

Production of the violet pigment violacein by psychrophilic strains of bacteria: extraction and identification



Zakharova Yu.R.*, Martsinechko A.S., Marchenkov A.M.,
Petrova D.P., Fedorova G.A.

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. Psychrophilic pigment-forming strains, isolated from Lake Baikal and the Pokhabikha River, were studied. Based on culture-based, morphological, and biochemical properties, as well as the results of 16S rRNA gene sequence analysis, the studied bacteria were assigned to the genera *Janthinobacterium* and *Iodobacter*. The strains are able to form biofilms and produce violet pigment. When the pigments were extracted with methanol and identified by MALDI/TOF mass spectrometry, the pigments violacein and deoxyviolacein were identified.

Keywords: psychrophilic bacteria, purple pigment, violacein, MALDI/TOF

For citation: Zakharova Yu.R., Martsinechko A.S., Marchenkov A.M., Petrova D.P., Fedorova G.A. Production of the violet pigment violacein by psychrophilic strains of bacteria: extraction and identification // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1149-1154. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1149

1. Introduction

Microbial communities occupying cold habitats are constantly exposed to several stressors, such as extreme low temperatures, oligotrophic conditions, freeze-thaw cycles, and UV radiation. In order to survive these aggressive conditions, microorganisms adapt by means of several defense strategies, including the production of different pigments (Sajjad et al., 2020). The bacteria, which have a purple color that gives them the pigment violacein, belong to several genera that have been found in a variety of natural environments, including low temperatures (Baricz et al., 2018). Violacein is a violet or purple bisindole water-insoluble pigment synthesized by condensation of two modified tryptophan molecules and consists of oxindole, 2-pyrrolidone, and 5-hydroxyindole subunits (Füller et al., 2016). Violacein has a variety of biological activities, including strong antibacterial activity against a wide range of bacteria (Asencio et al., 2014; Arif et al., 2017), antifungal, antiviral, antiprotozoal, and anti-tumor activity (Durán et al., 2007; Soliev et al., 2011; Choi et al., 2015). In this work, we isolated three strains of psychrophilic, purple pigment-producing bacteria and described the methods for pigment extraction and identification by MALDI mass spectrometry.

2. Materials and methods

Surface water samples were collected in South Baikal in September 2022 near the Pokhabikha River and in March 2023 near the Bolshye Koty settlement. Seeds of water samples were incubated at 4°C for 10 days on PPA/10 nutrient medium. Purple-colored colonies were then selected and dispersed several times using the depleting stroke method until pure cultures were obtained. The culture-based and morphological characteristics of the strains obtained were studied microscopically as described previously (Bashenkaeva and Zakharova, 2017). The optimum growth temperature for increasing the yield of bacterial biomass was investigated on 1% peptone broth at 0, 4, 8, 12, 16, 22, 26, 30, and 37°C. The growth of cultures was assessed in three replicates at each selected temperature for 10 days using a biological spectrophotometer Bio Spectrometr Basic, Eppendorf.

Taxonomic affiliation of the isolated strains was carried out by molecular-biological methods based on the analysis of sequences of 16S rRNA gene fragments. For DNA isolation, bacterial biomass was collected from agar slant in 1 ml of sterile TE buffer, followed by phenol-chloroform extraction method. Amplification of the 16S pPHK gene fragment was performed using

*Corresponding author.

E-mail address: julia.zakharova@gmail.com (Yu.R. Zakharova)

Received: July 15, 2024; **Accepted:** August 02, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



the prepared PCR mixture 2XTaqM (AlkorBio, Russia) and primers 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and 1350R (5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3'). Amplification products were sequenced using the GenSeq kit (Syntol, Russia) on the genetic analyzer NanoFor 05 (Syntol, Russia) at the Ultramicroanalysis Center of LIN SB RAS (Irkutsk).

