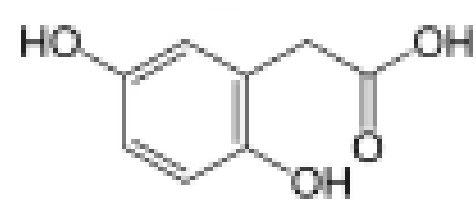


# INFLUENCIA DE DISTINTOS FATORES SOBRE A PRODUÇÃO DE PIOMELANINA POR *Aeromonas hydrophila*



Gabriel Victoria Martins, Ana Paula Longaray Delamare (co-orientadora), Sergio Echeverrigaray (orientador).  
Laboratório de Microbiologia Aplicada, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.

## INTRODUÇÃO

Entre os distintos mecanismos metabólicos responsivos a fatores ambientais estressores encontram-se as melaninas. Estas não são essenciais para o crescimento, mas podem determinar maior virulência, vantagem adaptativa e capacidade de sobrevivência em condições adversas como radiação UV e agentes oxidativos. Em *Aeromonas*, acreditava-se que a pigmentação ocorria pela produção de melanina base L-DOPA (L-3,4-dihydroxyfenilalanina). No entanto, estudos realizados com cepas de *Aeromonas* produtoras de pigmento mostram que a pigmentação ocorre pela produção de piomelanina através da auto oxidação e polimerização do ácido homogentésico (HGA). O objetivo deste trabalho é identificar a influência da adição de glicose e tirosina na produção de piomelaninas, observando o comportamento do pH e consumo de glicose por *A. hydrophila* (IBAer 109).

## METODOLOGIA

Os meios foram mantidos sob agitação de 150 rpm e temperatura de 35° C. Foram realizados dois ensaios utilizando meio Luria-Bertani (LB) líquido, um contendo glicose (9 g/L) tamponado com tris HCl pH 8,5 e não tamponado, e outro ensaio utilizando tirosina (1 g/L). Foi também avaliada a produção de melanina em meios com glicose e 2-desoxi-D-glicose (2-dG). A produção de pigmento e o crescimento foram avaliados em espectrofotômetro a 400nm e 600nm, respectivamente, convertendo os valores da piomelanina para g/L com base em curva padrão. O consumo de glicose foi avaliado por DNS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### INFLUÊNCIA DA TIROSINA

Os resultados mostram que tirosina atua como precursor da via de síntese da piomelanina, aumentando a produção deste composto quando adicionada na concentração de 0,1% e não alterando o pH do meio (Fig.1).

