

Produção de sideróforo pela bactéria *Bacillus megaterium*

Sofia Isabel Silva Moreira dos Santos

Outubro, 2012

Orientação: Doutor Eduardo J. V. Soares

Co-Orientação: Doutora Helena M. V. M. Soares (DEQ-FEUP)

Agradecimentos

Ao terminar esta dissertação, não posso deixar de manifestar a minha gratidão para com todos aqueles que de uma forma ou de outra me ajudaram e sempre me incentivaram a que este trabalho fosse concluído. A essas pessoas gostaria de deixar algumas palavras.

Em primeiro lugar, o meu agradecimento ao meu orientador Professor Doutor Eduardo Soares, por toda a aprendizagem que me proporcionou, pelo incentivo, disponibilidade e paciência no esclarecimento de dúvidas, pela leitura rápida e crítica desta dissertação.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Helena Soares, gostaria de agradecer a oportunidade dada para a realização deste projeto e a sua colaboração no seu desenvolvimento.

Agradeço ao Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto e ao Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (IBB), pela disponibilidade dos meios técnicos e financiamento essenciais para a realização deste projeto.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto “Microbiological production of chelating agents”, financiado pelo programa Estímulo à Investigação na Pré-Graduação (referência 180) promovido pela Universidade do Porto/Banco Totta.

Igualmente desejo expressar o meu enorme apreço à Doutora Manuela Machado, pela imensa paciência, inúmeras sugestões, aconselhamento e apoio prestado no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Investigadora Isabel Neto pela colaboração, inteira disponibilidade e ajuda durante a realização da parte experimental desta dissertação.

À Rita Perez, amiga e companheira neste longo percurso, agradeço-te com especial carinho, toda a amizade e apoio imprescindíveis nos momentos mais difíceis.

Aos Bonitos, amigos que partilharam comigo a vida académica, por todas as aventuras e bons momentos partilhados. Por me terem abraçado tanto na alegria, como na tristeza.

À Joana, Cátia e Marlene, amigas de sempre, agradeço-vos a amizade sincera e apoio absoluto.

À minha família, que é a parte mais importante disto tudo. Aos meus pais, Helena e Albano, não sei como vos agradecer os esforços para me proporcionarem a oportunidade de ingressar no ensino superior.

À minha irmã Lurdes e ao meu cunhado Paulo, pela vossa amizade, ajuda e encorajamento incondicionais, em todos os momentos.

Um agradecimento às minhas tias Alice e Esmeralda, ao tio meu Vítor e à minha prima Inês por estarem sempre presentes.

À família Ferreira, gostaria de agradecer todo carinho e apoio demonstrado.

Por último, mas não em último lugar, agradeço ao meu melhor amigo e namorado, Pedro Ferreira. Obrigada por todo o teu amor, amizade e apoio incondicional e imprescindível. Pelo teu espírito vigoroso, que é fonte de motivação para fazer sempre mais e melhor.

A todos, Obrigada!!!

Resumo

Os agentes quelantes, como é o caso do EDTA, são utilizados numa ampla variedade de indústrias como a indústria têxtil, da pasta de papel, alimentar, de cosméticos ou de detergentes. Contudo, os agentes complexantes sintéticos, habitualmente usados, não são biodegradáveis, pelo que a sua acumulação no meio ambiente constitui motivo de preocupação. Deste modo, existe um interesse crescente na substituição destes compostos por compostos similares biodegradáveis sendo, deste modo, ambientalmente amigáveis.

Alguns microrganismos são capazes de produzir moléculas com capacidade de captar metais. Um desses exemplos são os sideróforos: compostos produzidos por bactérias, fungos e plantas gramíneas, com capacidade de formar quelatos muito estáveis com o ferro. A presente dissertação teve como objetivo estudar o efeito de diferentes condições culturais e nutricionais na produção de sideróforo pela bactéria *Bacillus megaterium*.

A avaliação da produção de sideróforo, utilizando o método colorimétrico *Chrome Azurol S* (CAS), durante o crescimento da bactéria, em meio de cultura deficiente em ferro, na presença de 5 ou de 20 g/L de glucose, mostrou que o início da sua produção ocorre, durante a fase exponencial de crescimento, não está relacionada com a esporulação e não é afetada pela concentração de glucose. Contudo, o crescimento da bactéria na presença de diferentes fontes de carbono (glicerol, frutose, galactose, glucose, manose, lactose, maltose ou sacarose) evidenciou que a produção de sideróforo é afetada pelo tipo de fonte de carbono. O crescimento na presença de glicerol promoveu a maior produção de sideróforo; efeito inverso foi observado na presença de manose. A bactéria *B. megaterium*, quando crescida na presença de frutose, galactose, glucose, lactose, maltose ou sacarose, produziu concentrações similares de sideróforo. O aumento da concentração de arginina, no meio de cultura, não aumentou a produção de sideróforo. A agitação apresentou um efeito positivo na produção de sideróforo; o crescimento em condições estáticas atrasou e diminuiu a produção de sideróforo.

Em conclusão, o glicerol parece constituir uma fonte de carbono alternativa, aos monossacáridos e dissacáridos, para a produção de sideróforo. A agitação apresenta um efeito positivo na produção de sideróforo pela bactéria *B. megaterium* ATCC 19213.

Palavras-chave: agentes quelantes ambientalmente amigáveis; *Bacillus megaterium*; ferro; metais pesados; *schizokinen*; produção de sideróforos.

Abstract

The chelating agents, such as EDTA, are used in a wide variety of industries, for instance, textile, pulp and paper, food, cosmetic or detergent industries. However, the commonly used synthetic complexing agents are not biodegradable. By this reason, they are accumulated in the environment, which is a matter of concern. Thus, there is a growing interest in replacing these compounds by similar, biodegradable and environment- friendly chelating compounds.

Some microorganisms are able to produce molecules with ability to capture metals. Siderophores are one of these types of molecules. Siderophores are compounds produced by bacteria, fungi and grass plants, able of forming very stable complexes with iron. This work aimed to study the effect of different cultural and nutritional conditions in siderophore production by the bacterium *Bacillus megaterium*.

The production of siderophore was evaluated using the colorimetric method *Chrome Azurol S* (CAS). The growing of the bacteria, in a culture medium iron-deficient, in the presence of 5 or 20 g/L glucose, showed that the initiation of siderophore production occurred during the exponential growth phase, was not related with sporulation and was not affected by glucose concentration. However, growth of bacteria in the presence of various carbon sources (glycerol, fructose, galactose, glucose, mannose, lactose, maltose or sucrose) showed that siderophore production is affected by the type of carbon source. The growth on glycerol promoted an increased production of siderophore; opposite effect was observed in the presence of mannose. *B. megaterium*, when grown in the presence of fructose, galactose, glucose, lactose, maltose or sucrose, produced similar concentrations of siderophore. The increase of arginine concentration, in the culture medium, did not increase the production of siderophore. Stirring had a positive effect on the production of siderophore; growth under static conditions delayed and reduced the production of siderophore.

In conclusion, glycerol appears to be an alternative carbon source, to monosaccharides and disaccharides, for the production of siderophore. Stirring has a positive effect on siderophore production by the bacterium *B. megaterium* ATCC 19213.

Keywords: *Bacillus megaterium*; environmental-friendly chelating agents; heavy metals; iron; *schizokinen*; siderophore production.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice.....	ix
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xv
Capítulo I.....	1
1. Introdução	3
1.1. Agentes quelantes	3
1.1.1. Produção mundial e aplicações.....	4
1.2. Agentes quelantes sintéticos e naturais	5
1.3. Impacto dos agentes complexantes no meio ambiente	8
1.3.1. Biodegradabilidade e concentrações encontradas no meio ambiente	8
1.4. Sideróforos.....	9
1.4.1. Definição	9
1.4.2. Aplicação de sideróforos	10
1.4.3. Principais classes de sideróforos e microrganismos produtores.....	11
1.4.4. Biossíntese de sideróforos contendo hidroxamato	13
1.4.5. Produção de sideróforos pela bactéria <i>Bacillus megaterium</i>	14
1.4.6. Métodos de quantificação e caracterização de sideróforos	17
Capítulo II.....	19
2. Materiais e Métodos	21
2.1. Microrganismo.....	21
2.2. Composição e preparação dos meios de cultura	21
2.3. Crescimento do microrganismo.....	22
2.4. Avaliação do crescimento da bactéria	23

2.5. Observação da esporulação.....	24
2.6. Determinação da produção de sideróforo.....	24
2.7. Determinação dos açúcares redutores totais	25
2.8. Determinação da libertação de nucleótidos e proteínas no meio de cultura	26
2.9. Reprodutividade dos resultados	26
Capítulo III.....	27
3. Resultados e discussão.....	29
3.1. Influência da fase de crescimento na produção de sideróforo	29
3.2. Efeito da fonte de carbono na produção de sideróforo	35
3.3. Efeito da concentração de arginina na produção de sideróforo	37
3.4. Efeito da agitação na produção de sideróforo	38
Capítulo IV	41
4. Conclusões	43
Capítulo V	45
5. Sugestões para trabalho futuro	47
Referências Bibliográficas	51

Índice de Figuras

Figura 1. Estruturas de alguns agentes quelantes produzidos sinteticamente.	6
Figura 2. Estruturas de alguns agentes quelantes produzidos naturalmente (adaptado de Bucheli-Witschele e Egli, 2001).	7
Figura 3. Estruturas de grupos de sideróforos típicos e respectivos valores de pKa (adaptado de Hider e Kong, 2010).	11
Figura 4. Estruturas dos sideróforos micobactina e ferricromo A, respetivamente (Hider e Kong, 2010).	12
Figura 5. Biossíntese da aerobactina através do plasmídeo COLV-K30 de <i>E. coli</i> (Hider e Kong, 2010).	14
Figura 6. Estruturas dos sideróforos Schizokinen, Schizokinen A e N-deoxyschizokinen (Hu e Boyer, 1995).	16
Figura 7. Avaliação da produção de sideróforo pelo método CAS. Reagente CAS na ausência (A) ou na presença (B) de um complexante forte, como é o caso do sideróforo.	17
Figura 8. Perfil de crescimento da bactéria <i>B. megaterium</i> na presença de diferentes concentrações de glucose. A bactéria, em fase exponencial de crescimento, foi inoculada em meio de cultura deficiente em ferro contendo (■) 5 ou (□) 20g/L de glucose e incubada a 25°C e com uma agitação de 150 rpm.	30
Figura 9. Produção de sideróforo na presença de diferentes concentrações de glucose. A bactéria, em fase exponencial de crescimento, foi inoculada em meio de cultura deficiente em ferro contendo (■) 5 ou (□) 20g/L de glucose e incubada a 25°C e com uma agitação de 150 rpm. Cada ponto corresponde à média de quatro determinações; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).	31
Figura 10. Consumo de açúcar durante o crescimento da bactéria <i>B. megaterium</i> na presença de diferentes concentrações de glucose. A bactéria em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura deficiente em ferro contendo (□) 5 ou (■) 20g/L de glucose. Cada ponto representa a média de quatro determinações; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). Quando não se observam barras de erro, significa que estão contidas no ponto.	32

- Figura 11. Libertação de componentes que absorvem a 260 ou 280nm, durante o crescimento da bactéria *B. megaterium* na presença de diferentes concentrações de glucose. A bactéria em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura deficiente em ferro contendo 5 (símbolos abertos) ou 20g/L de glucose (símbolos fechados). Compostos que absorvem a 260 (quadrados) ou a 280nm (triângulos).....33
- Figura 12. Fotografias de microscopia de contraste de fase da bactéria *B. megaterium* durante o crescimento em meio de cultura deficiente em ferro contendo 5 ou 20g/L de glucose. Setas com uma estrela: presença de endósporos. Setas com duas estrelas: presença de esporo livre.34
- Figura 13. Produção de sideróforo pela bactéria *B. megaterium* na presença de diferentes fontes de carbono. A - Produção de sideróforo após 48h de crescimento. B - Produção de sideróforo após 48h de crescimento, normalizada considerando o crescimento da bactéria em cada fonte de carbono. Cada barra representa a média de oito determinações, correspondentes a duas experiências independentes. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).....36
- Figura 14. Produção de sideróforo pela bactéria *B. megaterium*, na presença de diferentes concentrações de arginina. Cada barra representa a média de oito determinações, correspondentes a duas experiências independentes. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).38
- Figura 15. Efeito da agitação no crescimento e produção de sideróforo pela bactéria *B. megaterium*. A - Perfil de crescimento da bactéria usando glucose como fonte de carbono, a 25°C, na ausência de agitação. B - Produção de sideróforo nas condições referidas em A. Cada ponto representa a média de quatro determinações. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).39

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estimativa do uso de APCAs sintéticos (em 103 ton) nos EUA e na Europa em 1981 (adaptado de Bucheli-Witschele e Egli, 2001).	4
Tabela 2. Exemplos de sideróforos e seus microrganismos produtores (adaptado de Hu e Boyer, 1995).	13
Tabela 3. Composição das soluções stock usadas na preparação dos meios de cultura.	22

Lista de Abreviaturas

Significado das abreviaturas utilizadas ao longo da dissertação:

APCA - Ácido aminopolicarboxílico (sigla em Inglês)

CAS - *Chrome Azurol S*

DPTA - Ácido dietilenotriaminopentacético (sigla em Inglês)

DO - Densidade ótica

DNS – Ácido 3,5 – dinitrossalicílico (sigla em Inglês)

EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético (sigla em Inglês)

ETAR - Estação de tratamento de águas residuais

HDTMA - Brometo de hexadeciltrimetilamónio (sigla em Inglês)

HEDTA - Ácido hidroxietilenodiaminotriacético (sigla em Inglês)

MGDA – Ácido metilglicinadiacético (sigla em Inglês)

NTA - Ácido nitrilotriacético (sigla em Inglês)

rpm - Rotações por minuto

Capítulo I

Introdução

1. Introdução

Devido à sua enorme diversidade genética, os microrganismos desempenham funções únicas e decisivas na conservação de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. É interessante salientar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e da agricultura deve-se às recentes descobertas nas áreas da genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos (Cardoso *et al*, 2003).

