Rodrigues**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5991-7716>  
Universidade Federal do Amazonas, Brasil  
E-mail: [rodrigues.suzi1996@gmail.com](mailto:rodrigues.suzi1996@gmail.com)

**Janaina Maria Rodrigues dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3687-1011>  
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Brasil  
E-mail: [janainalobato@hotmail.com](mailto:janainalobato@hotmail.com)

**Luiz Antonio de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2008-7292>  
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Brasil  
E-mail: [luiz.oliveira@inpa.gov.br](mailto:luiz.oliveira@inpa.gov.br)

### **Resumo**

A bactéria *Serratia marcescens* é uma das espécies produtoras de prodigiosina, pigmento vermelho com características de interesse nas áreas farmacêutica, alimentícia e têxtil. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes parâmetros nutricionais, e identificar aqueles que influenciam positivamente no crescimento celular e na produção de pigmentos em uma espécie de *Serratia marcescens* isolada de um nódulo de leguminosa. Inicialmente os ensaios foram realizados em fermentação submersa utilizando caldo Luria Bertani (LB), sendo modificado para a avaliação de diferentes fontes de carbono, nitrogênio, temperaturas e pHs. As leituras das amostras foram realizadas nos tempos entre 24 e 72 horas, medindo-se o crescimento celular por meio da densidade óptica (OD) a 600 nm em microplaca de 96 poços e a produção de pigmentos foi realizada por meio da extração do metabolito com auxílio de metanol e posterior leitura em espectrofotômetro a 470 nm. Como resultado a maior produção de biomassa foi obtida utilizando sacarose e glicose como fontes de carbono, NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio, em temperatura de 25 °C e pH variando entre 6,0 e 7,0. A maior produção de pigmento ocorreu quando o amido solúvel foi utilizado como fonte de carbono e o NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio, em temperatura de 25 °C e pH 8,0. Concluímos que partir dos resultados obtidos avaliando os diferentes parâmetros nutricionais, foi observado que fontes de carbono como sacarose e glicose estimulam a crescimento celular da *Serratia marcescens*, porém inibem significativamente a produção dos pigmentos, bem como a variação dos níveis de pH.

**Palavras-chave:** Bactéria de solo; Biopigmentos; Metabolismo microbiano.

### **Abstract**

The bacterium *Serratia marcescens* is one of the species that produces prodigiosin, a red pigment with characteristics of interest in the pharmaceutical, food and textile areas. The aim of this study was to evaluate the effect of different nutritional parameters, and identify those that positively influence cell growth and pigment production in a species of *Serratia marcescens* isolated from a legume nodule. Initially, the tests were carried out in submerged fermentation using Luria Bertani broth (LB), being modified for the evaluation of different sources of carbon, nitrogen, temperatures and pHs. Sample readings were taken between 24 and 72 hours, measuring cell growth by optical density (OD) at 600 nm in a 96-well microplate and pigment production was performed by extracting the metabolite with the aid of methanol and subsequent reading in a spectrophotometer at 470 nm. As a result, the highest biomass production was obtained

using sucrose and glucose as carbon sources, NH<sub>4</sub>Cl as nitrogen source, at a temperature of 25 °C and pH varying between 6.0 and 7.0. The highest pigment production occurred when soluble starch was used as a carbon source and NH<sub>4</sub>Cl as a nitrogen source, at a temperature of 25 °C and pH 8.0. We conclude that from the results obtained by evaluating the different nutritional parameters, it was observed that carbon sources such as sucrose and glucose stimulate the cell growth of *Serratia marcescens* but significantly inhibit the production of pigments, as well as the variation in pH levels.

**Keywords:** Soil bacteria; Biopigments; Microbial metabolism.

### Resumen

La bacteria *Serratia marcescens* es una de las especies productoras de prodigiosina, un pigmento rojo con características de interés en las áreas farmacéutica, alimentaria y textil. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes parámetros nutricionales e identificar aquellos que influyen positivamente en el crecimiento celular y la producción de pigmentos en una especie de *Serratia marcescens* aislada de un nódulo de leguminosa. Inicialmente, las pruebas se realizaron en fermentación sumergida utilizando caldo Luria Bertani (LB), siendo modificado para la evaluación de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno, temperaturas y pH. Se tomaron lecturas de muestra entre 24 y 72 horas, midiendo el crecimiento celular por densidad óptica (DO) a 600 nm en una microplaca de 96 pocillos y la producción de pigmento se realizó extrayendo el metabolito con la ayuda de metanol y posterior lectura en un espectrofotómetro a 470 nm. Como resultado, la mayor producción de biomasa se obtuvo utilizando sacarosa y glucosa como fuentes de carbono, NH<sub>4</sub>Cl como fuente de nitrógeno, a una temperatura de 25 °C y un pH que oscila entre 6,0 y 7,0. La mayor producción de pigmento se produjo cuando se utilizó almidón soluble como fuente de carbono y NH<sub>4</sub>Cl como fuente de nitrógeno, a una temperatura de 25 °C y pH 8,0. Concluimos que a partir de los resultados obtenidos al evaluar los diferentes parámetros nutricionales, se observó que fuentes de carbono como la sacarosa y la glucosa estimulan el crecimiento celular de *Serratia marcescens* pero inhiben significativamente la producción de pigmentos, así como la variación en los niveles de pH.

