

Caracterización de un pigmento naranja producido por una cepa nativa de *Bacillus* spp.

Ana María Gómez-Marín, Darío Naranjo-Fernández,* Olga Inés Montoya Campuzano** y Darío de Jesús Gallego Suárez.***

Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Antioquia-Colombia. Grupo de Biotecnología Microbiana. amgomezma@unal.edu.co. *Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Antioquia-Colombia. Grupo de Biotecnología Microbiana dnaranj@unal.edu.co. **Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Antioquia-Colombia. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Microbiología. Grupo de Biotecnología Microbiana. oimontoy@unal.edu.co. ***Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Antioquia-Colombia. Director de la Maestría en Ingeniería Química. Facultad de Minas. Laboratorio de Ingeniería Sanitaria. Grupo de Biotecnología Microbiana. dgallego@unal.edu.co.

Recibido: 20 de diciembre de 2005. Aceptado: 28 de febrero de 2007.

Palabras clave: pigmento, melanina, caracterización bacterias, bacterias pigmentadas, *Bacillus subtilis*.
Key words: pigment, melanin, strain identification, pigmented bacteria, *Bacillus subtilis*.

RESUMEN. Considerando la riqueza de especies y variedades microbianas de ciertos países, la búsqueda de cepas nativas con posible potencial biotecnológico y que produzcan compuestos de interés industrial es una forma de impulsar avances científicos, económicos y sociales dentro de las regiones. En este estudio se selecciona e identifica, morfológica y bioquímicamente mediante el juego de reactivos API CHB, una cepa nativa bacteriana del género *Bacillus* spp., la cual produce un pigmento naranja que es aislado, purificado y caracterizado utilizando diferentes pruebas físicas, químicas y espectrofotométricas. Los resultados indican que la cepa nativa se comporta como un *Bacillus subtilis*, probablemente el denominado *Bacillus globigii* según recientes reportes basados en técnicas de identificación molecular. El pigmento naranja producido fue caracterizado, parcialmente, como una melanina, más específicamente una alomelanina, dado su origen microbiano. Debe tenerse en cuenta que la clasificación de un material dentro de esta familia es difícil y ambigua. Se ha denominado melaninas a un conjunto de compuestos biológicos que poseen una serie de características comunes. No existe un método o análisis químico o físico satisfactorio que permita decidir claramente si una sustancia particular pertenece o no a este grupo; sin embargo, existen diferentes pruebas no definitivas, aunque algunas excluyentes, que permiten sospechar si un material bajo estudio puede pertenecer a esta familia de pigmentos. Estas sustancias poseen interesantes propiedades físicas y químicas que las convierte en materiales con potenciales aplicaciones tecnológicas.

ABSTRACT. Considering the wealth of species and microbial varieties of certain countries, the search of native strains with possible biotechnological potential that produces compounds of industrial interest is a form to impel scientific, economic and social advances within regions. In this study, it was selected and identified, morphological and biochemically by means of API CHB kit, a bacterial native strain of the *Bacillus* spp., which produces an orange pigment that was isolated, purified and characterized using different physical, chemical and spectrophotometric tests. The results indicate that the strain behaves like a *Bacillus subtilis*, probably denominated *Bacillus globigii* according to recent reports based on molecular identification techniques. In the same way, the produced orange pigment was characterized, partially, like a melanin, more specifically an allomelanin according to microbial origin. Nevertheless, it must be considered that the classification of a material within this family is difficult and ambiguous, as well as non-definitive. It has denominated melanin to biological compound set that has a series of common characteristics, but there is no a method or a satisfactory physical or chemical analysis that allows to decide clearly if a particular substance belongs or not to this group; on the contrary, there is a series of non definitive tests, some of them excluding, which allows to

suspect if a material under study belongs to this pigment family. On the other hand, these substances have interesting physical and chemical properties that make them as potential material with technological applications.

INTRODUCCIÓN

En la Naturaleza existen bacterias que bajo ciertas condiciones ambientales son capaces de producir pigmentos característicos de especies, géneros y familias,¹⁻⁵ lo que constituye uno de los detalles más notables de sus cultivos.¹ En general, la mayoría de las especies del género *Bacillus* no son pigmentadas. Sin embargo, algunas cepas de *B. subtilis* sintetizan diferentes clases de pigmentos de color rosa, amarillo, naranja, café, negro y fluorescentes de color amarillo verdoso,² según la subespecie y el medio en el cual se cultiva.