For pigment extraction, bacterial strains were dispersed on Petri dishes with SNA/10 medium and cultured at 26°C for 72 hours. Then, the bacterial biomass was collected, transferred to a test tube, 1 ml of methanol was added, shaken well for 10 min and centrifuged (13400 rpm, 5 min). The stained supernatant was separated, and methanol extraction was repeated until the cell mass was almost completely discolored (quantification of pigment production was not done). The supernatants were combined, concentrated to dryness in an argon current at room temperature, and redissolved in 50 µl of methanol. The methanol extract was used for pigment identification by MALDI mass spectrometric analysis. Due to the photosensitivity of violacein, all operations were performed without access to light (tubes were wrapped with aluminium foil) (Huang et al., 2023). One µl of methanol extract was applied to an AnchorChip target (Bruker Daltonik GmbH, Germany), mixed with 1 µl of 2.5-DHB matrix (2.5-dihydroxybenzoic acid, 10 mg/ml), and dried at the room temperature.

Mass-spectra of the extracts were recorded on an UltrafleXtreme MALDI-TOF MS mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Germany) in reflectron mode in the mass range of 300-1000 Da at positive ionisation. Violacein and deoxyviolacein were identified by the presence of intense molecular ions [M]⁺ with characteristic ratios of m/z 343.5 and m/z 327.5 in the mass spectra of samples S-RP1, S-B17, and VK-B8.

3. Results and discussion

Three strains were isolated from the Pokhabikha River water (strain S-RP1), from the Baikal coastal water opposite the mouth of the Pokhabikha River (strain S-B17), and from the Baikal under-ice water near the settlement of Bolshye Koty (strain VK-B8). The growth of the strains was characterized by the accumulation of violet pigment, biofilm formation, and the ingrowth of colonies into agarized media. The shape, structure, and consistency of S-RP1 colonies were round, smooth, uniform, and dense; S-B17 colonies were round, festooned, striated, and dense; VK-B8 colonies were rhizoid, uniform, and mucilaginous. The bacteria studied were found to be aerobic Gram-negative motile rods arranged in singles, not forming spores with cell size in the range of $1.3-2.4 \times 0.3-0.6$ µm. Strains S-B17 and BK-B8 had a growth range from 0°C to 24°C, strain S-RP1 ranged from 0°C to 30°C. In the study of physiological-biochemical characteristics, positive tests for phospholipase, catalase, collagenase, and urease were determined. Strain BK-B8 was oxidase-positive and hydrolyzed casein but not starch. Strain S-B17 hydrolyzed starch, strain S-RP1 was phosphatase- and lipase-positive and hydrolyzed casein.

As a result of phylogenetic analysis, it is shown that the bacteria studied belong to the family *Oxalobacteraceae*. The sequences of strain S-RP1 had the highest sequence similarity to those of *Janthinobacterium lividum*, and those of strains S-B17 and BK-B8 to *Iodobacter* sp. The culture-based, morphological, and biochemical properties of the studied bacteria coincide with the properties of bacteria belonging to the genera *Janthinobacterium* and *Iodobacter* (Lyakhovchenko et al., 2021; Chernogor et al., 2022).

By the MALDI/TOF method, the purple pigment extracts produced by the tested bacteria were identified as violacein and deoxyviolacein by the presence of intense molecular ions [M]⁺ with characteristic ratios of m/z 343.5 and m/z 327.5 in their mass spectra. The MALDI/TOF method is based on the desorption and ionization of the test substance co-crystallized with the matrix and is characterized by its tolerance to impurities and additives, which allowed the detection and identification of target compounds in the crude extract. The choice of matrix (2.5-DHB) in this study is explained by the insignificant background peaks in the low mass region (less than 500 Da) and its high ability to suppress fragmentation of the investigated compounds.

4. Conclusion

Bacterial pigments are important pharmaceutical and industrial chemicals. The violet pigment violacein has attracted the attention of the scientific community because of its broad biological activity. The isolation, investigation, and identification of strains of violacein producers are of interest for the development of biotechnological processes to enhance the biosynthesis of this compound. We isolated the psychrophilic pigmented bacteria from the genera *Janthinobacterium* and *Iodobacter*, which have high biochemical activity and require more detailed study, because of all the secondary metabolites with antibiotic activity, pigments represent an understudied group.