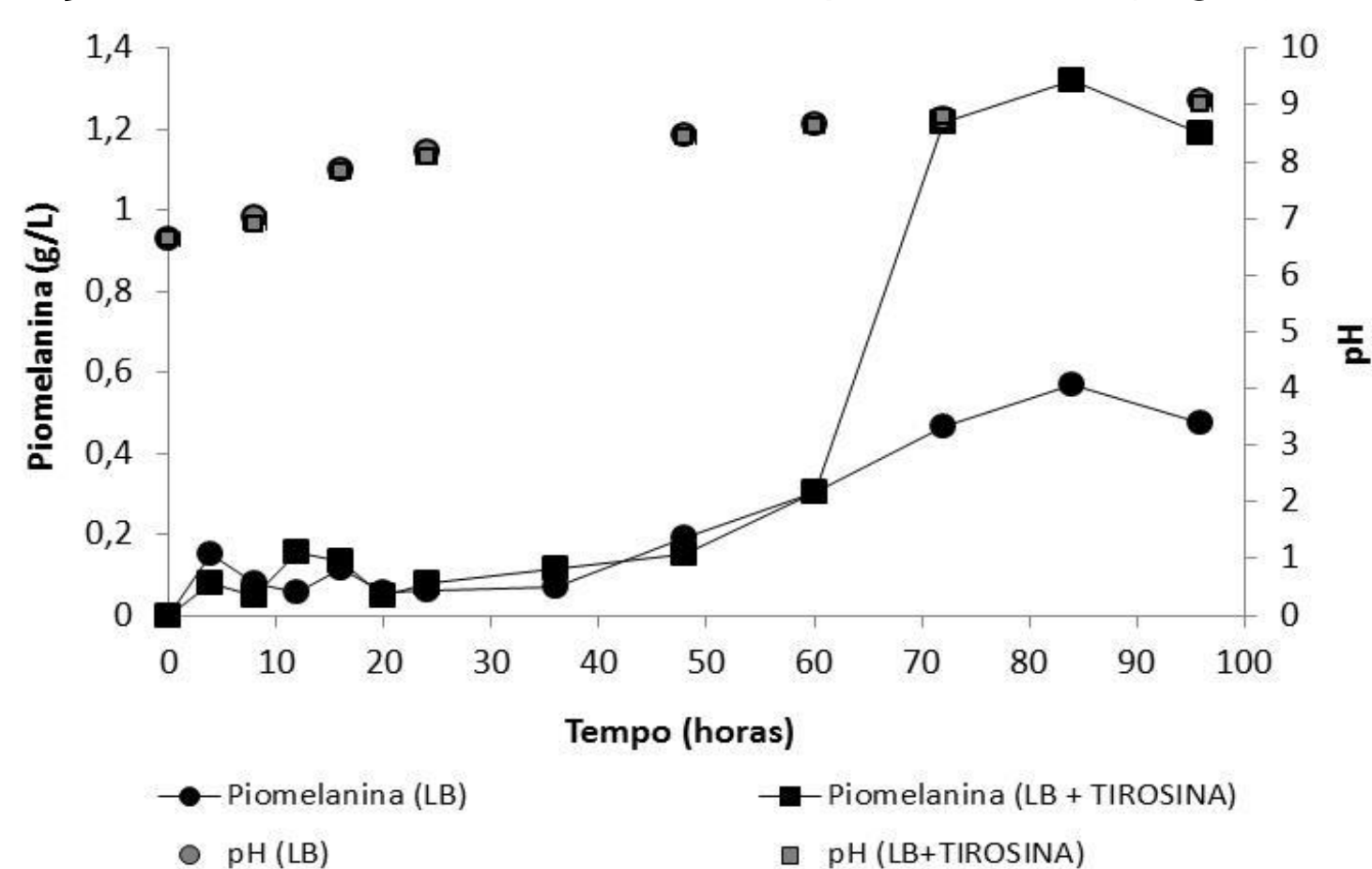


Figura 1. Produção de piomelanina por IBAer 109 em meio LB e LB adicionado com tirosina (1 g/L) e os respectivos pH.

### REPRESSÃO CATABÓLICA POR GLICOSE

A 2-dG é um análogo da glicose que possui um grupo 2- hidroxil substituído por hidrogênio, o que impede a glicólise. Portanto, em meios contendo 2-dG não foi constatada produção de melanina apesar do pH alcalino, demonstrando que existe repressão catabólica por glicose (Fig. 4 e 5).

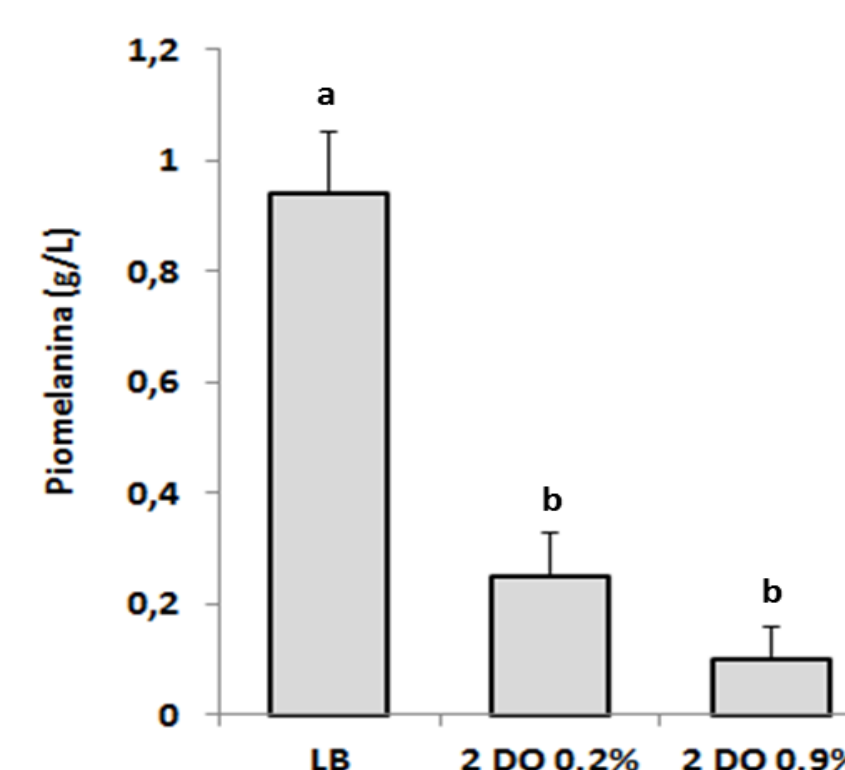


Figura 4. Gráfico demonstrativo da repressão catabólica por glicose.