Os compostos produzidos pelos microrganismos têm vindo a atrair uma atenção cada vez maior como agentes úteis para a medicina, medicina veterinária, agricultura e como únicas ferramentas bioquímicas (Omura, 1992).

Pretendendo um melhor aproveitamento de metabolitos produzidos por alguns microrganismos, estes tornaram-se alvo, por parte das indústrias, para variados processos biotecnológicos e para a produção de novos antibióticos e agentes terapêuticos, probióticos, biorremediação de solos (Fedrizzi, 2006), e na produção de agentes quelantes.

1.1. Agentes quelantes

Frequentemente é necessário controlar a disponibilidade e a acessibilidade a iões metálicos livres em processos de produção de químicos, assim como em produtos (Egli, 2001).

Os ácidos aminopolicarboxílicos (APCAs) têm a capacidade de formar complexos estáveis, solúveis em água, com iões metálicos di- e trivalentes. Por essa razão, os APCAs sintéticos são utilizados numa ampla gama de produtos domésticos e aplicações industriais de forma a controlar a solubilidade e a precipitação de iões metálicos (Egli, 2001).

Em muitos processos e produtos industriais, a presença de iões metálicos livres causam vários problemas, como a formação de precipitados não solúveis de sais metálicos ou a catálise da decomposição de compostos orgânicos. Os agentes quelantes ao combinarem-se com os iões metálicos impendem-nos de exercer o seu papel químico normal e de introduzir reações indesejáveis e potencialmente perigosas (Egli, 2001).

1.1.1. Produção mundial e aplicações

Os principais APCAs, tais como, o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), o ácido nitrilotriacético (NTA), o ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) e ácido hidroxietilenodiaminotriacético (HEDTA), são compostos produzidos por síntese química. É difícil de obter o valor referente à quantidade total dos principais APCAs produzidos atualmente. Na Tabela 1, encontra-se uma estimativa das quantidades de APCAs produzidos ou usados nos EUA e na Europa em 1981 (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

Tabela 1. Estimativa do uso de APCAs sintéticos (em 10^3 ton) nos EUA e na Europa em 1981 (adaptado de Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

APCAs	EUA	Europa
EDTA	42	13,6
NTA	32	8,3
DTPA	4	0,5
HEDTA	18	2
Outros APCAs	2,5	2
Ácidos hidroxicarboxílicos	110	15

Os detergentes contêm, para além de ingredientes de lavagem ativos, uma larga proporção de agentes complexantes de metais para inibir a formação de sais insolúveis de Ca^{2+} e Mg^{2+} , e assim, prevenir a deposição de incrustações nas fibras têxteis e nas peças das máquinas de lavar roupa. Os primeiros agentes complexantes aplicados em detergentes modernos foram os di- e tri-fosfatos. Contudo, provou-se, rapidamente, que contribuíam para a eutrofização dos lagos e rios. Na procura de substituintes aos di- e tri-fosfatos, foi proposto, como alternativa, o ácido nitrilotriacético NTA. O NTA, o ácido etilenodiaminotetraacético EDTA, e também o ácido metilglicinodiacético (MGDA), são usados na prevenção de precipitação de cálcio, magnésio e sais de metais pesados (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

Pequenas quantidades de EDTA têm sido incluídas em detergentes para estabilizar a ação do perborato, o qual é usado como agente de branqueamento, através da prevenção

do efeito de decomposição do componente por ação catalítica do metal. No processo de branqueamento da pasta de papel, o peróxido de hidrogênio é cada vez mais empregue em alternativa aos compostos de cloro. A adição de EDTA ou DTPA evita a decomposição do peróxido de hidrogênio a qual é catalisada por iões manganês ou iões férricos (Oviedo e Rodríguez, 2003). Os APCAs são também utilizados como aditivos em produtos farmacêuticos, cosméticos e em produtos alimentares, para evitar a formação do “ranço” como consequência de reações catalisadas por metais (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

Agentes quelantes multidentados são largamente aplicados na indústria nuclear para descontaminação de reatores e equipamentos, uma vez que formam complexos solúveis em água com muitos radionuclídeos. Os resíduos obtidos, contendo complexos formados por quelantes-radionuclídeos, são solidificados e eliminados. Contudo, a presença de fortes agentes quelantes em tais resíduos, aumenta a possibilidade da migração de metais de transição, radioativos, para o solo. Os APCAs foram também propostos para aplicação na remediação de solos ou sedimentos, ora como agentes de depuração ora como suporte em processos de extração eletrocinética (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

Agentes quelantes terapêuticos são também utilizados clinicamente como antídotos no tratamento de intoxicação com chumbo ou com outros metais pesados. Estes agentes complexam os metais tóxicos e aceleram a sua excreção, reduzindo, desta forma, os níveis desses metais para níveis aceitáveis (Domingo, 1995, 1998).

Desde o início dos anos 50 que agentes quelantes sintéticos têm sido utilizados no melhoramento da nutrição das plantas. São especialmente empregues em fertilizantes para fornecer à planta metais, tais como ferro, cobre, zinco e manganês (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

1.2. Agentes quelantes sintéticos e naturais

Tal como já foi descrito acima, os principais representantes de APCAs sintéticos são o EDTA, NTA, DPTA e HEDTA (Figura 1).

O NTA contém quatro átomos doadores de eletrões, sendo, portanto, um quelante denominado por ligando tetradentado. Forma um complexo na proporção 1:1 com iões metálicos por via da estabilização de três anéis que resultam da formação de quatro ligações covalentes dativas entre quatro átomos doadores de eletrões do NTA com o catião central. Sendo que a maioria dos catiões apresentam um número de coordenação de seis,

os restantes dois locais são normalmente ocupados por moléculas de água, resultando numa coordenação octaédrica do ião (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

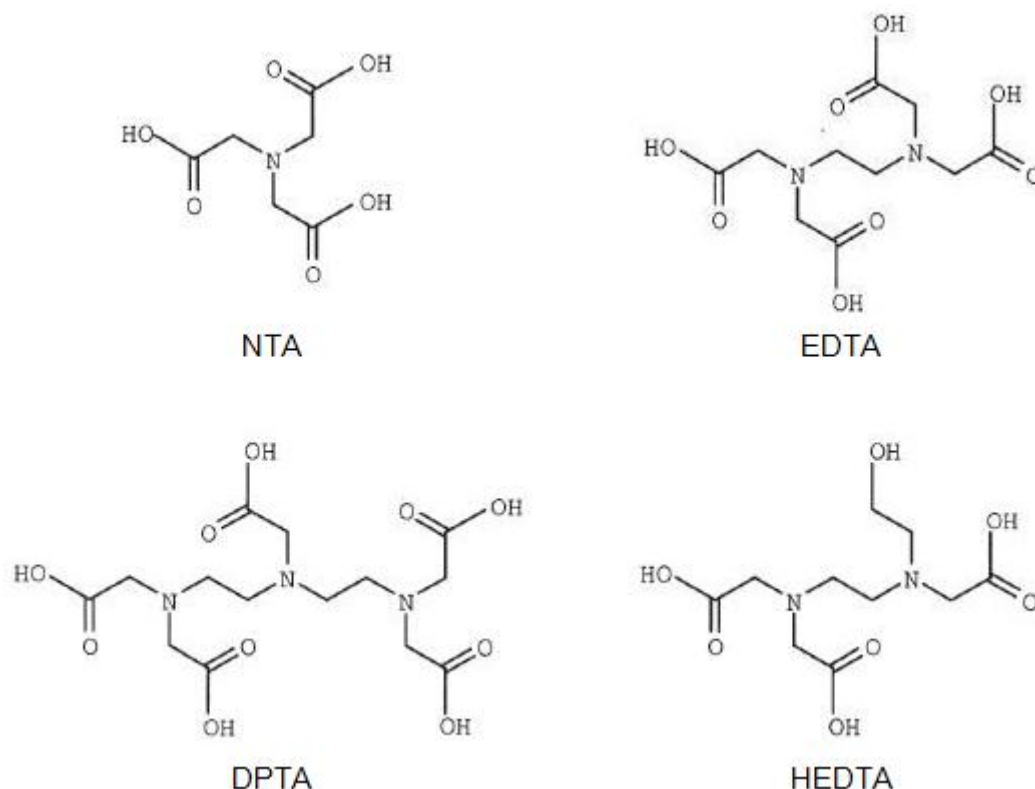


Figura 1. Estruturas de alguns agentes quelantes produzidos sinteticamente.

O EDTA contém seis átomos doadores de elétrons e atua como um ligando hexadentado. Pode formar no máximo cinco anéis. Idealmente, o EDTA devia formar um complexo com forma octaédrica, no qual tanto o ião metálico como o EDTA têm uma coordenação de seis. Porém, esta coordenação octaédrica parece só ser possível com catiões de tamanho razoavelmente pequeno. Com catiões maiores, restrições dentro da estrutura do ligando EDTA impedem esta estrutura ideal, e o complexo ião metálico continua acessível a outras ligações, tais como moléculas de água (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

Foi também demonstrado que a obtenção dos APCAs pode também ocorrer naturalmente. Alguns APCAs naturais contêm uma parte central de etilenodiamino, característica que era considerada ser restrita de agentes quelantes xenobióticos tais como o EDTA (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

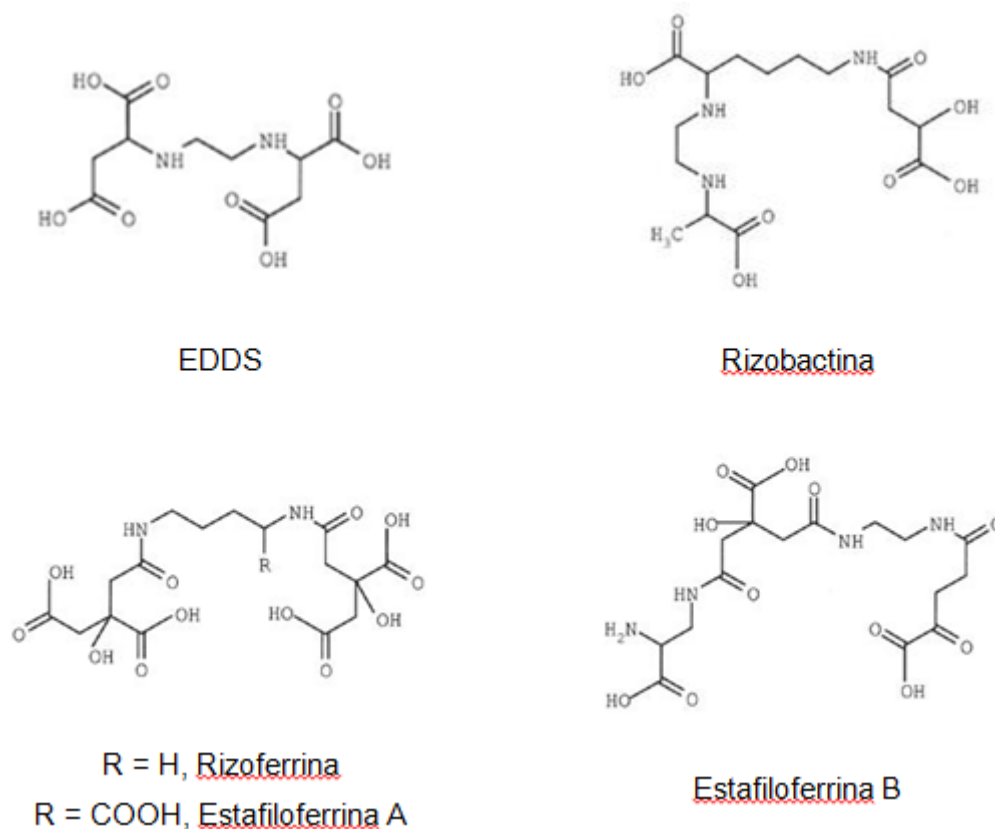


Figura 2. Estruturas de alguns agentes quelantes produzidos naturalmente (adaptado de Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

O ácido etilenodiamino-N,N'-dissucinico (EDDS) foi o primeiro APCA natural descrito. Foi isolado de um filtrado de uma cultura de *Amycolatopsis orientalis* (Figura 2). O EDDS exibe dois átomos de carbono quirais, resultando na existência de três isômeros diferentes: [S,S]-, [R,S]- e [R,R]-EDDS. *Amycolatopsis orientalis* produz exclusivamente o isômero [S,S]-EDDS (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

Em 1984, foi descrita por Smith e Neiland (citado em Bucheli-Witschele e Egli, 2001) a formação do APCA rizobactina (Figura 2); este APCA é produzido pelo *Rhizobium melilot* quando cultivado num meio com baixo teor em ferro. Conseqüentemente, a rizobactina é considerada um sideróforo (ver abaixo, secção 1.4.3). Tal como o EDDS, a rizobactina contém um grupo etilenodiamino. A Rizoferrina e as Estafiloferrinas (A e B) (Figura 2), são outros exemplos de APCAs naturais, originalmente isolados das culturas de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* e de *Staphylococcus hyicus*, respetivamente (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

1.3. Impacto dos agentes complexantes no meio ambiente

Devido à sua importância industrial, os agentes quelantes são produzidos e usados em larga escala. Deste modo, tem sido prestada muita atenção no que concerne ao destino ambiental dos APCAs, particularmente do EDTA e do DTPA. Ao contrário do NTA, o EDTA e o DTPA não são biodegradáveis quando atingem as estações de tratamento de águas residuais (ETARs) (Knepper, 2005).