La cepa de *Bacillus subtilis* que produce un pigmento color naranja se conoce como *Bacillus subtilis* var. *niger* (*Bacillus globigii* DSM 2277). Recientemente, a partir de estudios en reasociación de ADN, este organismo se reclasificó como *Bacillus atrophaeus*.⁶ Estudios acerca de los pigmentos cafés de esta cepa han revelado que tales compuestos parecen ser melaninas, al igual que el pigmento negro producido por *B. subtilis*,⁷ sin embargo, en este último caso, se cree que no es un sólo

pigmento el que da origen al color oscuro de las colonias, sino que en el caldo de cultivo existen al menos cinco pigmentos diferentes, entre ellos, uno originado en la oxidación del manganeso,^{8,9} y otro que se encuentra parcialmente caracterizado y parece no ser una melanina.¹⁰

Las melaninas son pigmentos ampliamente difundidos en la Naturaleza, difíciles de purificar y caracterizar por métodos químicos convencionales.¹¹ En general, puede decirse que son biopolímeros policíclicos, productos de reacciones reversibles de óxido-reducción entre quinonas y sus estados de oxidación, formadas a través de procesos fluctuantes y no reproducibles que involucran radicales libres, sujetos a un continuo cambio,¹² presentes en organismos aeróbicos en forma extracelular o intracelular, siendo esta última la más común. Corrientemente, se han dividido en eumelaninas, pigmentos café o negros productos de precursores indólicos, feomelaninas, pigmentos rojo-café debidos a la intervención de la cisteína en el proceso melanogénico de las eumelaninas, y alomelaninas, pigmentos negros originados de precursores libres de nitrógeno y típicas de plantas y microorganismos.¹¹⁻¹³

Por ser compuestos pobremente entendidos, la clasificación de un producto como melanina es un tanto difícil y ambigua, así como no definitiva.¹³ Se han denominado melaninas a una familia de compuestos biológicos que poseen una serie de características comunes; sin embargo, actualmente no existe un método o un análisis químico o físico satisfactorio que permita determinar claramente si un compuesto en particular pertenece o no a este grupo.^{15,16} Por el contrario, existe un grupo de pruebas no definitivas, aunque algunas excluyentes, que hacen sospechar que un material bajo estudio pudiera pertenecer a esta familia de compuestos.

Estas macromoléculas poseen únicas e interesantes propiedades físicas y químicas, tales como ser electrónicamente estables, tener una amplia banda de absorción en la región visible y ultravioleta, ser fotoconductoras y semiconductoras; que las convierten en una nueva clase de biomateriales con potencial tecnológico y que podrían ser utilizados en el desarrollo de aparatos fotovoltaicos, optoelectrónicos y fotónicos, en el diseño de sensores químicos y de humedad, actuadores,

tejidos artificiales y en la fabricación de películas delgadas por electropolimerización.¹⁴ Por otra parte, puesto que la obtención de colorantes naturales a partir de plantas y animales es un proceso costoso, principalmente debido al bajo rendimiento de las materias primas y a la pequeña velocidad de crecimiento de estos organismos, su producción a partir de microorganismos pudiera ser favorable.

Los microorganismos son fáciles de aislar, seleccionar, mantener, modificar genéticamente y conservar; además de poseer una gran velocidad de crecimiento, capacidad de asimilar desechos alimenticios disponibles y un buen rendimiento en la cantidad de pigmento producido por célula cultivada. Sin embargo, a pesar de estas ventajas y aunque en el mercado se encuentra una gran variedad de cepas microbianas que sintetizan pigmentos, su uso implica elevados costos operativos asociados a la compra, importación, rehidratación, adaptación, mantenimiento y funcionamiento de ellas mismas.¹⁷

Desde este punto de vista y teniendo en cuenta la riqueza de especies y variedades microbianas con posible potencial biotecnológico del país, es importante la búsqueda de cepas nativas productoras de compuestos de interés industrial. Por todas estas razones, el principal objetivo de esta investigación consistió en aislar, purificar y caracterizar un pigmento naranja producido por una cepa nativa de *Bacillus* spp.,¹⁷ así como estudiar las condiciones adecuadas para el crecimiento, manipulación y adaptación de esta de una forma sencilla y económica.¹⁸

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la inoculación de los cultivos se trabajó con una disolución de esporas a un patrón de Mac-Farland de 10¹⁹.