**Palabras clave:** Bacterias del suelo; Biopigmentos; Metabolismo microbiano.

## 1. Introdução

Os pigmentos naturais são obtidos de minerais, plantas, insetos e microrganismos. Sendo as plantas e os microrganismos as duas maiores fontes de pigmentos naturais (Lu et al., 2009; Venil et al., 2014). Porém, aqueles obtidos de plantas podem apresentar desvantagens, como instabilidade à luz, calor e pH extremo, baixa solubilidade em água e sazonalidade, uma vez que algumas espécies não estão disponíveis durante todo o ano (Bhat et al., 2013; Constant et al., 2021). Diferentemente da produção de pigmentos por microrganismos, que apresentam alta taxa de crescimento e viabilidade no desenvolvimento de bioprocessos em qualquer fase do ano (Lu et al., 2009).

O uso de microrganismos na produção de pigmentos traz muitas vantagens, não somente pelas suas características, mas também por não dependerem de condições climáticas ou geográficas para seu crescimento, sendo totalmente controláveis e com rendimentos previsíveis (Nigam & Pandey, 2009). Os pigmentos microbianos são de interesse industrial, pois são mais estáveis e solúveis do que os obtidos de plantas e animais (Bhat et al., 2013) e, o mais importante, podem ser produzidos utilizando resíduos industriais como matéria-prima e, assim, reduzem a água e poluição ambiental (Silva et al., 2021).

Existem inúmeras espécies de bactérias, fungos, leveduras e algas que podem produzir pigmentos, mas apenas algumas são consideradas adequadas para esse fim. Espécies como *Serratia marcescens* podem produzir diferentes produtos extracelulares, como enzimas e metabólitos secundários, como a produção de pigmentos vermelhos (Carbonell et al. 2000; Chi-Zong et al. 2014). A bactéria *Serratia marcescens* é um bacilo gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae. É anaeróbico facultativo, quimiorganotrófico que pode ou não ter mobilidade (Lins, 2010). As espécies do gênero *Serratia* são amplamente distribuídas no ar, solo, água, incluindo plantas e animais. Podem causar infecções nosocomiais, sendo as mais frequentes as infecções não pigmentadas. A maioria dos biótipos pigmentados de *S. marcescens* são encontrados em ambientes naturais (Carbonell et al. 2000; Hejazi & Faliner, 1997; Ryazantseva et al. 2012).

Um dos pigmentos produzidos é a prodigiosina e suas isoformas: undecil prodigiosina, metaciclo prodigiosina, nonil prodigiosina, norprodigiosina e rosefilina. Pigmentos vermelhos naturais também foram encontrados na biomassa de algumas espécies de *Pseudomonas* e *Streptomyces* (Kurbanoglu et al. 2015). Estudos demonstraram que tais compostos têm propriedades

bactericidas, antitumorais, antifúngicas, antimaláricas, inseticidas, antioxidantes e imunossupressoras ao induzir a apoptose em linfócitos T e B (Chi-Zong et al. 2014; Lins, 2010).

As condições de crescimento das bactérias podem alterar a produção de pigmentos e o crescimento celular. Diferentes fatores nutricionais e físicos foram testados para melhorar a produção de pigmentos, como 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 & Chen, 2005; Chi-Zong et al., 2014).

Considerando as abundantes atividades biológicas apresentadas pela prodigiosina e suas isoformas, o presente estudo identificou os fatores que influenciam positivamente no crescimento e na produção do pigmento de *S. marcescens* isolado de um nódulo de leguminosa.

## 2. Metodologia

A cepa de *Serratia marcescens* utilizada neste estudo foi obtida do acervo microbiológico do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia (LEBMAM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A bactéria foi isolada de um nódulo de *Pueraria phaseoloides* (Benth.), uma leguminosa forrageira. Foi selecionado para avaliar seu potencial na produção do pigmento, devido à cor vermelha brilhante que apresentava no meio de cultura utilizado para o isolamento.