Acknowledgements

The research was carried out using the equipment of the Shared Research Facilities for Physical and Chemical Ultramicroanalysis LIN SB RAS with the financial support of the project of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 121032300186-9.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Asencio G., Lavin P., Alegría K. et al. 2014. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant gram-negative bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology* 17: 1–5.

Arif S., Batool A., Khalid N. et al. 2017. Comparative analysis of stability and biological activities of violacein and starch capped silver nanoparticles. *RSC Advances* 7: 4468.

Baricz A., Teban C.M., Chiriac E. et al. 2018. Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a one health approach. *Scientific reports* 8: 15272. DOI: [10.1038/s41598-018-33691-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-33691-6)

Bashenkhaeva M.V., Zakharova Yu.R. 2017. Cultivated bacteria from the sub-ice algaebacterial communities of Lake Baikal. *Acta Biol Sibirica* 3(3): 76–85. DOI: [10.14258/abs.v3i3.3619](https://doi.org/10.14258/abs.v3i3.3619)

Chernogor L., Bakhvalova K., Belikova A. et al. 2022. Isolation and properties of the bacterial strain *Janthinobacterium* sp. SLB01. *Microorganisms* 10: 1071. DOI: [10.3390/microorganisms10051071](https://doi.org/10.3390/microorganisms10051071)

Choi S.Y., Yoon K.H., Lee J.I. et al. 2015. Violacein: properties and production of a versatile bacterial pigment. *BioMed Research International*. DOI: [10.1155/2015/465056](https://doi.org/10.1155/2015/465056)

Durán N., Justo G.Z., Ferreira C.V. et al. 2007. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 48: 127–133.

Füller J.J., Röpke R., Krausze J. et al. 2016. Biosynthesis of violacein, structure and function of l-Tryptophan oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Biological Chemistry* 291(38): 20068–20084.

Huang C., Chu X., Hui W. et al. 2023. Study on extraction and characterization of new antibiotics violacein from engineered *Escherichia coli* VioABCDE-SD. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 70(5): 1582-1596. DOI: [10.1002/bab.2454](https://doi.org/10.1002/bab.2454)

Lyakhovchenko N.S., Abashina T.N., Polivtseva V.N. et al. 2021. A blue-purple pigment-producing bacterium isolated from the Vezelka river in the city of Belgorod. *Microorganisms* 9: 102. DOI: [10.3390/microorganisms9010102](https://doi.org/10.3390/microorganisms9010102)

Sajjad W., Din G., Rafiq M. et al. 2020. Pigment production by coldadapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles* 24: 447–473. DOI: [10.1007/s00792-020-01180-2](https://doi.org/10.1007/s00792-020-01180-2)

Soliev A.B., Hosokawa K., Enomoto K. 2011. Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 670349. DOI: [10.1155/2011/670349](https://doi.org/10.1155/2011/670349)

Продукция фиолетового пигмента виолацеина психрофильными штаммами бактерий: экстракция и идентификация

Краткое сообщение

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGYЗахарова Ю.Р.*, Марцинечко А.С., Марченков А.М.,
Петрова Д.П., Федорова Г.А.

Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Исследованы психрофильные пигментобразующие штаммы, изолированные из озера Байкал и реки Похабиха. На основании культуральных, морфологических и биохимических свойств, а также по результатам анализа последовательностей гена 16S рРНК исследуемые бактерии были отнесены к родам *Janthinobacterium* и *Iodobacter*. Штаммы способны образовывать биопленки и продуцировать фиолетовый пигмент. При экстракции пигментов метанолом и их идентификации методом масс-спектрометрии МАЛДИ/ТОФ были идентифицированы пигменты виолацеин и деоксивиолацеин.