Preparación de la disolución de esporas

Se toma una colonia de la caja madre, se inocula en 4,5 mL de caldo LB y se mantiene a 37 °C durante 24 h. Luego, se siembra en cajas de Petri con agar LB, por el método de agotamiento en superficie y se mantiene a 37 °C hasta que esporule.^{7,20-23} Se retiran las colonias de la superficie del agar y se resuspenden en agua destilada estéril; se centrifugan a 10 000 r/min durante 10 min. Esto se repite dos veces más. El precipi-

tado se resuspende en una disolución de NaCl al 0,85 % hasta una concentración de 10 con base al patrón de Mac-Farland; se somete a un choque térmico de 80 °C durante 15 min y finalmente, se almacena en la nevera para su posterior utilización.

Selección del microorganismo

Del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín, se escogen siete cepas nativas del género *Bacillus* spp. con la capacidad de producir colonias pigmentadas. Se reactivan en caldo LB a 37 °C durante 24 h. Cada una se mantiene en tres medios de cultivo sólidos: LB, agar nutritivo con 1 % de almidón y agar nutritivo con 1 % de caseína. Se evalúa visualmente la producción de pigmento y se selecciona la bacteria que presenta mayor producción, la cual se siembra en una caja de Petri con agar LB, se mantiene a 37 °C hasta que esporule y se preserva a 4 °C, la cual se denomina como caja madre.

Caracterización del microorganismo

El microorganismo seleccionado, se caracteriza bioquímicamente según pruebas reportadas,^{2,24} y por la aplicación doble de la prueba bioquímica API 50CH (Biomérieux), utilizando como control la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 21556.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados a 121 °C, 15 libras/pulgada cuadrada durante 15 min, en una autoclave tipo horizontal marca Trident Medical Corporation EA-620.^{2,25,26}

Extracción del pigmento

El medio de cultivo se deja reposar en la nevera por un día y, el decantado se guarda para purificarlo. El líquido clarificado se centrifuga a 2 800 r/min durante 20 min y el sobrenadante se acidifica con ácido clorhídrico hasta pH < 4,00. Se mantiene a 95 r/min durante 24 h y nuevamente se centrifuga a 3 000 r/min durante 30 min. Finalmente, el centrifugado se recoge y guarda para posterior purificación.

Purificación del compuesto

El decantado y el centrifugado guardados se purifican, por el mismo método, de manera separada. El precipitado se lava con agua destilada y se centrifuga a 3 000 r/min durante 30 min, el sobrenadante se descarta. Este procedimiento se repite tres veces. Al sólido lavado se le agrega áci-

do acético, se centrifuga a 3 000 r/min durante 30 min, se retira el sobrenadante y el precipitado se lava con agua destilada y se centrifuga a 3 000 r/min durante 30 min hasta que el agua de lavado no produzca espuma. Finalmente, el sólido se lava con éter etílico, etanol y acetona. Esta última se deja por 24 h y luego se evapora. El sólido seco se guarda para posterior caracterización.²⁷⁻³⁰

Caracterización del pigmento

Los sólidos purificados se caracterizan física y químicamente. Se les realizan pruebas de solubilidad en diferentes disolventes orgánicos y las recomendadas para la identificación de compuestos.³¹ Se determina si su solubilidad es mayor en una disolución de NaOH, pH = 10,00, sometida a ultrasonido por 15 min;³² se mide el punto de fusión;³³ se ensaya el blanqueamiento oxidativo con una disolución de H₂O₂ 5 % y la formación del espejo de plata a partir de una disolución de nitrato de plata amoniacal; además, a una disolución etanólica del pigmento se le realizan pruebas químicas para la identificación de quinonas, flavonoides y taninos.³⁴

El espectro ultravioleta-visible (UV) se registra con un equipo Lambda 10 (Perkin Elmer). El espectro infrarrojo (IR) se hace a partir de una pastilla secada a 105 °C durante 30 min, formada con 2 mg del pigmento y 200 mg de K Br. Se registra con un Spectrum BX I FT-IR system, (Perkin Elmer) y se procesa con el paquete de programas de computación Spectrum V. 2.00. El equipo realiza 100 mediciones y reporta la media de ellas. La cromatografía gaseosa se hace a partir de una disolución etanólica en un equipo Agilent 6890 con una columna HP5, el cual tiene asociado un analizador de masas.