Uma vez que não são biodegradáveis e apresentam uma forte interação com os metais, estes compostos, de origem antropogénica, podem provocar efeitos adversos nos ecossistemas e sistemas biológicos. Estes agentes quelantes podem, potencialmente, perturbar a especiação natural dos metais e influenciar a sua biodisponibilidade; em elevadas concentrações podem provocar a remobilização dos metais dos sedimentos e aquíferos, colocando em risco as águas de consumo e subterrâneas (Egli, 2001).

1.3.1. Biodegradabilidade e concentrações encontradas no meio ambiente

A eliminação de vários APCAs do meio ambiente é baseada em diferentes processos bióticos e abióticos. Apesar da similaridade química e estrutural dos APCAs, o mecanismo principal responsável pela sua eliminação tem de ser considerado separadamente para cada composto (Egli, 2001). Numerosos laboratórios demonstraram que a biodegradação é o mecanismo chave para a remoção de NTA do meio ambiente, enquanto que o EDTA é primariamente eliminado por fotodegradação (Oviedo e Rodríguez, 2003; Sillanpää, 1997).

Desde os anos 70 que o NTA tem recebido maior atenção devida à sua utilização nos detergentes para a roupa, o que originou a sua monitorização ambiental, em diferentes compartimentos ambientais. Mais recentemente, o interesse tem sido focado no EDTA e na determinação da sua concentração (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

Vários estudos, em ETARs na Suíça revelaram concentrações médias semelhantes no afluente de 100-1000 µg NTA/L, enquanto que as concentrações de EDTA foram um pouco inferiores, entre 10-500 µg EDTA/L. Contudo, após a passagem pelas ETARs, a concentração de EDTA era aproximadamente cinco vezes maior do que a de NTA e não muito inferior à do afluente; ao contrário do EDTA, uma parte importante de NTA foi eliminada durante o processo de tratamento (Bucheli-Witschele e Egli, 2001; Oviedo e Rodríguez, 2003).

As concentrações de NTA e de EDTA encontradas em rios Europeus foram de 0-20 e 0-60 µg/L, respetivamente. Porém, para o EDTA foram encontradas ocasionalmente concentrações superiores a 100µg/L em rios da Alemanha e da Suíça (Bucheli-Witschele e Egli, 2001; Sillanpää, 1997), sendo que a concentração mais elevada foi encontrada em Inglaterra (1120µg/L) (Oviedo e Rodríguez, 2003).

Concentrações de NTA determinadas em aquíferos e água potável variaram normalmente entre 1 e 5µg/L. Na Suíça, foram encontradas concentrações de EDTA entre 0,1 e 15µg/L em aquíferos. Água obtida da superfície do rio *Ruhr*, após filtração, apresentou uma concentração média de 25µg/L, muito similar à obtida sem filtração (26µg/L). Isto indica que não houve qualquer eliminação na filtração. Todavia, no caso de NTA, a concentração apresenta uma diminuição por um fator de 10 em cada filtração, resultando numa concentração média de 0,7µg/L na água potável (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

1.4. Sideróforos

O ferro é essencial para a maior parte dos microrganismos, plantas e animais devido às suas propriedades químicas, à capacidade para coordenar e ativar oxigénio, por possuir uma química redox ideal ($Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} \rightleftharpoons Fe^{4+}$) e por estar envolvido no transporte de eletrões. Apesar da abundância de ferro na crosta terrestre, este não está biodisponível em ambientes aeróbios devido à baixa solubilidade do Fe^{3+} (Storey *et al*, 2006). Assim, para combater essa baixa solubilidade, microrganismos e plantas desenvolveram estratégias para assimilar ferro do solo, de água doce e salgada. Uma das estratégias, mais comuns, para acumulação de ferro é a produção de moléculas de baixa massa molecular, conhecidos como sideróforos (Fedrizzi, 2006).

1.4.1. Definição

Um sideróforo é um composto orgânico, de baixo peso molecular (500-1500 daltons), produzido por bactérias, fungos e plantas gramíneas que forma complexos muito estáveis com o ferro (Reichard, 2005). Quando excretado para o meio extracelular, capta o ferro com grande facilidade, formando complexos ferro-sideróforo. A biossíntese de sideróforos é tipicamente regulada pelo nível de ferro no ambiente onde o organismo está localizado. Existem mais de 500 sideróforos diferentes, dos quais 270 já foram caracterizados

estruturalmente (Hider e Kong, 2010). A capacidade de produzir e assimilar sideróforos com grande afinidade para o ferro dá a um microrganismo uma importante vantagem seletiva em condições onde existe limitação de ferro (Kraemer 2004). Apesar de sideróforos terem enorme afinidade para o ião férrico, estes conseguem formar complexos estáveis com outros metais (Arceneaux *et al*, 1984; Hu e Boyer, 1996a).

1.4.2. Aplicação de sideróforos

Devido à sua capacidade de quelatação com o ferro, os sideróforos são usados em diversas áreas de forma a: (1) prevenir a formação de precipitados de ferro, (2) impedir a catálise de iões metálicos de reações químicas indesejadas, (3) remover os iões metálicos de sistemas, ou (4) fazer com que se estejam mais disponíveis, mantendo-os em solução (Bucheli-Witschele e Egli, 2001).

Embora a sua principal função seja adquirir ferro, a partir de hidróxidos insolúveis ou a partir de ferro adsorvido sobre a superfície sólida, os sideróforos podem também extrair ferro de vários outros compostos solúveis ou insolúveis, tais como citrato férrico, fosfato férrico, pigmentos de flavona vegetal e glicósidos ou até de agentes quelantes artificiais, tais como EDTA. Assim, apesar de os sideróforos não estarem diretamente envolvidos na solubilização do ferro, são requeridos como veículos de troca entre as reservas de ferro extracelular e a membrana (Das *et al*, 2007).

Espera-se que os sideróforos, como agentes quelantes naturais de ferro, sejam menos nocivos na remoção de ferro de pacientes que sofrem de siderose. O sideróforo desferroxamina B, produzido por *Streptomyces pilosus*, comercializado sob a forma de mesilato de deferoxamina (Desferal), é utilizado na prática clínica para a remoção do excesso de ferro e alumínio do organismo humano (Benite *et al*, 2002).

Vários sideróforos produzidos por *Pseudomonas* podem ser úteis em processos de biorremediação, como é o caso da fitoremediação, onde solos contaminados por metais pesados como o crómio, o mercúrio e o chumbo seriam limpos através da sua ação quelante (Fedrizzi, 2006).

Os sideróforos podem ter uma aplicação na agricultura. Algumas estirpes de *Pseudomonas* são capazes de produzir um sideróforo designado de pseudobactina. A presença deste sideróforo tem sido associada ao melhoramento do crescimento das plantas

(Das *et al*, 2007), através do controlo de organismos tóxicos presentes no solo, mediante a sua quelatação (Benite *et al*, 2002).

1.4.3. Principais classes de sideróforos e microrganismos produtores

Nos sideróforos, os átomos dadores com maior afinidade para o Fe^{3+} (como é o caso do oxigénio) encontram-se carregados negativamente, formando vulgarmente uma geometria octaédrica. Normalmente, os sideróforos são classificados com base no grupo funcional que utilizam para fazer a quelatação dos iões férricos (Storey *et al*, 2006). Os três principais grupos presentes nos sideróforos são o catecol, o hidroxamato, o α -hidroxicarboxilato, ou misturas de grupos funcionais; todos estes grupos apresentam uma elevada seletividade para o ferro. Os principais tipos de sideróforos encontram-se representados na Figura 3 (Hider e Kong, 2010).

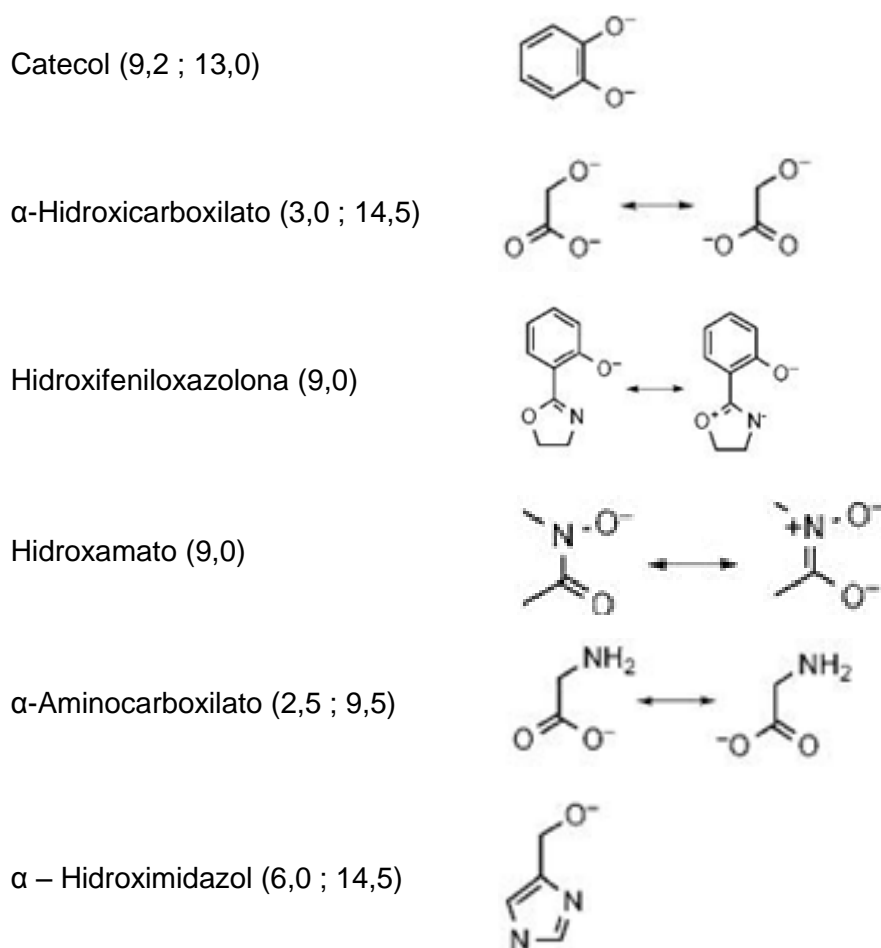


Figura 3. Estruturas de grupos de sideróforos típicos e respetivos valores de pK_a (adaptado de Hider e Kong, 2010).

O grupo catecol possui uma alta afinidade para o Fe^{3+} em virtude dos dois átomos orto-fenolatos, cada um com uma elevada densidade de carga, como indicado pelos valores de pK_a associados. O hidroxamato, tal como a ligação amida, tem duas formas mesoméricas, gerando uma alta densidade de carga no oxigênio carbonilo. Esta deslocalização de carga pode ser reforçada através de cadeias laterais conjugadas, aumentando a densidade de elétrons no átomo de oxigênio e, portanto, a afinidade para o Fe^{3+} . Tal modificação é observada num amplo número de sideróforos, tal como micobactina e ferricromo A (Figura 4). O grupo α -hidroxicarboxilato também possui um elevado pK_a e, portanto, uma grande afinidade para o Fe^{3+} . A relativa facilidade com que o Fe^{3+} é capaz de competir com os prótons para os grupos alcóxidos, quando comparado com outros cátions biologicamente importantes, torna a função α -hidroxicarboxilato altamente seletiva para o ferro. Os outros ligandos bidentados referidos na Figura 3 são encontrados com menor frequência nas estruturas de sideróforos (Hider e Kong, 2010).