### 2.1 Produção de pigmento em fermentação submersa

Para o cultivo foi utilizado o meio de cultura modificado Luria Bertani (LB), contendo 2,5 g/L<sup>-1</sup> de peptona, 2,5 g/L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 1,25 g/L<sup>-1</sup> de NaCl. Antes de cada teste, foi preparada uma pré-cultura da bactéria em 50 mL de meio LB, agitando a 120 rpm, por 24 horas à temperatura ambiente ( $\pm 28$  °C, sem luz). A partir da pré-cultura, foi preparada uma solução matriz com concentração celular equivalente ao tubo 1 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  células por mL), da qual alíquotas de 1,0 mL foram retiradas e distribuídas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura (Becton & Dickison, 2010; CLSI, 2015). Para cada teste, foram utilizadas quatro repetições, retirando-se alíquotas a cada 24, 48 e 72 horas para avaliar o crescimento celular por meio de Densidade Óptica (D.O) em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 600 nm e para a avaliação da produção de pigmentos, alíquotas de 4 mL foram recolhidas em tubos falcon de 15 mL e armazenadas em ultrafreezer (ColdLab, CL374-80V) a -80 °C até o momento da extração e quantificação de acordo com o item 2.6 (Vendruscolo et al., 2017). Diferentes fontes de carbono, nitrogênio, temperaturas e pH foram testadas.

### 2.2 Fontes de Carbono

As fontes de carbono: sacarose, glicose, amido solúvel e lactose foram avaliadas na concentração de 5 g/L<sup>-1</sup>, em meio contendo extrato de levedura, peptona e NaCl nas concentrações padronizadas de acordo com item 2.1. As fontes de carbono foram adicionadas ao meio de cultura separadamente, previamente esterilizado por filtração em membrana de 0,2 µm. Em cada frasco, 1 mL da solução da matriz foi inoculado e incubado a 28 °C a 120 rpm, por 72 horas, retirando-se alíquotas diárias para avaliação do crescimento celular e produção de pigmento (Filho & Teixeira, 2013).

### 2.3 Fontes de Nitrogênio

Quatro fontes de nitrogênio foram avaliadas: NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O e NaNO<sub>3</sub>. O meio de cultura LB (item 2.1) foi modificado com a substituição do extrato de levedura pelas demais fontes de nitrogênio a serem avaliadas na concentração de 2,5 g/L<sup>-1</sup>, seguido de incubação em temperatura de 28 °C a 120 rpm. Alíquotas foram retiradas diariamente para avaliar o crescimento celular e a produção de pigmentos (Filho & Teixeira, 2013).

#### **2.4 Temperatura de incubação**

Foram avaliadas as temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Para este teste, foi utilizado meio de cultura LB contendo 2,5 g/L<sup>-1</sup> de peptona, 2,5 g/L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 1,25 g/L<sup>-1</sup> de NaCl. Os frascos Erlenmeyer foram colocados em um shaker a 120 rpm, com temperatura controlada (Thermo Scientific MaxQ6000), retirando as alíquotas nos tempos previamente estabelecidos de 24 a 72 horas (Filho & Teixeira, 2013).

#### **2.5 pH**

Os pHs testados foram: 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0. Foi utilizado meio base contendo 2,5 g/L<sup>-1</sup> de peptona, 2,5 g/L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 1,25 g/L<sup>-1</sup> de NaCl. O pH do meio foi ajustado pela adição de NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M antes de ser esterilizado. Após o resfriamento os meios contendo o pH ajustado foram inoculados com 1 mL da solução padronizada (item 2.1) e os erlenmeyers foram colocados em um agitador a 120 rpm, com temperatura controlada de 28 °C, retirando as alíquotas diariamente até 72h para avaliar o crescimento celular e a produção de pigmentos (Filho & Teixeira, 2013).

#### **2.6 Extração e quantificação de pigmento**

Para realizar a extração e quantificação do pigmento, as alíquotas de 4,0 mL coletadas diariamente em tubos falcon de acordo com o item 2.1 dos ensaios de fontes de carbono, fontes de nitrogênio, pH e temperatura foram centrifugadas (Eppendorf 5430) a 7600 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 4,0 mL de metanol (99%) usando aparelho ultrassônico (Hielscher UP200Ht) por 4 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 8 minutos a 7.600 rpm e o sobrenadante obtido foi posteriormente utilizado para a quantificação do pigmento. O pigmento extraído com metanol foi quantificado em espectrofotômetro (Biospectrum SP-220) a 470 nm (Filho et al., 2013; Vendruscolo et al., 2017).

#### **2.7 Identificação Molecular**

O DNA genômico foi extraído usando o kit de extração Purelink Invitrogen. A região 16S rRNA foi amplificada seguindo o procedimento de Borneman e Triplett (1997), utilizando os 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 teste de controle, foi utilizado DNA bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922. O sistema de amplificação foi realizado em um termociclador Biocycle, e o perfil térmico da PCR foi: um ciclo inicial a 95 °C / 2 minutos, 35 ciclos a 95 °C / 40s, 60C / 40s e 72 °C / 2 e finalmente um ciclo de extensão a 72 °C / 5 min. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificação dos fragmentos. O produto de PCR foi purificado usando polietilenoglicol a 20% (NaCl 2,5 M, PEG 20%) e quantificado em gel de agarose a 0,8%. A amostra foi sequenciada (ABI 3130 - sequência de DNA da Applied Biosystems) e a sequência obtida foi editada e avaliada por meio do programa PHRED disponível em (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). Após a obtenção das sequências F (direta) e R (reversa), um alinhamento comparativo foi realizado no banco de dados de genomas bacterianos depositados no “GeneBank” utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) (Shaeffer et al. 2001) “Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia” (NCBI) e, também comparados com o banco de dados “Ribossomal Database Project” (RDP).