Ключевые слова: психрофильные бактерии, фиолетовый пигмент, виолацеин, МАЛДИ/ТОФ

Для цитирования: Захарова Ю.Р., Марцинечко А.С., Марченков А.М., Петрова Д.П., Федорова Г.А. Продукция фиолетового пигмента виолацеина психрофильными штаммами бактерий: экстракция и идентификация // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1149-1154. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1149

1. Введение

Микробные сообщества, населяющие холодные места обитания, постоянно подвергаются воздействию нескольких стрессовых факторов, таких как экстремально низкие температуры, олиготрофные условия, циклы замораживания-оттаивания, УФ излучение. Чтобы справиться с этими агрессивными условиями, микроорганизмы адаптируются с помощью нескольких защитных стратегий, включая продукцию различных пигментов (Sajjad et al., 2020). Бактерии, имеющие фиолетовый цвет, который придает им пигмент виолацеин, являются представителями нескольких родов, которые были обнаружены в разных природных средах, в том числе в условиях низких температур (Baricz et al., 2018). Виолацеин представляет собой фиолетовый или пурпурный бис-индоловый водонерастворимый пигмент, синтезируется путем конденсации двух модифицированных молекул триптофана и состоит из субъединиц оксиндола, 2-пирролидона и 5-гидроксииндола (Füller et al., 2016). Виолацеин обладает разнообразной биологической активностью, в том числе сильным антибактериальным действием против широкого спектра бактерий (Asencio et al., 2014; Arif et al., 2017), противогрибковой,

противовирусной, антипротозойной, противоопухолевой активностью (Durán et al., 2007; Soliev et al., 2011; Choi et al., 2015). В этой работе мы выделили три штамма психрофильных, вырабатывающих фиолетовый пигмент бактерий, и описали способы экстракции пигмента и идентификацию методом масс-спектрометрии МАЛДИ.

2. Материалы и методы

Пробы поверхностной воды были отобраны в Южном Байкале в сентябре 2022 г. в районе р. Похабихи и в марте 2023 г. в районе п. Большие Коты. Посевы образцов воды инкубировали при температуре 4°C в течение 10 суток на питательной среде РПА/10. Затем отбирали колонии фиолетового цвета и несколько раз рассеивали методом истощающего штриха до получения чистых культур. Культуральные и морфологические свойства полученных штаммов исследовали микроскопически как описано ранее (Башенхаева и Захарова, 2017). Оптимальная температура роста для увеличения выхода бактериальной биомассы была исследована на 1% пептонном бульоне при 0, 4, 8, 12, 16, 22, 26, 30, 37°C. Рост культур оценивали в трех повторностях при каждой выбранной температуре в течение

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: julia.zakharova@gmail.com (Ю.Р. Захарова)

Поступила: 15 июля 2024; Принята: 02 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



10 суток с помощью биологического спектрофотометра Bio Spectrometr Basic, Eppendorf.

Таксономическую принадлежность изолированных штаммов проводили молекулярно-биологическими методами на основе анализа последовательностей фрагментов генов 16S рНК. Для выделения ДНК биомассу бактерий собирали со скошенного агара в 1 мл стерильного ТЕ-буфера, далее использовали метод фенол-хлороформной экстракции. Амплификацию фрагмента гена 16S рНК проводили с помощью готовой ПЦР-смесь 2ХТaqМ (АлкорБио, Россия) и праймеров 27F (5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3') и 1350R (5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3'). Продукты амплификации секвенировали с помощью набора ГенСек (Синтол, Россия) на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Синтол, Россия) в ЦКП «Ультрамикроанализа» ЛИН СО РАН (г. Иркутск).