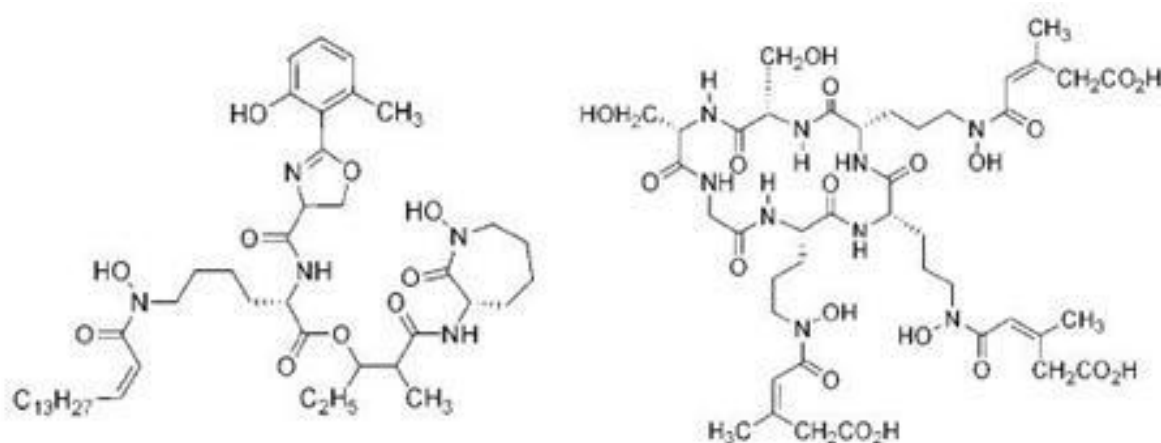


Figura 4. Estruturas dos sideróforos micobactina e ferricromo A, respetivamente (Hider e Kong, 2010).

Um dado sideróforo é, frequentemente, produzido por mais do que uma espécie de microorganismo (Tabela 2). Por exemplo, o sideróforo ferricromo tem sido largamente detetado nos fungos basidiomycota e ascomycota, incluindo *Ustilago* spp., *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* e *Tilletiaria anomala*. Por outro lado, um dado microorganismo pode também produzir vários sideróforos, quando cultivado em condições limite de ferro. São disso exemplo os sideróforos ferricromo e ferricromo A, isolados de *Ustilago maydis*, e parabactina e parabactina A isolados de culturas de *Paracoccus denitrificans*. Nestes exemplos, a estrutura química dos sideróforos está relativamente próxima. Enquanto que,

Erwinia herbicola FM3 produz enterobactina, ferricromo e *coprogen*, três sideróforos cuja estrutura química é absolutamente diferente (Hu e Boyer, 1995).

Tabela 2. Exemplos de sideróforos e seus microrganismos produtores (adaptado de Hu e Boyer, 1995).

Sideróforo	Microrganismo
Aerobactina	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>S. boydii</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Vibrio hollisae</i> , <i>V. mimicus</i>
<i>Coprogen</i>	<i>Penicillium</i> sp., <i>Neurospora</i> sp.
Enterobactina	<i>Klebsiella</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Erwinia</i> sp.
Ferribactina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Ferricromo	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Ustilago</i> sp.
Rizoferrina	<i>Zygomycetes</i> sp.
<i>Schizokinen</i>	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Anabaena</i> sp., <i>Ralstonia solanacearum</i>

1.4.4. Biossíntese de sideróforos contendo hidroxamato

A biossíntese de sideróforos é afetada pelo ferro disponível, mas a concentração de ferro necessário para a sua inibição depende do tipo de sideróforo produzido e do respectivo organismo produtor (Illmer e Buttinger, 2006).

Um número importante de sideróforos, da classe de hidroxamato são sintetizados por um sistema modular de enzimas; por exemplo o *coprogen* e as fusarinas incorporam ornitina e ácido mevalônico, enquanto que os ferricromos incorporam ornitina, glicina e, por vezes, serina (Hider e Kong, 2010).

A biossíntese da aerobactina é relativamente simples (Figura 5): neste processo a lisina é oxidada e acoplada ao citrato (Hider e Kong, 2010).

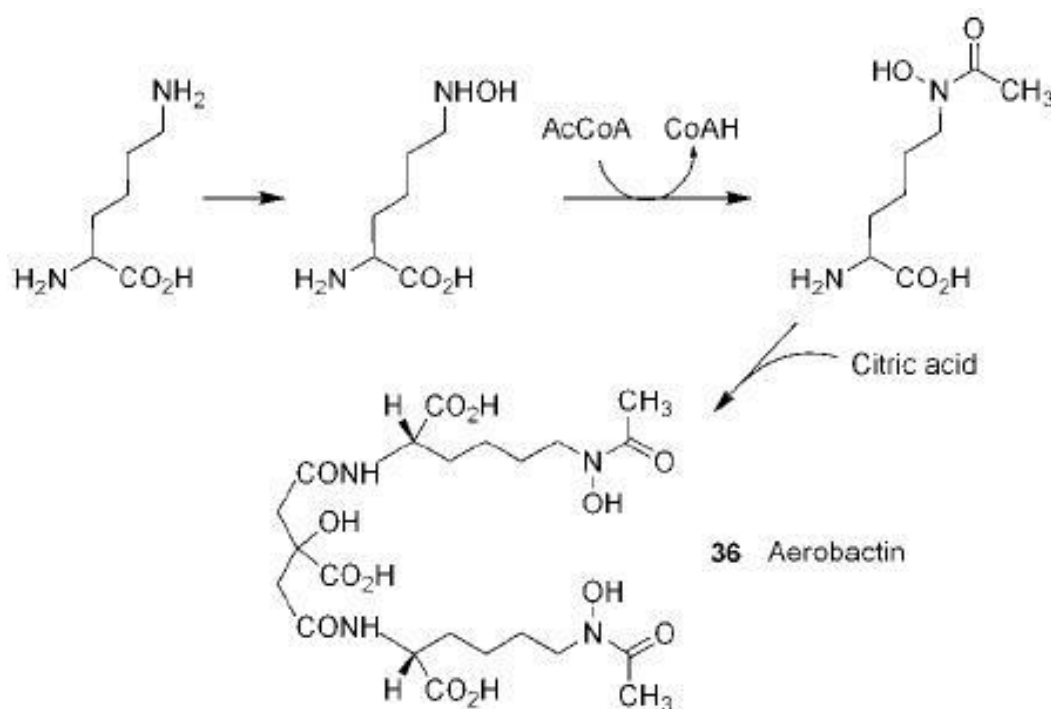


Figura 5. Biossíntese da aerobactina através do plasmídeo COLV-K30 de *E. coli* (Hider e Kong, 2010).

Esquemas relativamente simples deste tipo de síntese têm sido efetuados por fermentação direta. Assim, no caso da rizoferrina, têm sido produzidos um grande número de sideróforos análogos, através da adição de análogos de 1,4-diaminobutano a culturas de *Cunninghamella elegans*. De um modo similar, a fermentação direta usando *Streptomyces olivaceus* conduziu à preparação de uma ampla gama de análogos de ferrioxamina (Hider e Kong, 2010).

1.4.5. Produção de sideróforos pela bactéria *Bacillus megaterium*

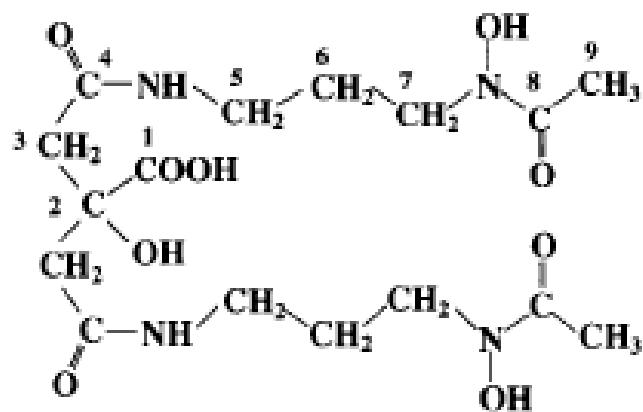
A bactéria *Bacillus megaterium* ATCC 19213 é conhecida por produzir sideróforos (*schizokinen*, *schizokinen A* e *N-deoxyschizokinen*) contendo hidroxamato, em condições deficientes em ferro (Byers *et al*, 1967; Davis *et al*, 1970; Hu e Boyer, 1996a). O sideróforo *schizokinen* foi originalmente isolado como um fator ativo na divisão celular e só mais tarde demonstrou ser importante na assimilação do ferro. Este composto tem sido isolado a partir de culturas da cianobactéria *Anaebaena* sp. Também tem sido encontrado no solo de campos de arroz após inundação anual (Hu e Boyer, 1995).

A bactéria *B. megaterium* ATCC 19213 fornece um excelente sistema para estudar os efeitos de formação do sideróforo *schizokinen* e o transporte de ferro (Hu e Boyer 1996a). O ferro é libertado, do complexo ferro-sideróforo, no meio intracelular por redução enzimática, ficando disponível para o metabolismo celular, sendo o sideróforo *schizokien* libertado da célula e reciclado (Arceneaux e Byers, 1980).

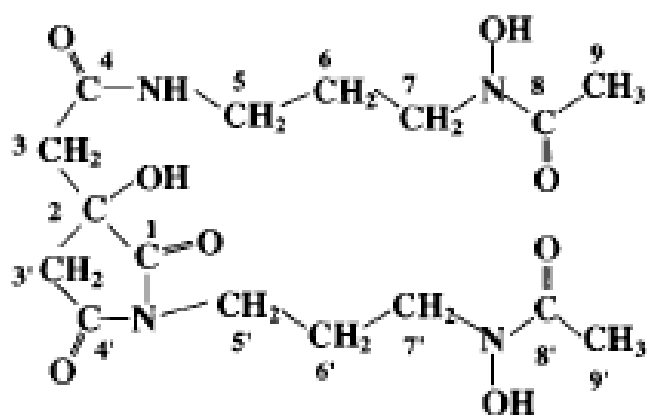
A degradação química deste sideróforo permitiu verificar que é constituído por ácido cítrico, ácido acético e 1-amino-3-hidroxiaminopropano. A estrutura do *schizokinen* é composta por um único resíduo de ácido cítrico simetricamente substituído com 1-amino-3-(N-hidroxi-N-acetil)-aminopropano (Figura 6.a). Os dois grupos hidroxamato e os grupos hidroxilo e carboxilo, do citrato, formam os seis locais de coordenação para o ião ferro (Hu e Boyer, 1995).

Um segundo composto de carga neutra de nome *schizokinen A*, pode ser separado do *schizokinen* por cromatografia de troca iónica. A ligação imida do sideróforo *schizokinen A* (Figura 6.b) é rapidamente formada sob condições ácidas e *schizokinen A* pode corresponder a um artefacto formado a partir de *schizokinen* (Hu e Boyer, 1995).

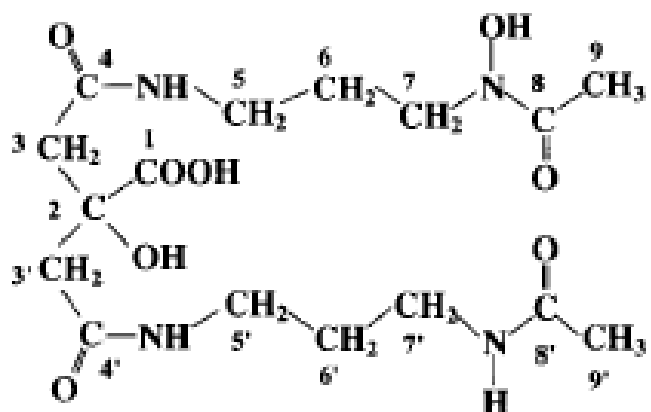
Foi isolado um outro sideróforo, designado por *N-deoxyschizokinen* (Figura 7, de culturas em fase estacionária (10 dias) da bactéria *B. megaterium* ATCC 19213. Admite-se que este sideróforo possa ser formado em consequência da degradação enzimática do *schizokinen*, provocada pela lise celular (Hu e Boyer, 1995).



a. Schizokinen



b. Schizokinen A



c. Deoxyschizokinen

Figura 6. Estruturas dos sideróforos *Schizokinen*, *Schizokinen A* e *N-deoxyschizokinen* (Hu e Boyer, 1995).

1.4.6. Métodos de quantificação e caracterização de sideróforos

O método mais frequentemente utilizado para quantificação de sideróforos, consiste na mistura do sobrenadante da cultura com uma solução que contém 5 mmol/l $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ em 0,1 mol/l HClO_4 . Este método é semi-quantitativo; a quantidade de sideróforo pode ser estimada através da medição da densidade óptica a 510 nm (Das *et al*, 2007).