#### **2.8 Análise estatística**

Os dados dos tratamentos foram submetidos à análise de variância unilateral após verificação da homogeneidade pelo teste de Levene e da normalidade das variâncias pelo teste de Shapiro Wilk, as médias dos resultados foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram avaliados com o software Assist 7.7 Beta.

### 3. Resultados e Discussão

A análise de sequência de DNA obtida por meio da amplificação do gene 16S rRNA, foi submetida ao “GeneBank” por meio da ferramenta BLAST, revelando que a cepa estudada pertence ao gênero *Serratia*, apresentando 99% de similaridade com as cepas *Serratia marcescens* WW4 e *Serratia marcescens* subsp sakuensis KRED.

A cepa de *S. marcescens* estudada apresentou melhor crescimento celular utilizando a sacarose e a glicose como fontes de carbono (Tabela 1), apresentando diferença significativa quando comparado ao crescimento celular utilizando lactose e amido solúvel como fontes de carbono, enquanto a melhor produção de pigmentos ocorreu em meio de cultura suplementado com amido solúvel. O NH<sub>4</sub>Cl foi a melhor fonte de nitrogênio encontrada tanto para o crescimento celular quanto para produção de pigmentos, apresentando diferenças significativas em comparação com o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O e NaNO<sub>3</sub> em 24h de ensaio.

**Tabela 1:** Efeito de parâmetros nutricionais e físicos no crescimento celular e na produção de pigmentos por *Serratia marcescens*, expressos em unidades de absorbância (UA).

Teste	Tratamento	Crescimento celular (UA)			Produção de pigmentos (UA)		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
Fontes de Carbono	Sacarose	4.457 aA	3.875 aAB	3.757 aB	0,186 cA	0,113 cB	0,096 cB
	Glicose	3.692 bA	3.805 aA	3.455 abA	0,060 dA	0,047 dA	0,035 cA
	Amido solúvel	2.387 cA	2.600 bA	2.985 bcA	0,717 aA	0,707 aA	0,506 aAB
	Lactose	2.220 cA	2.427 bA	2.512 cA	0,431 bA	0,280 bAB	0,177 bB
Fontes de Nitrogênio	NH <sub>4</sub> Cl	0.705 aB	0.777 aAB	0.837 aA	0,109 aA	0,086 aA	0,070 aA
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.612 bA	0.695 aA	0.747 aA	0,079 bA	0,070 aA	0,057 bB
	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	0.007 dA	0.005 cA	0.008 cA	0,008 cA	0,005 cA	0,009 cA
	NaNO <sub>3</sub>	0.235 cB	0.342 bA	0.272 bAB	0,013 cA	0,017 bA	0,009 cA
Temperatura	20 °C	1,990 bA	1,810 cAB	1,468 cB	0,013 bA	0,030 cA	0,019 cA
	25 °C	2,838 aA	2,825 aA	2,560 aB	0,477 aA	0,340 aA	0,355 aA
	30 °C	1,898 cB	1,945 bA	1,978 bA	0,350 aA	0,249 bB	0,179 bB
	35 °C	1,918 cA	1,753 dA	1,200 dB	0,020 bA	0,017 cA	0,015 cA
	40 °C	1,820 dA	0,695 eB	0,335 eB	0,018 bA	0,015 cA	0,009 dB
pH	pH 6.0	1,803 bAB	2,240 aA	1,368 dB	0,008 cB	0,083 cA	0,065 cA
	pH 7.0	1,978 aB	2,243 aA	2,298 aA	0,021 bB	0,128 bA	0,105 bA
	pH 8.0	1,820 bA	1,988 bA	2,090 bA	0,112 aB	0,256 aA	0,179 aAB
	pH 9.0	1,405 cB	1,623 cA	1,553 cAB	0,023 bB	0,090 cA	0,071 cA
	pH 10.0	0,643 dB	1,518 dA	1,353 dA	0,001 cB	0,054 dA	0,048 dA

\*As médias das colunas para cada tratamento, seguidas da mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: Autores.

A temperatura ótima de crescimento e produção de pigmento foi de 25 °C, apresentando diferença significativa em relação às demais temperaturas testadas em 24h de crescimento. *S. marcescens* apresentou crescimento em todas as temperaturas testadas, no entanto, a produção de pigmento foi mínima em temperaturas abaixo de 25 °C e acima de 30 °C, como pode ser visto na Tabela 1.