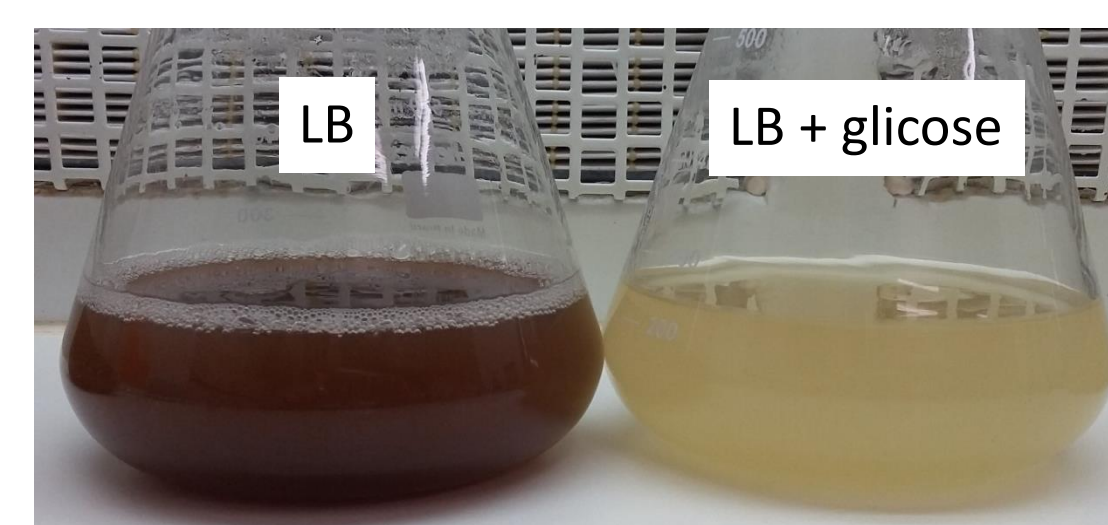


Figura 5 . Foto representativa da repressão catabólica por glicose.

### INFLUÊNCIA DO pH NA PRODUÇÃO

O consumo de glicose por *Aeromonas* gera significativa redução no pH pela alta produção de ácido acético (Namdari and Cabelli 1989), prejudicando a formação de pigmento, pois as enzimas precursoras desta via são favorecidas pelo pH alcalino. Em meio completo o pH torna-se alcalino e há produção de pigmento. Quando adiciona-se glicose (0,9%) o pH diminui nas primeiras horas, interferindo diretamente na produção de pigmento pela bactéria (Fig. 2). Entretanto quando tampona-se o meio (Tris HCl pH 8,5) e adiciona-se glicose, ocorre um decréscimo inicial do pH, seguido por uma elevação após 24 horas de crescimento. A produção de melanina alcançou os valores similares ao controle, neste experimento (Fig. 3).