Um método colorimétrico para a quantificação de sideróforos envolve o uso do corante *Chrome Azurol S* (CAS) complexado com o brometo de hexadeciltrimetilamônio (HDTMA) (Das *et al*, 2007). O ferro é removido do complexo CAS-HDTMA por um sideróforo, que aparentemente tem maior afinidade para o íon ferro. A reação positiva resulta na mudança de cor (Figura 7) do reagente CAS (usualmente de azul para laranja/amarelo) (Milagres *et al*, 1999). O complexo pode também ser incluído no meio de cultura de forma a medir a capacidade de um organismo para remover o ferro (isto é, para formar sideróforos). No entanto, o ensaio de CAS tem inconvenientes: por exemplo substâncias que formam ligações com o ferro e que não são sideróforos funcionais dão reação positiva (Machuca e Milagres, 2003).

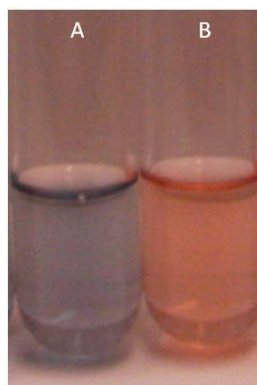


Figura 7. Avaliação da produção de sideróforo pelo método CAS. Reagente CAS na ausência (A) ou na presença (B) de um complexante forte, como é o caso do sideróforo.

A presença de hidroxamatos podem ser testados pelo ensaio de Csáky, em que o produto final detetado é o nitrito (Das *et al*, 2007). O hidroxamato é hidrolisado a hidroxilamina a altas temperaturas; posteriormente, a hidroxilamina é oxidada a nitrito, sendo o nitrito medido colorimetricamente. Porém, este método tem baixa eficácia para sideróforos complexos e a clivagem inicial do hidroxamato requer longas hidrólises a altas temperaturas (Hu e Boyer, 1996b).

A atividade biológica de um hidroxamato pode ser medida através de um ensaio biológico utilizando a bactéria *Aureobacterium flavescens* JG.9 (ATCC 29091); esta bactéria requer para o seu crescimento sideróforos hidroxamato para mobilização do ferro (Das *et al*, 2007).

Uma vez determinado que um presumível sideróforo é um hidroxamato, um excesso de sais de ferro (usualmente FeCl_3) é adicionado ao meio de cultura colhido e a presença da cor vermelha é monitorizada por vários procedimentos destinados a isolar, purificar e caracterizar os compostos que dão reatividade. Este último passo, a caracterização química é essencial. A caracterização do suposto sideróforo pode ser efetuada por cromatografia em camada fina, cromatografia líquida de alto desempenho, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa (Das *et al*, 2007).

É reconhecida a grande aplicabilidade dos agentes quelantes naturais, que sendo biodegradáveis são ambientalmente amigáveis. A bactéria *B. megaterium* ATCC 19213 tem a capacidade de produzir o sideróforo *schizokinen* em condições deficientes de ferro (Hu e Boyer, 1996a). O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito das condições culturais e nutricionais na produção de *schizokinen* com vista à otimização da sua produção.

Capítulo II

Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado no desenvolvimento do trabalho foi a bactéria *Bacillus megaterium* ATCC 19213. A estirpe foi originalmente obtida de *American Type Culture Collection* (ATCC), EUA.

2.2. Composição e preparação dos meios de cultura

O crescimento da bactéria *B. megaterium* foi efetuado num meio de cultura com ferro e num meio de cultura deficiente em ferro (Hu e Boyer, 1996a). A composição do meio de cultura contendo ferro encontra-se descrita na Tabela 3. O pH final do meio foi ajustado a $7,0 \pm 0,1$. A composição do meio de cultura deficiente em ferro, preparou-se de igual modo sem adição da solução *stock* D.

Na preparação de ambos os meios foram utilizadas as soluções *stock* referenciadas na Tabela 3.

As soluções *stock* A, B e C foram esterilizadas por membrana de $0,45\mu\text{m}$ de porosidade, enquanto que a solução *stock* D foi esterilizada por autoclavagem (121°C , 20min). A solução *stock* B foi, previamente, ajustada a $\text{pH } 7,00 \pm 0,01$. Após esterilização, todas as soluções foram conservadas a 4°C .

A preparação de 20mL de meio de cultura deficiente em ferro consistiu na adição (em esterilidade) de 2,0mL da solução *stock* A (a concentração de arginina usada foi de 1,5g/L, a menos que se diga o contrário na seção 3. Resultados e discussão) e da solução *stock* B e de 0,2mL da solução *stock* C, a 79mL de água desionizada contendo a fonte de carbono a 2% (m/v) (ou de 2% (v/v), no caso do glicerol), previamente esterilizada em autoclave (121°C , 20min). A preparação do mesmo volume de meio de cultura, com ferro, ocorreu como descrito para o meio de cultura deficiente em ferro, tendo-se juntado, adicionalmente, 2,0mL de solução *stock* D.

Todo o material utilizado foi colocado numa solução de ácido nítrico a 10%, durante uma noite, e posteriormente lavado com água desionizada e seco a 45°C, de forma a reduzir qualquer influência de metais.

Tabela 3. Composição das soluções *stock* usadas na preparação dos meios de cultura.

Solução <i>stock</i>	Composto	Concentração solução <i>stock</i> (g/L)	Concentração final no meio de cultura
Solução <i>stock</i> A	K ₂ SO ₄	10	1,0 g/L
	CH ₃ COONH ₄	30	3,0 g/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	8	0,8 g/L
	Arginina.HCl	15	1,5 g/L
Solução <i>stock</i> B	Na ₂ HPO ₄	30	3,0 g/L
Solução <i>stock</i> C	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86	8,6 mg/L
	MnSO ₄ .H ₂ O	0,0113	0,113 mg/L
Solução <i>stock</i> D	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,48	29mg/L

2.3. Crescimento do microrganismo

A bactéria foi armazenada em placas contendo Nutriente Agar (8g/L de caldo nutritivo e 20g/L de agar-agar), a 4°C.

A cultura inicial foi obtida por inoculação de 1-2 ansas da bactéria (das placas de Nutriente Agar) em 20mL de meio de cultura com ferro, num frasco *Erlenmeyer* de 100mL de capacidade. As bactérias foram incubadas a 37°C, durante 24h.

Após 24h, foi realizada uma pré-cultura, através da inoculação de 20mL de meio de cultura deficiente em ferro, num frasco *Erlenmeyer* de 100mL de capacidade, com um volume apropriado da cultura inicial, de forma a se obter após 8h uma DO_{600nm} de 0,5. O matraz foi colocado num agitador orbital (*Gallenkamp*), a 25°C e 150 rpm, durante 6 a 8h. Para limitar o arrasto de ferro, o inóculo foi preparado por inoculação de 20mL de meio de cultura deficiente em ferro, com um volume apropriado da pré-cultura de forma a se obter após 15-16h uma DO_{600nm} ~1,5. As bactérias foram incubadas em condições similares às

anteriormente referidas para a pré-cultura. Esta técnica reduz os níveis de contaminação com ferro para valores inferiores a 0,005mg/L; isto é, dentro da gama necessária para induzir a máxima produção de sideróforo (Hu e Boyer, 1996a).

A cultura, em fase exponencial de crescimento, foi obtida através da transferência de um volume apropriado de inóculo para um frasco Erlenmeyer de 100 ou de 1000mL de capacidade, contendo 40 ou 400mL, respetivamente, de meio de cultura deficiente em ferro, de modo a se obter uma DO_{600nm} inicial de 0,020; exceção para a experiência sobre o efeito da fase de crescimento na produção de sideróforo, na qual se usou uma DO_{600nm} inicial de 0,1. As condições de incubação da cultura foram similares às referidas anteriormente.

Foram retiradas amostras nos tempos pré-definidos, referidos no capítulo 3. Para avaliação de produção de sideróforo, determinação dos açúcares redutores totais e de compostos libertados no meio de cultura, as amostras foram primeiramente centrifugadas a 4000xg durante 5 minutos, posteriormente filtradas utilizando filtros de 0,45 μ m de porosidade e subsequentemente armazenadas a -20°C.

2.4. Avaliação do crescimento da bactéria

O crescimento celular foi determinado espectrofotometricamente, a 600nm (Unicam), em triplicado, após diluição conveniente da cultura com água desionizada.

Na avaliação do crescimento celular, determinou-se a taxa específica de crescimento (μ). Este parâmetro é determinado durante a fase de crescimento exponencial (equação 1).

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \quad (\text{equação 1})$$

Em que:

- μ é a taxa específica de crescimento (h^{-1});
- X_0 é a densidade populacional inicial;
- X_t é a densidade populacional após t horas.

A aplicação de logaritmos naturais a ambos os membros da equação:

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t \quad (\text{equação 2})$$

Isto é,

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t} \quad (\text{equação 3})$$

A taxa específica de crescimento (μ) permite assim avaliar o aumento da densidade populacional, por unidade de tempo (equação 3).

O tempo de duplicação (t_d) de uma comunidade celular está relacionado com a taxa específica de crescimento e pode ser calculada através da equação 4:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{equação 4})$$

O tempo de duplicação (também conhecido como tempo de geração) é o tempo necessário para que haja duplicação da população celular.

2.5. Observação da esporulação

As amostras foram fixadas com 3,5% (v/v) de formaldeído, durante 2h, à temperatura ambiente, homogeneizando-se de 30 em 30 minutos e, posteriormente, colocadas a 4°C. A observação das células foi efetuada por microscopia de contraste de fase (Leica DLMB). As imagens foram adquiridas usando uma câmara Leica DC 300F e processadas utilizando *software* Leica IM50.

2.6. Determinação da produção de sideróforo

Na determinação da produção de sideróforo pela bactéria *B. megaterium* foi utilizado o teste colorimétrico *Chrome Azurol S* (CAS) (Das *et al*, 2007).

O reagente CAS foi preparado por dissolução de 21,9mg de HDTMA, em 25mL de água desionizada, com agitação e aquecimento moderado, e de 10,86g de MES em 50mL de água desionizada. Posteriormente, juntaram-se ambas as soluções, adicionando-se 1,5mL de 1mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10mmol/L HCl e 7,5mL de solução CAS 2mmol/L;

acertou-se o pH a 5,6. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100mL de capacidade e acertou-se o volume com água desionizada. O reagente CAS foi armazenado em frascos de polietileno, no escuro, a 25°C.

A concentração de sideróforo foi determinada misturando-se 1mL de filtrado (convenientemente diluído, com água desionizada), com 1mL de reagente CAS. O branco foi efetuado misturando-se 2,0mL de uma solução de 4,0mmol/L desferal, preparada com água desionizada, com 2,0mL de reagente de CAS. Como referência substituiu-se o volume de filtrado por igual volume de água desionizada. Após 5h de incubação, no escuro, à temperatura ambiente, foi determinada a densidade ótica a 630nm, tendo-se determinado a concentração de sideróforo.

2.7. Determinação dos açúcares redutores totais

O acompanhamento de utilização da fonte de carbono foi levado a cabo estimando-se a concentração de glucose, nos filtrados preparados como acima descrito, pelo doseamento dos açúcares redutores totais pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Os açúcares redutores, em meio alcalino, reduzem o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, por oxidação dos grupos carbonilo a carboxilo (Miller, 1959).

A preparação do reagente de DNS consistiu na dissolução de 150,0g de tartarato duplo de sódio e potássio em 250mL de água destilada, a 80°C, e na dissolução de 0,5g de 3,5-dinitrossalicílico em 100mL de NaOH 2mol/L, a 80°C. Posteriormente misturaram-se as duas soluções num balão volumétrico de 500mL de capacidade e o seu volume foi completado com água desionizada. O reagente de DNS foi armazenado num frasco de vidro a 4°C.

Para se determinar o consumo de açúcar pelo método DNS misturou-se 0,5mL do filtrado, previamente diluído com água desionizada, com 0,5mL de reagente de DNS. Após homogeneização, a mistura foi aquecida a 100°C, durante 5 minutos. Arrefeceu-se rapidamente os tubos, à temperatura ambiente, e adicionou-se 5,0mL de água desionizada. O branco foi realizado substituindo o volume de amostra por igual volume de água desionizada. Determinou-se a densidade ótica a 540nm, tendo-se determinado a concentração de açúcares redutores totais.

2.8. Determinação da liberação de nucleótidos e proteínas no meio de cultura

A determinação da liberação de compostos que absorvem a 260 e 280nm foi efetuada por leitura direta num espectrofotómetro, usando uma cuvete de quartzo. Quando necessário o filtrado foi convenientemente diluído em meio de cultura sem ferro. O meio de cultura deficiente em ferro foi utilizado como branco.

2.9. Reprodutividade dos resultados

Todas as experiências foram efetuadas, pelo menos, em duplicado. A determinação da produção de sideróforo e do consumo dos açúcares redutores totais, em cada experiência, foi efetuada, pelo menos, em quadruplicado. Os resultados estão apresentados como a média \pm desvio padrão das medições efetuadas.

Capítulo III

Resultados e discussão

3. Resultados e discussão

3.1. Influência da fase de crescimento na produção de sideróforo

Com o objectivo de se avaliar o efeito da fase de crescimento na produção de sideróforo, a bactéria *B. megaterium*, em fase exponencial de crescimento, foi inoculada num meio de cultura sem ferro contendo 5 ou 20g/L de glucose. Tal como se pode observar na Figura 8, a bactéria apresentou um perfil de crescimento similar para ambas as concentrações de fonte carbono. O tempo de duplicação da bactéria *B. megaterium*, nas condições culturais estudadas (meio de cultura sem ferro, a 25°C, com uma agitação de 150rpm) foi de ~2,3h. A fase estacionária do crescimento da bactéria iniciou-se por volta das 24h para ambas as concentrações de glucose.