No teste de pH's a bactéria *S. marcescens* apresentou melhor crescimento celular quando o pH do meio de cultura ficou entre 7,0 e 8,0. Para a produção de pigmentos, o pH 8,0 apresentou a melhor resposta, comprovando diferença significativa em relação aos demais pHs testados. Conforme relatado em outros estudos, a produção de pigmentos por *Serratia* sp. está diretamente relacionada à composição do meio de cultura (Chi-Zong et al. 2014). Os pigmentos produzidos por *S. marcescens* podem mudar de cor dependendo do pH do meio. Segundo Guimarães (2011), em pH ácido o pigmento pode apresentar uma

cor vermelha intensa com absorvância máxima em 537 nm, enquanto na presença de alcalino, a pigmentação pode variar de laranja a amarelo com absorvância máxima em 470 nm.

### 3.1 Fontes de Carbono

Embora a glicose seja comumente usada, estudos identificaram um efeito de inibir a produção de pigmentos produzidos por espécies de *Serratia* (Chi-Zong et al. 2014; Wei & Chen, 2005). Usando glicose como fonte de carbono em *S. marcescens* MO-1, Kurbanoglu et al. (2015) descobriram que a produção de prodigiosina diminuiu significativamente. Meio de cultura que contém glicose como fonte de energia não permite a síntese de prodigiosina devido à redução do pH do meio ou impedindo a síntese de certos catabólitos (Kurbanoglu et al. 2015; Hejazi & Falkiner, 1997). De acordo com o trabalho de Chi-Zong et al. (2014), a sacarose proporcionou os melhores resultados, tanto para o crescimento celular quanto para a produção do pigmento de *S. marcescens*.

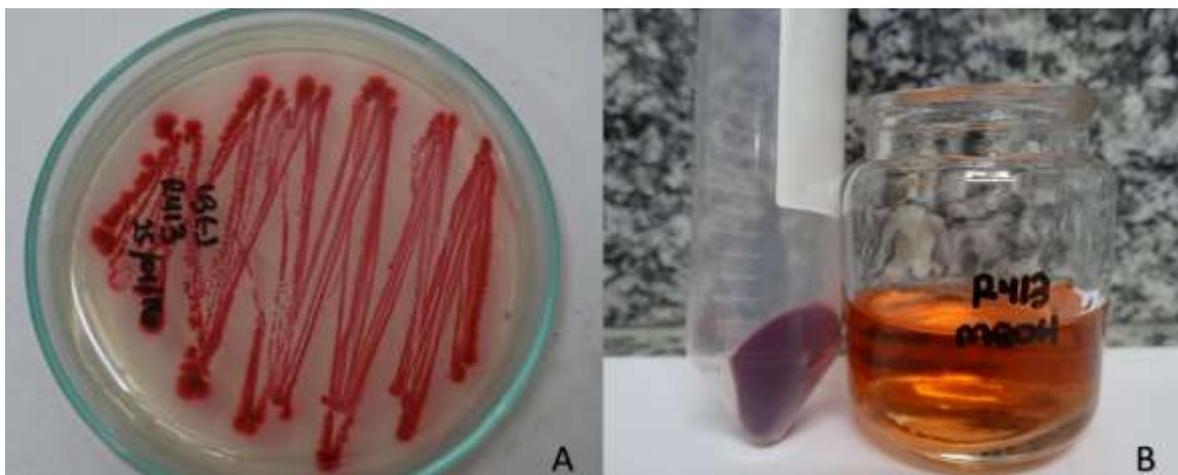
Observou-se que a melhor fonte de carbono para a produção de pigmentos não apresentou os mesmos rendimentos para o crescimento celular. Os resultados mostram que a quantidade de pigmento produzida independe do número de células. Resultados semelhantes foram encontrados por Wei e Chen (2005) usando uma espécie geneticamente modificada de *Serratia* (*S. marcescens* SMΔR), testando diferentes concentrações de componentes no meio Luria Bertani (LB). No entanto, 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 têm sido realizados com outras fontes de carbono para otimizar a produção de prodigiosina. No trabalho de Gulani et al. (2012), a produção máxima de pigmento foi obtida na presença de maltose, seguida de lactose, frutose, sacarose e manitol. Sundaramoorthy et al. (2009) descobriram que as melhores produções de pigmentos *Serratia marcescens* NY1 foram quando eles usaram maltose como fonte de carbono. Pigmentação moderada foi obtida com lactose e sacarose, e a menor produção foi com glicose.

No entanto a influência de vários fatores físicos e químicos para a produção de pigmento microbiano por *S. nematodiphila* RL2 foi determinada por meio do cultivo em caldo nutriente suplementado com 10 g/L<sup>-1</sup> de lactose, onde foi observado um crescimento positivo, com produção de 0,64 mg/ml de pigmento, em 48h de incubação a 35 °C (Singh et al., 2017).