Для экстракции пигмента бактериальные штаммы рассевали на чашках Петри со средой РПА/10 и культивировали при температуре 26°C в течение 72 часов. Затем бактериальную биомассу собирали петлей, переносили в пробирку, добавляли 1 мл метанола, энергично встряхивали в течение 10 мин, центрифугировали (13400 об/мин, 5 мин). Окрашенный супернатант отделяли и повторяли экстракцию метанолом до практически полного обесцвечивания клеточной массы (количественное определение производства пигмента не оценивали). Супернатанты объединяли, концентрировали досуха в токе аргона при комнатной температуре и перерастворяли в 50 мкл метанола. Метанольный экстракт использовали для идентификации пигмента методом масс-спектрометрического анализа МАЛДИ. В связи со светочувствительностью виолацеина все операции проводили без доступа света (пробирки оборачивали алюминиевой фольгой) (Huang et al., 2023). Метанольного экстракта (1 мкл) наносили на мишень AnchorChip (Bruker Daltonik GmbH, Германия), смешивали с 1 мкл матрицы 2,5-DHB (2,5-дигидроксibenзойная кислота, Dihydroxybenzoic acid, 10 мг/мл) и высушивали при комнатной температуре.

Масс-спектры экстрактов регистрировали на масс-спектрометре UltrafleXtreme MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Германия) в режиме рефлектрона в диапазоне масс 300-1000 Да при положительной ионизации. Идентификация виолацеина и деоксивиолацеина (deoxyviolacein) выполняли по наличию в масс-спектрах проб S-RP1, S-B17, BK-B8 интенсивных молекулярных ионов $[M]^+$ с характеристическими отношениями m/z 343.5 и m/z 327.5.

3. Результаты и обсуждение

Три штамма были выделены из воды р. Похабиха (штамм S-RP1), из прибрежной воды Байкала напротив устья р. Похабиха (штамм S-B17) и из подледной воды Байкала в районе п. Большие Коты (штамм BK-B8). Рост штаммов характеризовался накоплением фиолетового пигмента, образованием биопленок и вращением колоний в агари-

зованные среды. Форма, структура и консистенция колоний S-RP1 была круглая, ровная, однородная, плотная; S-B17 круглая фестончатая, струйчатая, плотная; BK-B8 ризоидная, однородная, слизистая. Выявлено, что исследуемые бактерии представлены аэробными грамотрицательными подвижными палочками, расположенными поодиночке, не образующими споры с размером клеток в диапазоне $1.3-2.4 \times 0.3-0.6$ мкм. Штаммы S-B17 и BK-B8 имели диапазон роста от 0°C до 24°C, штамм S-RP1 имел рост от 0°C до 30°C. При изучении физиолого-биохимических характеристик определены положительные тесты на фосфолипазу, каталазу, коллагеназу, уреазу. Штамм BK-B8 был оксидазоположительным, гидролизует казеин, но не крахмал. Штамм S-B17 гидролизует крахмал, штамм S-RP1 был фосфатазо- и липазоположительным, гидролизует казеин.

В результате филогенетического анализа показано, что исследуемые бактерии принадлежат к семейству *Oxalobacteraceae*. Последовательности штамма S-RP1 имели наибольшее сходство с последовательностями *Janthinobacterium lividum*, штаммов S-B17 и BK-B8 с *Iodobacter* sp. Культуральные, морфологические и биохимические свойства исследуемых бактерий согласуются со свойствами бактерий, принадлежащих к представителям родов *Janthinobacterium* и *Iodobacter* (Lyakhovchenko et al., 2021; Chernogor et al., 2022).

Методом МАЛДИ/ТОФ в экстрактах фиолетового пигмента, которые продуцируют исследуемые бактерии, были идентифицированы виолацеин и деоксивиолацеин по наличию в их масс-спектрах интенсивных молекулярных ионов $[M]^+$ с характеристическими отношениями m/z 343.5 и m/z 327.5. Метод МАЛДИ/ТОФ основан на десорбции и ионизации исследуемого вещества, сокристаллизованного с матрицей и характеризуется толерантностью по отношению к примесям и добавкам, что позволило выявить и идентифицировать целевые соединения в грубом экстракте. Выбор матрицы (2,5-DHB) в данном исследовании обусловлен незначительными фоновыми пиками в области низких масс (менее 500 Да) и ее высокой способностью подавлять фрагментацию исследуемых соединений.