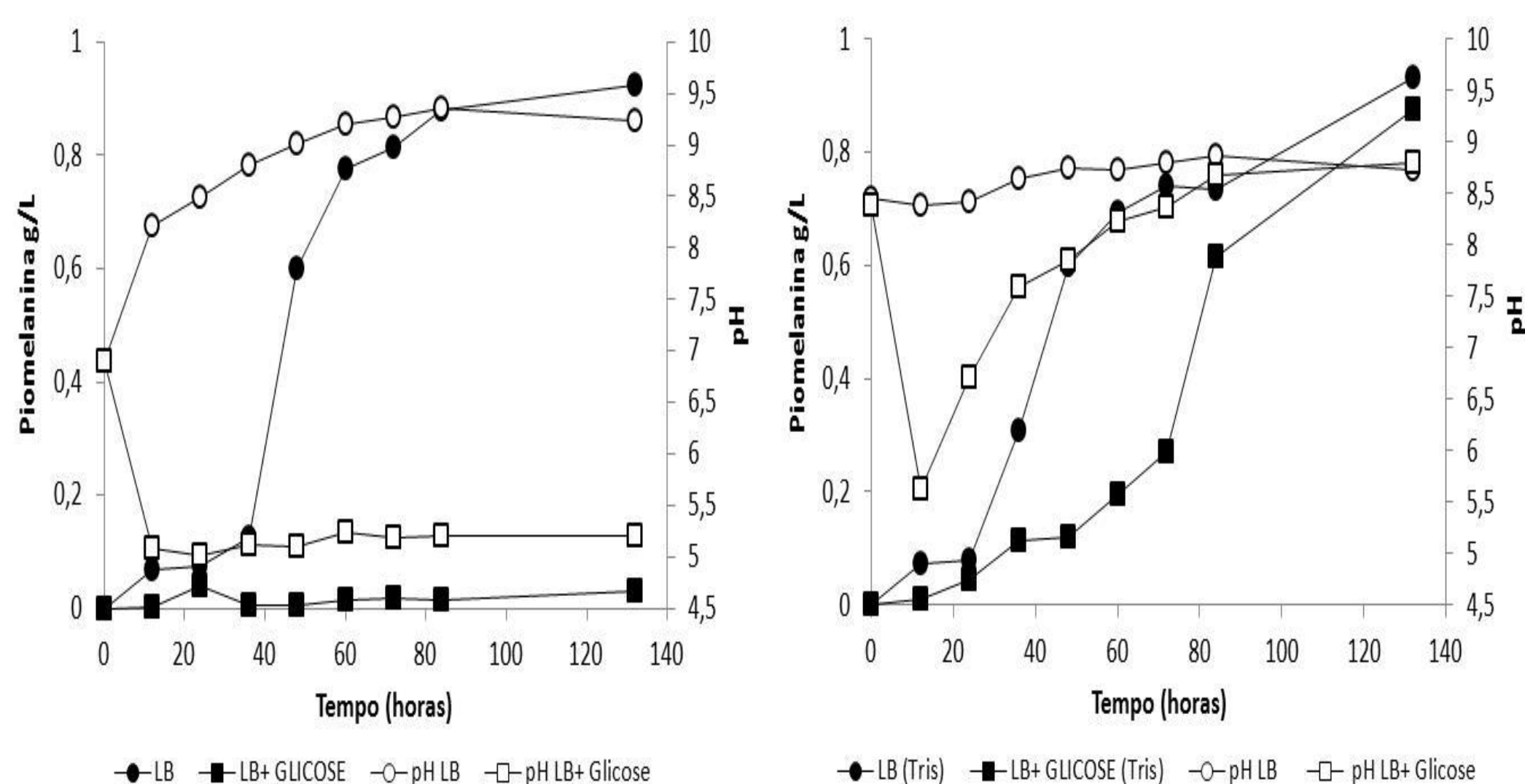


Figura 2. Comparativo entre produção de piomelanina em meio LB e LB adicionado com glicose (9 g/L).

Figura 3. Comportamento da produção de piomelanina e pH em meio LB tamponado (Tris HCl pH 8,5), adicionado com glicose (9 g/L) e não adicionado.

### CINÉTICA DE CRESCIMENTO vs. PRODUÇÃO

A produção de piomelanina pela cepa bacteriana IBAer 109 acontece durante a fase estacionária tardia de crescimento (Fig. 6), característico do mecanismo de *quorum sensing*. O mecanismo de *quorum* consiste na liberação de autoindutores para o meio extracelular, até que atinjam uma concentração limite suficiente para desencadear o processo de alteração da expressão genica. Em *Aeromonas* esse fenômeno já foi descrito para vários caracteres.