Porém, no presente trabalho, a bactéria apresentou maior produção de pigmento quando cultivada em meio com amido solúvel, apresentando uma diferença significativa em relação às demais fontes de carbono utilizadas (Figura 1). O amido é o polissacarídeo mais importante nas reservas vegetais, e com cerca de 2.000.000 unidades de glicose, é uma das maiores moléculas encontradas na natureza (Guimarães, 2011). Como a fonte de carbono com melhor rendimento para a produção dos pigmentos foi o amido solúvel, sugere-se que outras fontes de carbono complexas, com menor custo ou resíduo industrial, possam ser utilizadas para produzir o pigmento de interesse. Verificamos que a maior quantidade de pigmento foi produzida após 24 horas de crescimento, apresentando uma diferença significativa em relação aos demais tempos. Um fator importante é o tempo que a bactéria leva para sintetizar o composto, possibilitando a praticidade do planejamento em larga escala, considerando o tempo de produção relativamente curto.

**Figura 1:** Produção do pigmento por *Serratia marcescens*. (A) placa com meio LB, (B) Extrato metanólico do pigmento.



Fonte: Autores.

### 3.2 Fontes de Nitrogênio

O crescimento bacteriano com o uso do extrato de levedura é relatado por muitos trabalhos, devido à complexidade da constituição desse produto, onde o nitrogênio não é o único componente (Zhang et al., 2003; Zarei et al., 2016). Porém, quando comparado aos meios de produção de pigmentos, o uso de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mostrou-se a melhor fonte. Kurbanoglu et al. (2015) demonstraram em sua pesquisa, que fontes inorgânicas de nitrogênio, especialmente sais de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e até a  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) inibem a produção de pigmentos devido ao comportamento químico do  $\text{NH}_4$  como um fraco doador de nitrogênio.

Os resultados concluem que no meio suplementado com  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{NaNO}_3$ , *S. marcescens* não produziu pigmento, com valores de absorvância de 0,008 e 0,13, respectivamente em 24h de incubação (Tabela 1). No entanto, usando o meio com sais de  $\text{NH}_4$ , os resultados mostraram crescimento bacteriano e produção de pigmento em quantidades limitadas. Resultados diferentes foram obtidos por Gulani et al. (2012), onde a pigmentação máxima foi na presença de peptona e a síntese do pigmento foi mais lenta no meio suplementado com  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ . No meio suplementado com sais de  $\text{NH}_4$ , como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , os autores concluíram que a bactéria não conseguiu crescer.

Chi-Zong et al. (2014) testaram várias combinações de compostos no meio de cultura e relataram o melhor crescimento celular e produção de pigmento com a combinação de peptona e extrato de levedura. Devido aos efeitos positivos observados ao utilizar peptona e extrato de levedura no meio de cultura, o caldo nutriente foi selecionado como meio base para o crescimento e produção do pigmento das espécies trabalhadas, o que coincide com o resultado do trabalho citado acima.

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

O estudo realizado por Elkenawy et al. (2017) evidencia o uso da peptona para a produção de pigmento de *S. marcescens*, onde foram testadas condições para otimizar a produção de prodigiosina. Eles avaliaram o efeito de cinco fontes de nitrogênio onde a produção máxima de prodigiosina foi alcançada com a adição de peptona como fonte de nitrogênio após 6 dias de incubação, isso pode ser justificado pela complexidade da peptona por possuir maior disponibilidade de nutrientes como diversos aminoácidos.

### 3.3 Efeito da Temperatura

Giri et al. (2004) testaram diferentes meios de cultura em três temperaturas para analisar a produção de prodigiosina, com produção máxima a 28 e 30 °C em caldo nutriente. Segundo Wei e Chen (2005), a produção de pigmentos como a prodigiosina por *S. marcescens*, pode ser inibida em temperaturas acima de 37 °C. No meio de cultura sintético usado por Gulani et al. (2012), composto por maltose, peptona, NaCl e glicerol, a produção máxima de pigmento por *S. marcescens* foi obtida em 25 °C. Esses autores também relataram que a biossíntese da prodigiosina e outros pigmentos semelhantes ocorreu em uma faixa estreita com produção máxima entre 24 e 28 °C, embora a bactéria tenha apresentado crescimento em uma ampla faixa de temperaturas, sendo os resultados compatíveis com os obtidos neste estudo. Eles também observaram um bloqueio na produção de pigmento quando as bactérias foram incubadas a 35 °C ou acima dessa temperatura (Gulani et al. 2012).