4. Выводы

Бактериальные пигменты являются важными фармацевтическими и промышленными химическими веществами. Фиолетовый пигмент виолацеин привлекает внимание научного сообщества из-за его широкой биологической активности. Выделение, исследование и идентификация штаммов продуцентов виолацеина представляют интерес для разработки биотехнологических процессов, с целью повышения биосинтеза этого соединения. Изолированные нами психрофильные пигментированные бактерии из родов *Janthinobacterium* и *Iodobacter* обладают высокой биохимической активностью и требуют более детального изучения, поскольку из всех вторичных метаболитов, обла-

дающих антибиотической активностью, пигменты представляют собой недостаточно изученную группу.

Благодарности

Исследование выполнено с использованием оборудования Приборного центра коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН (ЦКП «Ультрамикрoанализ») при финансовой поддержке проекта Министерства науки и высшего образования РФ № 121032300186-9.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Башенхаева М.В., Захарова Ю.Р. Культивируемые бактерии из подледных альго-бактериальных сообществ озера Байкал. 2017. *Acta Biologica Sibirica*. 3(3): 77–86. DOI: [10.14258/abs.v3i3.3619](https://doi.org/10.14258/abs.v3i3.3619)

Asencio G., Lavin P., Alegría K. et al. 2014. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant gram-negative bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology* 17: 1–5.

Arif S., Batool A., Khalid N. et al. 2017. Comparative analysis of stability and biological activities of violacein and starch capped silver nanoparticles. *RSC Advances* 7: 4468.

Baricz A., Teban C.M., Chiriac E. et al. 2018. Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a one health approach. *Scientific reports* 8: 15272. DOI: [10.1038/s41598-018-33691-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-33691-6)

Chernogor L., Bakhvalova K., Belikova A. et al. 2022. Isolation and properties of the bacterial strain *Janthinobacterium* sp. SLB01. *Microorganisms* 10: 1071. DOI: [10.3390/microorganisms10051071](https://doi.org/10.3390/microorganisms10051071)

Choi S.Y., Yoon K.H., Lee J.I. et al. 2015. Violacein: properties and production of a versatile bacterial pigment. *BioMed Research International*. DOI: [10.1155/2015/465056Sajjad](https://doi.org/10.1155/2015/465056Sajjad)

W., Din G., Rafq M. et al. 2020. Pigment production by coldadapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles* 24: 447–473. DOI: [10.1007/s00792-020-01180-2](https://doi.org/10.1007/s00792-020-01180-2)

Durán N., Justo G.Z., Ferreira C.V. et al. 2007. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 48: 127–133.

Füller J.J., Röpke R., Krausze J. et al. 2016. Biosynthesis of violacein, structure and function of l-Tryptophan oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Biological Chemistry* 291(38): 20068–20084.

Huang C., Chu X., Hui W. et al. 2023. Study on extraction and characterization of new antibiotics violacein from engineered *Escherichia coli* VioABCDE-SD. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 70(5): 1582-1596. DOI: [10.1002/bab.2454](https://doi.org/10.1002/bab.2454)

Lyakhovchenko N.S., Abashina T.N., Polivtseva V.N. et al. 2021. A blue-purple pigment-producing bacterium isolated from the Vezelka river in the city of Belgorod. *Microorganisms* 9: 102. DOI: [10.3390/microorganisms9010102](https://doi.org/10.3390/microorganisms9010102)

Sajjad W., Din G., Rafq M. et al. 2020. Pigment production by coldadapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles* 24: 447–473. DOI: [10.1007/s00792-020-01180-2](https://doi.org/10.1007/s00792-020-01180-2)

Soliev A.B., Hosokawa K., Enomoto K. 2011. Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 670349. DOI: [10.1155/2011/670349](https://doi.org/10.1155/2011/670349)