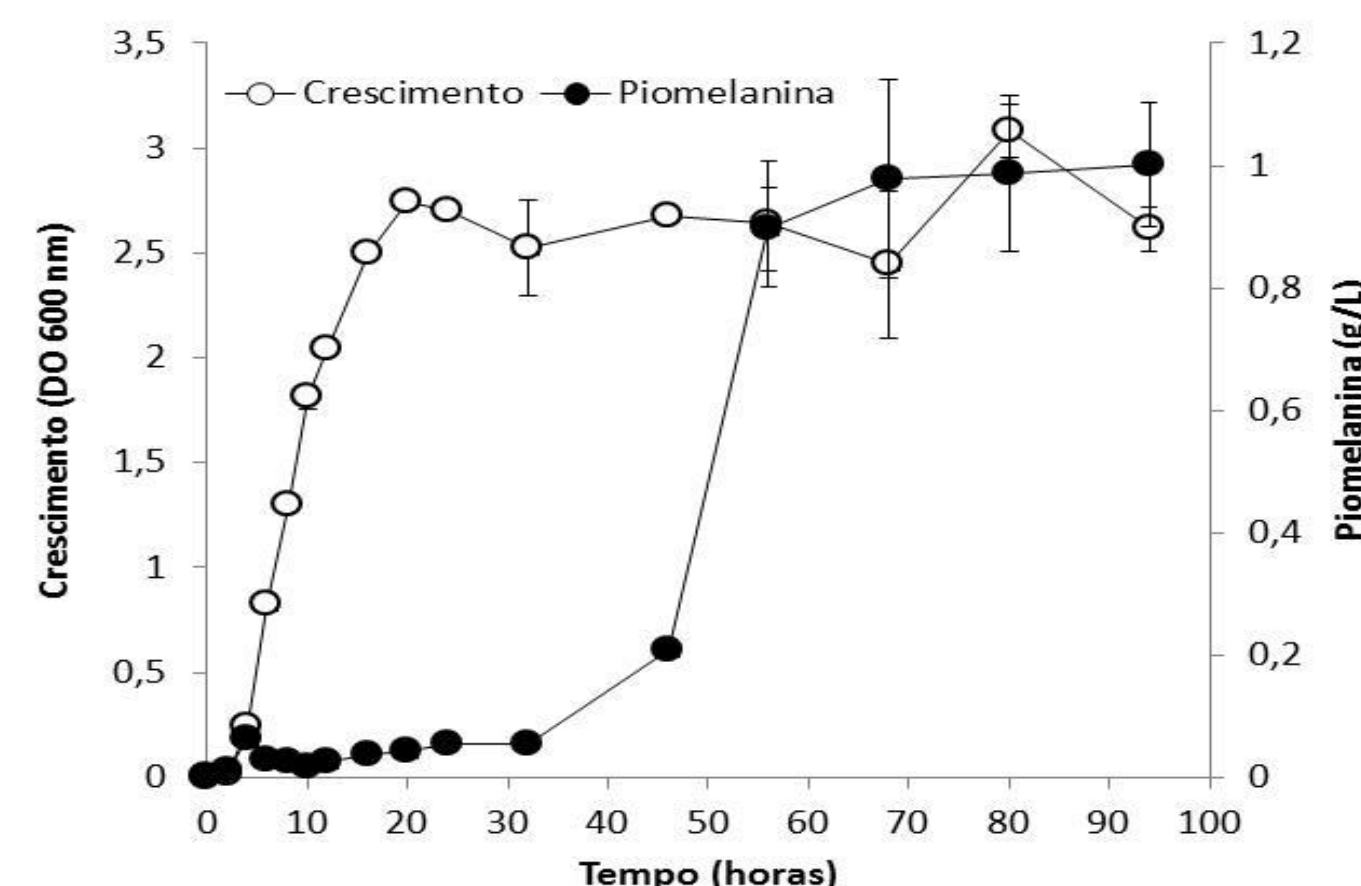


Figura 6. Comportamento da produção de melanina em meio completo (LB), indicando mecanismo de *quorum sensing*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados permitem concluir que a produção de melanina é: (1) estimulada pela presença do precursor tirosina; (2) é afetada pela redução de pH decorrente da produção de ácidos a partir de glicose; (3) sofre repressão catabólica por glicose e (4) responde ao mecanismo de *quorum sensing*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Pavan, M.E.; Pavan, E.E.; López, N.I.; Levin, L.; Pettinari, M.J. (2015) Living in an extremely polluted environment: clues from the genome of melanin-producing *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* 34meIT. *Applied Environmental Microbiology* 81: 5235–5248.  
Wang, H.; Qiao Y.; Chai, B.; Qiu C.; Chen, X. (2015) Identification and Molecular Characterization of the Homogentisate Pathway Responsible for Pyomelanin Production, the Major Melanin Constituents in *Aeromonas media* WS. *PLoS ONE* 10 (3): e 0120923.  
Namdari, H. and Cabelli, V. J. (1989) The Suicide Phenomenon in Motile *Aeromonads*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 543-547.

## AGRADECIMENTOS