### 3.4 Efeito do pH

O pH do meio desempenha um papel crucial na síntese de metabólitos secundários e, portanto, afeta a biossíntese do pigmento. O rendimento máximo na produção de prodigiosina foi observado em pH 7,0, segundo Gulani et al. (2012) e Sundaramoorthy et al. (2009). Estudos têm corroborado que, ao diminuir o pH, pode ocorrer inibição na síntese da prodigiosina devido à repressão catabólica que ocorre (Wei & Chen, 2005). Solé et al. (1997) mostraram que existe uma correlação entre a inibição na produção da prodigiosina e o tempo em que a bactéria é submetida a um pH ácido, cujo efeito inibitório pode ser modificado com o uso de solução tampão no meio de cultura.

O pH ideal para síntese da prodigiosina pode variar de acordo com a composição do meio de cultura. Palacio-Castañeda et al. (2019) observaram a produção máxima de prodigiosina alcançada quando cultivada em pH 8,0. Enquanto Elkenawy et al. (2017) utilizaram peptona para a produção de pigmento de *S. marcescens* em pH 9.

Devido às limitações da pesquisa, um fator importante a ser analisado no futuro sobre a produção de pigmentos produzidos por *S. marcescens* é a concentração de NaCl no meio de cultura. Para este estudo, inicialmente foi identificada a quantidade adequada de NaCl para desenvolver os testes de crescimento do pigmento e análise da produção. No estudo de Wei & Chen (2005), foram feitas modificações no meio base Luria Bertani com a melhor produção de pigmento ocorrendo quando o NaCl foi removido do meio de cultura. Por outro lado, a ausência de NaCl não afetou o crescimento celular, mas aumentou a produção de prodigiosina, sugerindo que o NaCl pode ser um inibidor do metabolismo da prodigiosina. Estudos têm demonstrado que o NaCl pode inibir a via metabólica da biossíntese de monopirrol e bipirrol, que são os precursores da prodigiosina, além de inibir a atividade de uma enzima necessária para ativar uma etapa terminal na produção de prodigiosina (Wei & Chen, 2005).

Outros estudos sugerem que a produção do pigmento vermelho pode ser bloqueada quando sua quantidade atinge uma concentração específica, observando que o acúmulo do pigmento pode inibir a produção posterior (Kim et al., 1999).

## 4. Conclusão

Os testes desenvolvidos foram capazes de demonstrar que compostos nutricionais e fatores físicos podem influenciar o crescimento celular e a produção de pigmento de *Serratia marcescens*.

O maior crescimento celular foi obtido utilizando sacarose e glicose como fontes de carbono, NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio, na temperatura de 25 °C e pH que pode variar entre 7,0 e 8,0.

A maior produção de pigmentos ocorreu quando se utilizou amido solúvel como fonte de carbono e NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio, na temperatura de 25 °C e pH de 8,0 no meio de cultura.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazonia (INPA).