A produção de sideróforo, pela bactéria *B. megaterium*, foi monitorizada pelo teste colorimétrico CAS (Shin *et al*, 2001). O princípio deste método pode ser sumarizado pela equação 5:



Em que:

- CAS – Reagente *Chrome Azurol S*;
- L – Ligando (sideróforo);
- FeCAS – complexo de ferro (III) com CAS;
- FeL – complexo de ferro (III) com o ligando.

Após a adição de um ligando forte (sideróforo) ao complexo ferro-CAS (de cor azul), forma-se o complexo ferro-sideróforo (FeL) e o reagente CAS é libertado modificando a cor da solução (laranja). O teste CAS mede a produção de sideróforo independentemente da sua estrutura química, tendo somente, de ser capaz de quelatar o ferro do complexo ferro-CAS (Shin *et al*, 2001). Contudo, uma vez que o sideróforo produzido pela bactéria *B. megaterium* se encontra caracterizado (Hu e Boyer, 1995), este teste pode ser usado para monitorizar a produção de sideróforo.

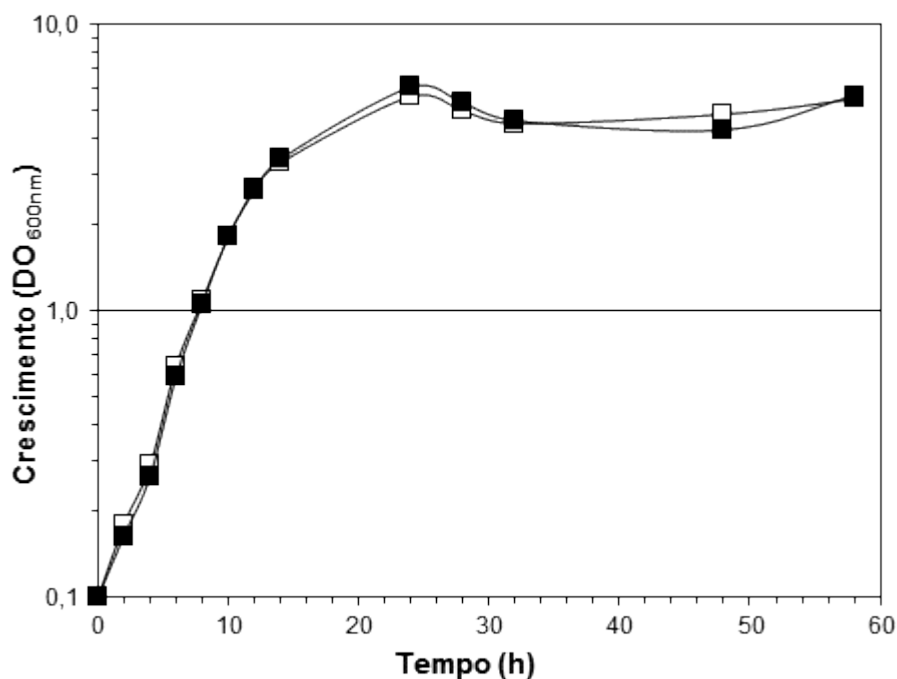


Figura 8. Perfil de crescimento da bactéria *B. megaterium* na presença de diferentes concentrações de glicose. A bactéria, em fase exponencial de crescimento, foi inoculada em meio de cultura deficiente em ferro contendo (■) 5 ou (□) 20g/L de glicose e incubada a 25°C e com uma agitação de 150 rpm.

A produção de sideróforo ocorreu após 8h de incubação, isto é, durante a fase exponencial de crescimento, sendo que houve um aumento acentuado entre as 14 e as 24h (Figura 9). Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura, usando como fonte de carbono a sacarose e 37°C como temperatura de incubação (Hu e Boyer, 1996a). O meio com 5g/L de glicose, apresentou um maior aumento de produção, tendo-se observado, ao fim de 24h, uma concentração de sideróforo de 925 μ mol/L; após 24h de crescimento no meio de cultura com 20g/L de glicose a concentração de sideróforo foi de 716 μ mol/L. No entanto, ao fim de 58h de crescimento, obteve-se uma produção similar de sideróforo, para ambos os meios de cultura, 1283 μ mol/L e 1260 μ mol/L no meio de cultura com 5 e com 20g/L de glicose, respetivamente (Figura 9). Estes resultados sugerem que a concentração inicial de glicose, no meio de cultura, não influencia, de modo apreciável, nem o início de produção nem a concentração de sideróforo produzido pela bactéria.

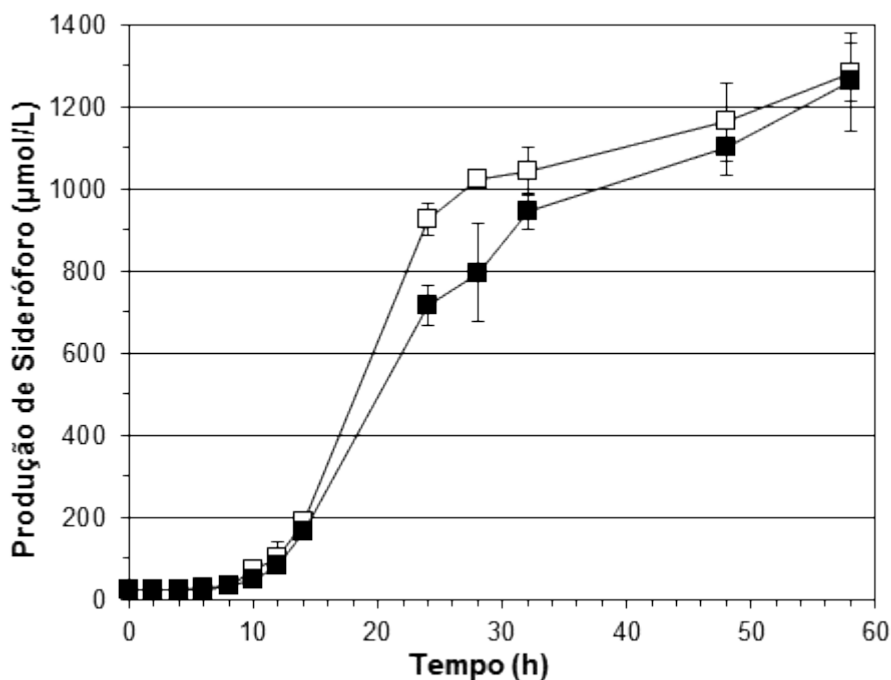


Figura 9. Produção de sideróforo na presença de diferentes concentrações de glicose. A bactéria, em fase exponencial de crescimento, foi inoculada em meio de cultura deficiente em ferro contendo (■) 5 ou (□) 20g/L de glicose e incubada a 25°C e com uma agitação de 150 rpm. Cada ponto corresponde à média de quatro determinações; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).

Para melhor se compreender o efeito da concentração da fonte de carbono no crescimento da bactéria e produção de sideróforo, fez-se o acompanhamento da sua utilização, através do doseamento dos açúcares redutores totais pelo método do DNS (Miller, 1959).

A paragem de crescimento exponencial das células não parece estar associada com a exaustão da glicose (Figura 10), uma vez que ao fim de 24h, altura em que a bactéria já se encontra em fase estacionária, as células ainda tinham disponíveis para consumo 2,8 e 18,5g/L de glicose, no meio de cultura com uma concentração inicial de 5 e 20g/L de glicose, respetivamente. Após 58h de incubação, no meio de cultura com uma concentração inicial de 5g/L de glicose observou-se a exaustão da fonte de carbono; porém, no meio de cultura com uma concentração inicial de 20g/L de glicose só ocorreu um consumo de cerca de 40% da fonte de carbono.

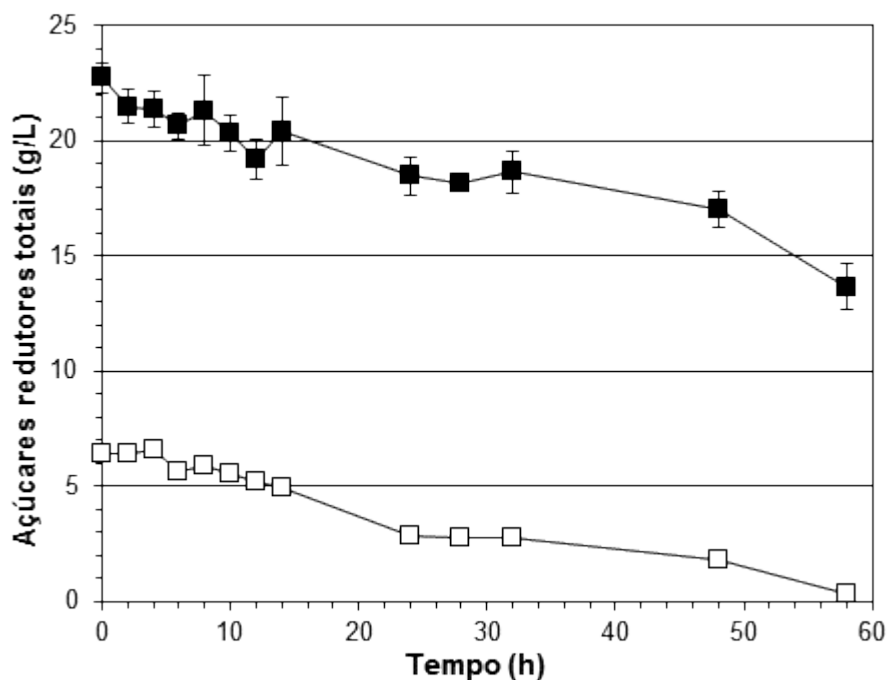


Figura 10. Consumo de açúcar durante o crescimento da bactéria *B. megaterium* na presença de diferentes concentrações de glicose. A bactéria em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura deficiente em ferro contendo (□) 5 ou (■) 20g/L de glicose. Cada ponto representa a média de quatro determinações; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). Quando não se observam barras de erro, significa que estão contidas no ponto.

As bases heterocíclicas púricas e pirimídicas, que constituem o DNA, absorvem preferencialmente, radiação num comprimento de onda de 260nm, enquanto que as proteínas absorvem preferencialmente radiação num comprimento de onda de 280nm (Ninfa e Ballou, 1998). Deste modo, no sentido de se determinar se houve a libertação, pelas bactérias, de nucleótidos e/ou de proteínas, foi determinado a absorvância a 260 ou 280nm, respetivamente (Figura 11).

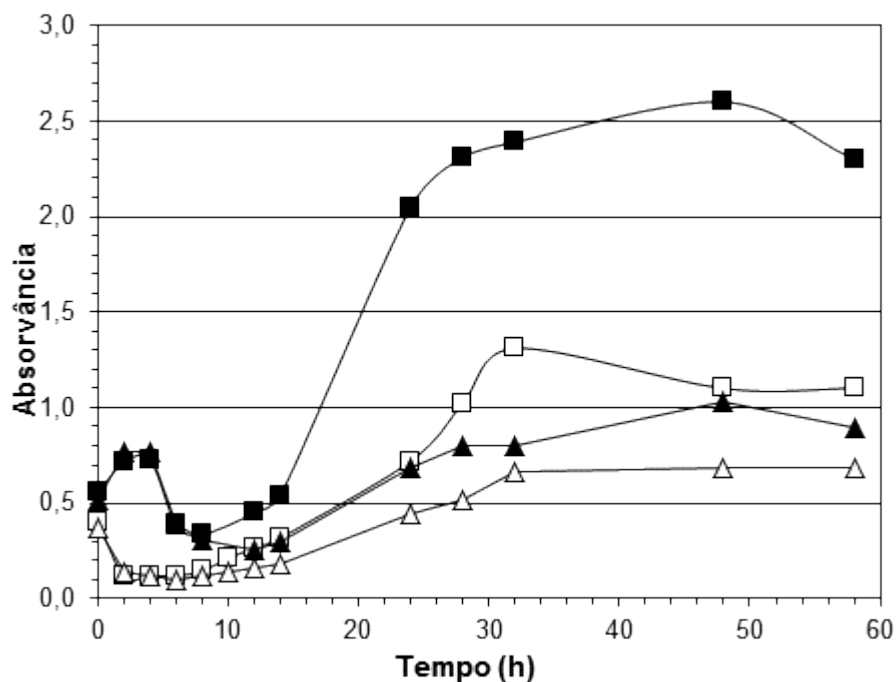


Figura 11. Liberação de componentes que absorvem a 260 ou 280nm, durante o crescimento da bactéria *B. megaterium* na presença de diferentes concentrações de glicose. A bactéria em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura deficiente em ferro contendo 5 (símbolos abertos) ou 20g/L de glicose (símbolos fechados). Compostos que absorvem a 260 (quadrados) ou a 280nm (triângulos).