## Referências

- Becton & Dickison. (2010). Padrão de turvação preparado BBL: McFarland Turbidity Standard No. 0.5. USA.
- Bhat, S. V., Khan, S. S., & Amin, T. (2013). Isolation and characterization of pigment producing bacteria from various foods for their possible use as biocolours. *International Journal of recent scientific research*, 4(10), 1605-1609. Obtido de [http://www.recentscientific.com/sites/default/files/Download\\_648.pdf](http://www.recentscientific.com/sites/default/files/Download_648.pdf)
- Borneman, J., & Triplett, E. W. (1997). Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and environmental microbiology*, 63(7), 2647–2653. <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2647-2653.1997>
- Carbonell, G. V., Della Colleta, H. H., Yano, T., Darini, A. L., Levy, C. E., & Fonseca, B. A. (2000). Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 28(2), 143–149. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01469.x>
- Chi-Zong, Z., Chiung-Wen, Y., Wei-Feng, C., Chia-Chi, L., Shu-Chen, K., Chwen-Jen, S. & Yung-Chuan, L. (2014). Identification and enhanced production of prodigiosin isoform pigment from *Serratia marcescens* N10612. *Journal of the Taiwan Institute of chemical engineers*, 45(4), 1133-1139. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.12.016>
- Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: M07-A10. Wayne, Pennsylvania.
- Constante, P. B. L., Silva, A. G., Borges, A. S., Melo, F. O., Fanchiotti, F. E., Silva, F. L. A. T. & Stringheta, P.C. (2021) Microencapsulação do urucum e avaliação da estabilidade. *Research, Society and Development*, 10(9), e51910918179. 10.33448 / rsd-v10i9.18179.
- Elkenawy, N. M., Yassin, A. S., Elhifnawy, H. N. & Amin, M. A. (2017). Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* using crude glycerol and enhancing production using gamma radiation. *Biotechnology Reports*, 14(3), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.04.001>
- Filho, R. F. C. & Teixeira, M. F. S. (2013). Avaliação do potencial biotecnológico de pigmentos produzidos por bactérias do gênero *Serratia* isoladas de substratos amazônicos. Duque de Caxias, Brasil: Espaço Científico Livre.
- Giri, A. V., Anandkumar, N., Muthukumar, G., & Pennathur, G. (2004). A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC microbiology*, 4(11). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-11>
- Guimarães, O. L. (2011). Metabolismo do amido em ruminantes (Seminário aplicado- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia). [https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/semi2011\\_Leonardo\\_Guimaraes\\_1c.pdf](https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/semi2011_Leonardo_Guimaraes_1c.pdf)
- Gulani, C., Bhattacharya, S., & Das, A. (2012). Avaliação de parâmetros de processo que influenciam a produção aumentada de prodigiosina de *Serratia marcescens* e avaliação de seus potenciais antimicrobianos, antioxidantes e de tingimento. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(2), 116-122. <https://doi.org/10.21161 / mjm.03612>.
- Hejazi, A., & Falkiner, F. R. (1997). *Serratia marcescens*. *Journal of medical microbiology*, 46(11), 903–912. <https://doi.org/10.1099/00222615-46-11-903>
- Kim, C. H., Kim, S. W., & Hong, S. I. (1999). An integrated fermentation-separation process for the production of red pigment by *Serratia* sp. KH-95. *Process Biochemistry*, 35(5), 485–490. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00091-6)
- Kurbanoglu, E. B., Ozdal, M., Ozdal, O. G., & Algur, O. F. (2015). Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. *Brazilian journal of microbiology*, 46(2), 631–637. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246246220131143>
- Lins, J. C. L. (2010). Produção e caracterização de prodigiosina isolada de *Serratia marcescens* UCP 1549 (Dissertação programa de Pós-graduação em ciências biológicas, Universidade Federal de Pernambuco). [https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/1725/1/arquivo2808\\_1.pdf](https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/1725/1/arquivo2808_1.pdf)
- Lu, Y.G., Wang, L., Xue, Y., Zhang, C., Xing, X., Lou, K., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, G., Bi, J., & Su, Z. (2009). Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.09.009>
- Nigam, P. S. N. & Pandey, A. (2009). *Microbial Pigments: Biotechnology for Agro-industrial residues utilization*. Springer.
- Palacio-Castañeda, V., Pérez-Hoyos, A., Carrascal-Correa, D. & Osoriocheverri, V. M. (2019). Antibacterial pigment production by *Serratia marcescens* using different casein types obtained from milk. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 82–90. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.62435%20>.
- Ryazantseva, I. N., Saakov, V. S., Andreyeva, I. N., Ogorodnikova, T. I., & Zuev, Y. F. (2012). Response of pigmented *Serratia marcescens* to the illumination. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 106, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.08.006>
- Silva, T. T., Silva, J. R., Queiroz, A. E. S. F. & Ribeiro, D. S. (2021). Estudo comparativo entre espécies de *Monascus* para a produção de pigmentos naturais utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Research, Society and Development*, 10(11), e315101119558. 10.33448 / rsd-v10i11.19558.
- Singh, V., Mohammad, G., Tek, A. & Bhalla, C. (2017). Optimization of physicochemical parameters influencing the production of prodigiosin from *Serratia nematodiphila* RL2 and exploring its antibacterial activity. *3 Biotech*, 7(5), 338-346. 10.1007 / s13205-017-0979-z

- Solé, M., Rius, N., Francia, A., & Lorén, J. G. (1994). The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Letters in applied microbiology*, 19(5), 341–344. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1994.tb00470.x>
- Sundaramoorthy, N., Yogesh, P. & Dhandapani R. (2009). Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *Indian journal of science and technology*, 2(10), 32-34. 10.17485 / ijst / 2009 / v2i10.5
- Vendruscolo, F., Schmidell, W., de Oliveira, D., & Ninow, J. L. (2017). Kinetic of orange pigment production from *Monascus ruber* on submerged fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(1), 115-121. 10.1007/s00449-016-1679-5
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A. & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process biochemistry* 48(7), 1065-1079. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.006>
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., Usha, R. & Ahmad, W. A. (2014). Isolation and characterization of flexirubin type pigment from *Chryseobacterium* sp. UTM-3T. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 103-107. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.006>
- Wei, Y. H., & Chen, W. C. (2005). Enhanced production of prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMdeltaR by medium improvement and oil-supplementation strategies. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(6), 616–622. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.616>
- Zarei, O., Dastmalchi, S., & Hamzeh-Mivehroud, M. (2016). A Simple and Rapid Protocol for Producing Yeast Extract from *Saccharomyces cerevisiae* Suitable for Preparing Bacterial Culture Media. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 15(4), 907–913. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28243289/>
- Zhang, J., Reddy, J., Buckland, B., & Greasham, R. (2003). Toward consistent and productive complex media for industrial fermentations: studies on yeast extract for a recombinant yeast fermentation process. *Biotechnology and bioengineering*, 82(6), 640–652. <https://doi.org/10.1002/bit.10608>