A produção de sideróforo parece não estar correlacionada com a liberação de compostos a 260 e 280nm. A liberação destes compostos ocorre após o início de produção de sideróforo (Figura 9 e Figura 11). O meio de cultura com uma concentração inicial de 20g/L de glicose apresenta uma maior liberação de compostos, quer a 260 quer a 280nm, relativamente ao meio de cultura com uma concentração inicial de 5g/L de glicose.

Neste estudo, avaliou-se, também, a produção de endósporos pela bactéria *B. megaterium* durante as 58h de crescimento (Figura 12).

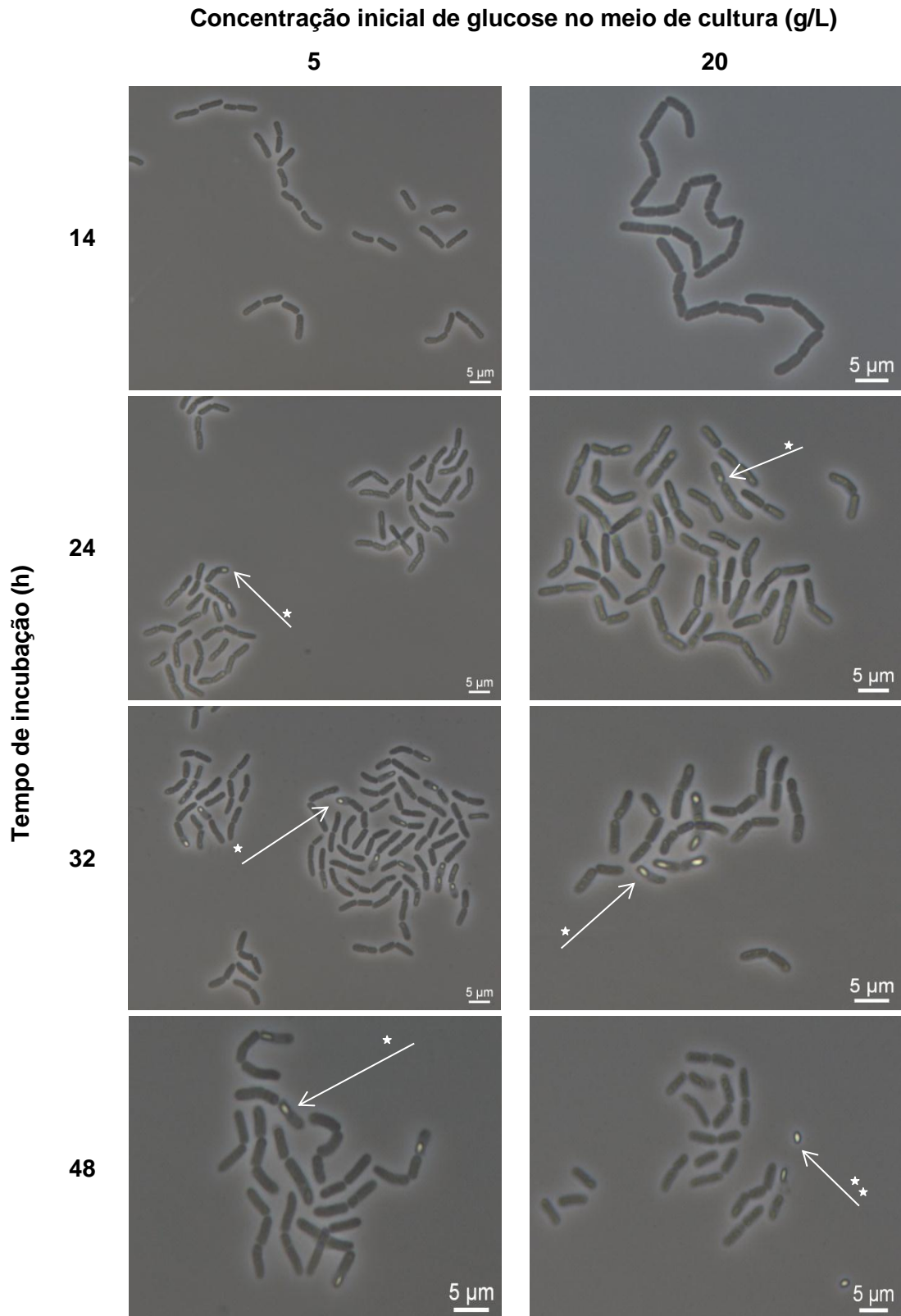


Figura 12. Fotografias de microscopia de contraste de fase da bactéria *B. megaterium* durante o crescimento em meio de cultura deficiente em ferro contendo 5 ou 20g/L de glucose. Setas com uma estrela: presença de endósporos. Setas com duas estrelas: presença de esporo livre.

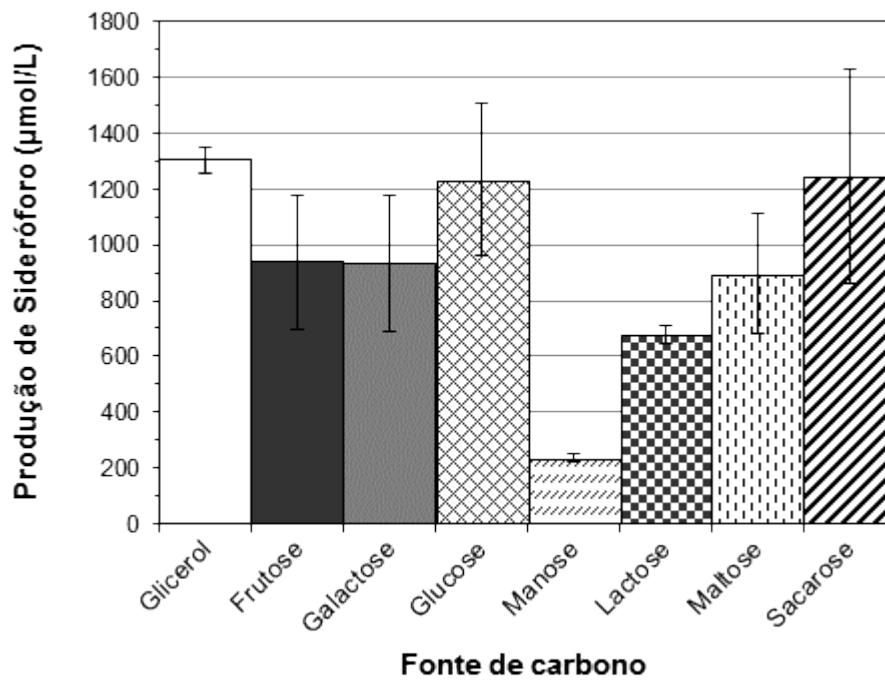
Observou-se a presença de endósporos após 24h de crescimento, em ambos os meios de cultura (Figura 12). Após 48h de crescimento observou-se a presença de esporos livres, particularmente no meio de cultura com uma concentração inicial de glucose de 20g/L. Uma vez que a produção de sideróforo teve início após 8h de crescimento, estes dados sugerem que a produção de sideróforo não aparenta estar relacionada com a esporulação da bactéria *B. megaterium*.

3.2. Efeito da fonte de carbono na produção de sideróforo

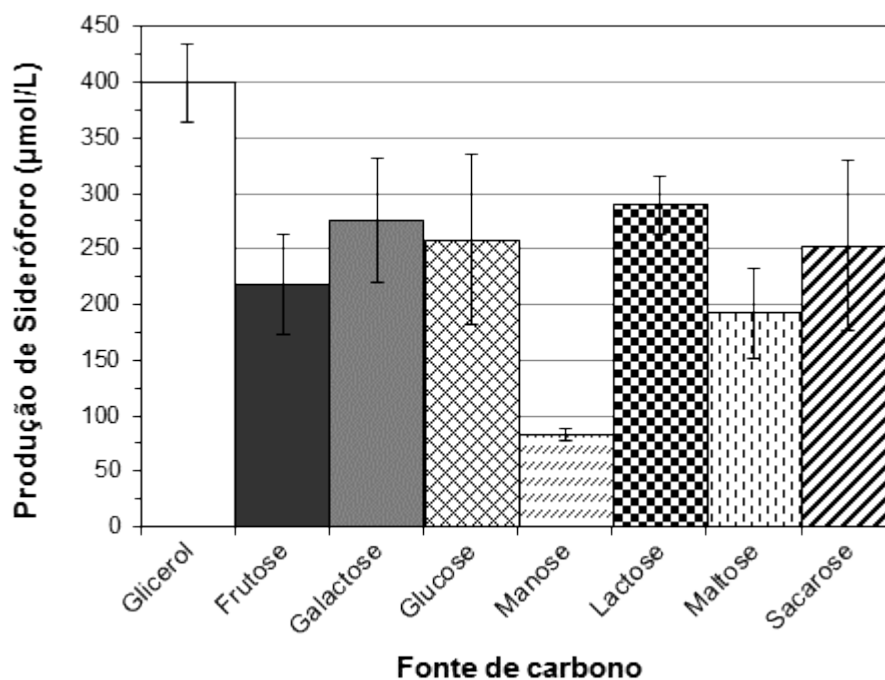
A segunda etapa, do presente trabalho, consistiu no estudo da influência de diferentes fontes de carbono na produção de sideróforo. Este estudo teve como objectivo seleccionar a fonte de carbono que inserido, no meio de cultura sem ferro, já descrito anteriormente na secção 2.2, produzisse a maior quantidade de sideróforo, e/ou que apresentasse o mais baixo custo, como são o caso de subprodutos de outras indústrias, que sejam declarados como desperdícios, com pouco valor comercial.

Para tal, testaram-se diferentes fontes de carbono: glicerol; monossacáridos (frutose, galactose, glucose e manose) e dissacáridos (lactose, maltose e sacarose), tendo-se determinado a produção de sideróforo após 48h de crescimento da bactéria.

Perante os resultados obtidos (Figura 13.A) constata-se que há produção de sideróforo na presença de qualquer uma das oito fontes de carbono analisadas. O glicerol aparenta ser a melhor fonte de carbono para a produção de sideróforo. O glicerol é um subproduto da produção do biodiesel, sendo economicamente viável a sua utilização. No meio de cultura com glucose ou com sacarose também se verifica uma produção elevada de sideróforo 1234 e de 1245 μ mol/L, respetivamente. Nos meios de cultura com frutose, galactose e maltose, como fonte de carbono, obteve-se uma produção de sideróforo similar com valores entre 900-937 μ mol/L. Já no meio de cultura com lactose a produção de sideróforo foi um pouco inferior. Finalmente, verifica-se que a manose originou a pior produção de sideróforo (Figura 13.A).



A.



B.

Figura 13. Produção de sideróforo pela bactéria *B. megaterium* na presença de diferentes fontes de carbono. A - Produção de sideróforo após 48h de crescimento. B - Produção de sideróforo após 48h de crescimento, normalizada considerando o crescimento da bactéria em cada fonte de carbono. Cada barra representa a média de oito determinações, correspondentes a duas experiências independentes. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).

A análise da produção de sideróforo normalizada (Figura 13.B), considerando o crescimento bacteriano em cada fonte de carbono, evidencia algumas diferenças relativamente à produção não normalizada de sideróforo. Contudo, o glicerol permanece como sendo a melhor fonte de carbono e a manose como a pior fonte de carbono na produção de sideróforo. Os meios de cultura contendo frutose, galactose, glucose, lactose, maltose e sacarose originaram produções similares de sideróforo. Nas condições de cultura utilizadas, 25°C e uma agitação de 150rpm, o glicerol é a melhor fonte de carbono para a produção de sideróforo pela bactéria *B. megaterium*.

3.3. Efeito da concentração de arginina na produção de sideróforo

O azoto é, a par da fonte de carbono, um elemento essencial ao crescimento microbiano. Encontra-se descrito na literatura que a adição de 1,5g/L de arginina ao meio de cultura aumenta significativamente a produção de *schizokinen* pela bactéria *B. megaterium*. (Mullis *et al*, 1971). Nesse sentido, avaliou-se a influência da variação da concentração deste aminoácido na produção de sideróforo. Para tal, preparou-se três meios de cultura, sem ferro, com diferentes concentrações de arginina: 1,5, 3,0 e 4,5g/L, usando como fonte de carbono a sacarose (2% - m/v).

O aumento da concentração de arginina, no meio de cultura, não se traduziu nem por um estímulo do crescimento, nem por um aumento da produção de sideróforo (Figura 14).

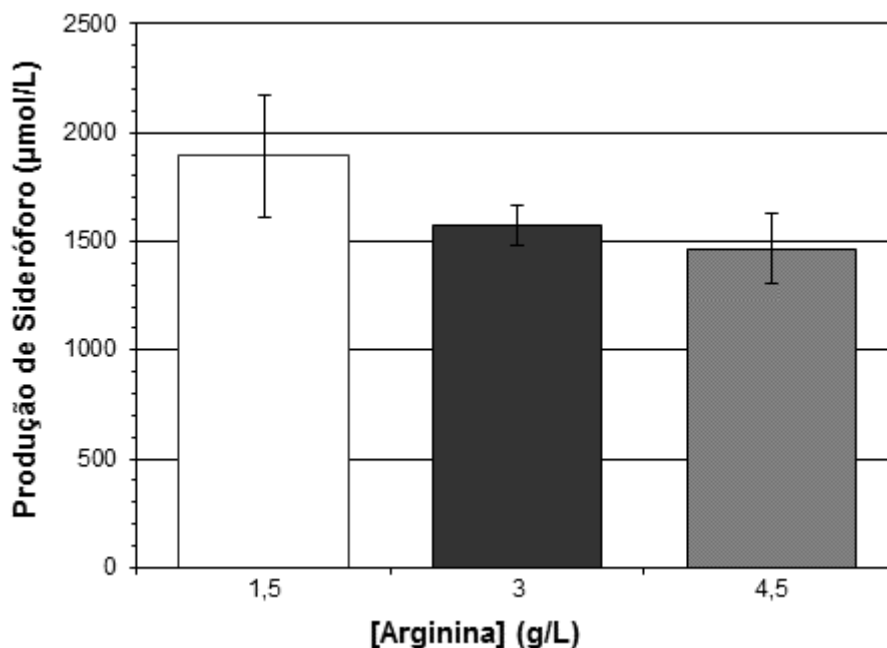
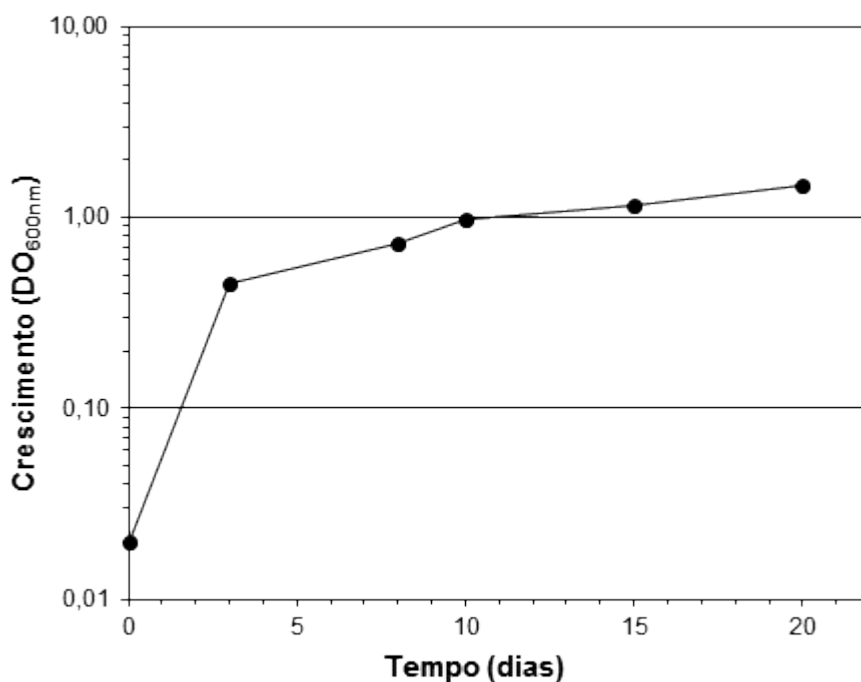


Figura 14. Produção de sideróforo pela bactéria *B. megaterium*, na presença de diferentes concentrações de arginina. Cada barra representa a média de oito determinações, correspondentes a duas experiências independentes. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).

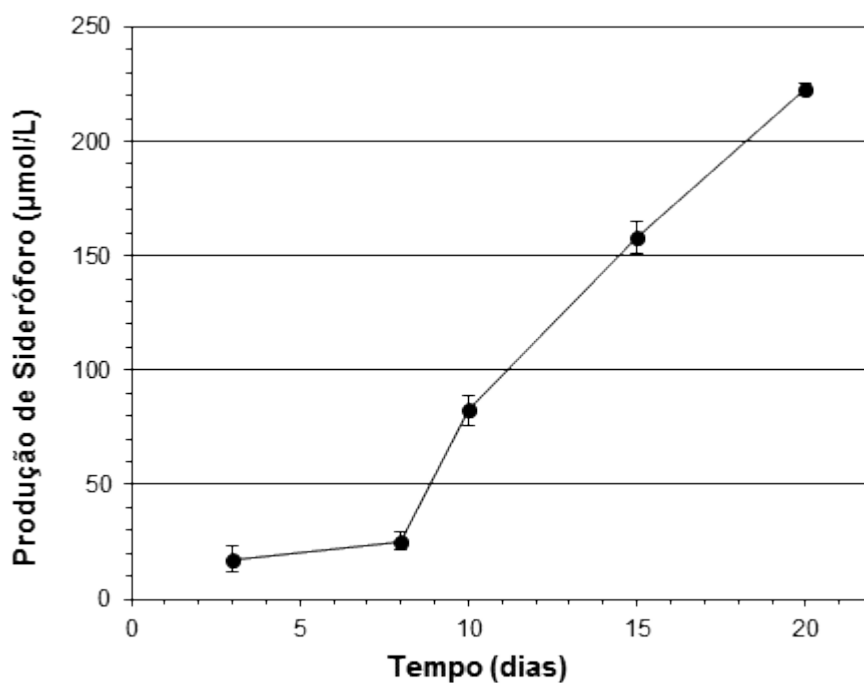
3.4. Efeito da agitação na produção de sideróforo

O *B. megaterium* é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia, produtora de esporos. No sentido de se otimizar a produção de sideróforo, por *B. megaterium*, foi testado a influência da agitação. Deste modo, uma cultura, em fase exponencial de crescimento foi inoculada com uma DO_{600nm} de 0,020 num meio de cultura sem ferro contendo 2% (m/v) de glucose e incubada a 25°C, em condições estáticas (sem agitação).

Tal como se pode observar na Figura 15.A, o *B. megaterium* é capaz de crescer na ausência de agitação, ainda que muito mais lentamente do que quando agitado a 150rpm (Figura 8).



A.



B.

Figura 15. Efeito da agitação no crescimento e produção de sideróforo pela bactéria *B. megaterium*. A - Perfil de crescimento da bactéria usando glucose como fonte de carbono, a 25°C, na ausência de agitação. B - Produção de sideróforo nas condições referidas em A. Cada ponto representa a média de quatro determinações. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).

Verificou-se, ainda, que a ausência de agitação não inibe a produção de sideróforo pela bactéria *B. megaterium*. No entanto, foi necessário 10 dias de incubação para que houvesse somente a produção de 82 μ mol/L de sideróforo. No final do ensaio, após 20 dias de incubação, a produção traduziu-se numa concentração de 223 μ mol/L de sideróforo. Comparando este valor com a concentração obtida (1234 μ mol/L de sideróforo) ao fim de 48h de incubação, a 25°C e 150rpm, do meio de cultura sem ferro com glucose (Figura 13.A), constata-se que a agitação e, conseqüentemente, a presença de oxigénio é importante para o crescimento da bactéria e produção de sideróforo.

Capítulo IV

Conclusões

4. Conclusões

No presente estudo avaliou-se o efeito das condições culturais e nutricionais na produção de sideróforo pela bactéria *Bacillus megaterium* ATCC 19213. Dos resultados obtidos foi possível obter as seguintes conclusões:

A) O desencadear da produção de sideróforo ocorre durante a fase exponencial de crescimento.

B) O início da produção de sideróforo não está relacionado com a esporulação, nem parece ser afetada pela concentração inicial de glucose presente no meio de cultura.

C) O tipo de fonte de carbono influencia a produção de sideróforo. A maior produção de sideróforo ocorreu na presença de glicerol e a menor na presença de manose. Foram obtidas concentrações similares de sideróforo quando a bactéria cresceu na presença de frutose, galactose, glucose, lactose, maltose e sacarose.

D) O aumento da concentração de arginina, no meio de cultura, não estimula a produção de sideróforo.

E) A agitação e conseqüentemente o arejamento apresenta um efeito positivo na produção de sideróforo. A incubação da bactéria em condições estáticas atrasou e diminuiu a produção de sideróforo pela bactéria *Bacillus megaterium* ATCC 19213.

Capítulo V

Sugestões para trabalho futuro

5. Sugestões para trabalho futuro

Com o objetivo de complementar e aprofundar o trabalho desenvolvido na presente dissertação, sugere-se, como trabalho futuro, a avaliação da ausência de arginina e do efeito de diferentes níveis de arejamento na produção de sideróforo pela bactéria *Bacillus megaterium* ATCC 19213.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Arceneaux JEL e Byers BR (1980) Ferrisiderophore reductase activity in *Bacillus megaterium*. J Bacteriol 141: 715-721
- Arceneaux JEL, Boutwell ME e Byers BR (1984) Enhancement of copper toxicity by siderophores in *Bacillus megaterium*. Antimicrob Agents and Ch 25: 650-652
- Benite AMC, Machaso SP e Machado BC (2002) Sideróforos: uma resposta dos microrganismos. Quim Nova 25: 1155-1164
- Bucheli-Witschel M e Egli T (2001) Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. FEMS Microbiol Rev 25: 69-106.
- Byers BR, Powell MV e Lankford CE (1967) Iron-chelating hydroxamic acid (Schizokinen) active in initiation of cell division in *Bacillus megaterium*. J Bacteriol 93: 286-294
- Cardoso MA, Clementino BMB, Martins OB, Vieira RP, Almeida RV, Alqueres SMC, Almeida WI (2003) *Archea*: Potencial biotecnológico – utilização e aplicação de arqueas na biotecnologia. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 30: 71-77 <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio30/archaea.pdf> (Acedido a 29 de Setembro de 2012).
- Das A, Prasad R, Srivastava A, Giang PH, Bhatnagar K e Varma A (2007) Fungal siderophores: structure, functions and regulation. Em: Varma A e Chincholkar (ed) Microbial Siderophores. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp: 1-42
- Davis WB, McCauley MJ e Byers BR (1970) Iron requirements and aluminum sensitivity of an hydroxamic acid-requiring strain of *Bacillus megaterium*. J Bacteriol 105: 589-594
- Domingo JL (1995) Prevention by chelating agentes of metal-induced developmental toxicity. Reprod Toxicol 9:105-113
- Domingo JL (1998) Developmental toxicity of metal chelating agentes. Reprod Toxicol 12: 499-510

- Egli T (2001) Biodegradation of metal-complexing aminopolycarboxylic acids. *J Biosci Bioeng* 92: 89-97
- Fedrizzi SMG (2006) Produção de metabólitos antimicrobianos e sideróforos de isolados provenientes de Terra Preta Antropogênica da Amozônia Ocidental. Dissertação de Doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo. 117pp. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64133/tde-20032007-081838/pt-br.php> (acedido a 19 de Março de 2012)
- Hider RC e Kong X (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 27: 637-657
- Hu X e Boyer GL (1995) Isolation and characterization of the siderophore N-deoxyschizokinen from *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *Bio Metals* 8: 357-364
- Hu X e Boyer GL (1996a) Siderophore-Mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *Appl Environ Microbiol* 62: 4044-4048
- Hu X e Boyer GL (1996b) Effect of metal ions on the quantitative determination of hydroxamic acids. *Anal Chem* 68: 1812-1815
- Illmer P e Buttinger R (2006) Interactions between iron availability, aluminium toxicity and fungal. *Biometals* 19:367-377
- Knepper TP, Werner A e Bogenschütz G (2005) Determination of synthetic chelating agents in surface and waste water by ion chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogra A* 1085: 240-246
- Kraemer SM (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci* 66: 3-18
- Machuca A, Milagres AMF (2003) Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Lett Appl Microbio*. 36: 177-181

- Milagres AMF, Machuca A, Napoleão D (1999) Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol s (CAS) agar plate assay. J Microbiol Meth 37: 1-6
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 31:426-428
- Mullis KB, Pollack JR, Neilands JB (1971) Structure of schizokinen, an iron-transport compound from *Bacillus megaterium*. Biochemistry 10: 4894-4898
- Ninfa AJ e Ballou DP (1998) Quantification of protein concentration. Em: Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology. Fitzgerald Science Press, Inc, Bethesda, Maryland, USA, pp: 77-88
- Omura S (1992) Trends in the search for bioactive microbial metabolites. J Ind Microbiol. 10: 135-156
- Oviedo C e Rodríguez J (2003) EDTA: The chelating agent under environmental scrutiny. Quim Nova 26: 901-905
- Reichard PU (2005) Effects of microbial and plant siderophore ligands on the dissolution of iron oxides. Dissertação de Doutorado em Ciências Naturais. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich. 189pp
- Shin SH, Lim V, Lee SE, Yang NW, Rhee JH (2001) CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. J Microbiol Meth 44: 89-95
- Sillanpää M (1997) Environmental fate of EDTA and DTPA. Rev Environ Contam Toxicol 152: 85-111
- Storey SP, Boghozian R, Little JL, Lowman DW e Chakraborty R (2006) Characterization of 'Schizokinen'; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. Biometals 19: 637-649