Finalmente, una disolución acuosa del pigmento se somete a voltametría cíclica, usando un contra-electrodo de platino, un electrodo de Ag/AgCl 3 mol/L como electrodo de referencia y uno de carbón vítreo (área aparente de 3,141 59 mm²) como electrodo de trabajo. En esta experiencia se realizan 10 ciclos en un intervalo de potencial entre +1 200 mV y +100 mV. Se comienza en la dirección positiva a una velocidad de barrido de 150 mV/s y con una sensibilidad de 1 µA/V, en un equipo B.A.S. 100. Antes de comenzar la voltametría se burbujea nitrógeno puro a través de la disolución durante 10 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección y caracterización del microorganismo

Durante la evaluación de las siete cepas bacterianas sólo una de ellas manifestó la producción del pigmento en los tres medios de cultivo y por tanto, fue la cepa seleccionada para este estudio.

La caracterización morfológica (Tabla 1) indicó que el microorganismo de estudio corresponde a un bacilo Gram positivo de la familia *Bacillaceae*, género *Bacillus* grupo I, al cual pertenecen las especies de *Bacillus* con esporas elipsoidales y que no deforman el esporangio o la célula vegetativa.²⁴

Por otra parte, las pruebas bioquímicas realizadas indicaron que el microorganismo evaluado presenta un comportamiento bioquímico similar a la especie bacteriana *Bacillus subtilis* (Tabla 2).^{2,24}

De acuerdo con los resultados de la prueba API 50CH el microorganismo evaluado se comporta como *Bacillus subtilis*, especie reportada como productora de cuatro diferentes pigmentos, uno de ellos de color naranja.^{2,6,24} Asimismo, clasifica como una bacteria nivel 1 en bioseguridad (BSL-1), lo que significa que es apropiado para estudios que involucren agentes caracterizados por no causar daños a la salud de los humanos. Además, la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA), le ha otorgado el estatuto GRAS de seguridad (Generally Regarded As Safe).²⁴ En la extensa literatura consultada no se encontraron reportes acerca de la caracterización del pigmento naranja producido por esta cepa.

Caracterización del pigmento

Tanto el pigmento decantado, como el pigmento precipitado a par-

tir de la acidificación del caldo de cultivo presentaron el mismo comportamiento y la misma respuesta a las diferentes pruebas realizadas, por tanto, sólo se presentan y analizan los resultados obtenidos para el pigmento decantado.

De acuerdo con los resultados de las pruebas de solubilidad el compuesto analizado debe pertenecer al grupo MN, grupo de diversos compuestos neutros que contienen nitrógeno o azufre y con más de cinco átomos de carbono.³¹ Es insoluble en todos los disolventes orgánicos evaluados y en unos pocos de ellos, presenta una miscibilidad parcial (Tabla 3). Igualmente, en agua destilada es insoluble, pero la miscibilidad parcial aumenta en disolución acuosa alcalina (pH = 10,0), sometida a ultrasonido. Además, no fue posible determinar su punto de fusión, ya que se carbonizó a una temperatura mayor de 250 °C.

Por otro lado, se descarta que el pigmento sea una quinona, un flavonoide o un tanino, ya que resultaron negativos los ensayos de Bornträger, así como las pruebas Shinoda y del cloruro férrico (Tabla 4). En esta última, debe obtenerse un precipitado negro si es positiva para taninos.³⁴

La respuesta obtenida del analizador de masas sólo muestra los picos para el etanol y para el CO (los datos no se muestran), es decir, no existen picos que señalen la presencia del pigmento analizado, por tanto, puede decirse que este compuesto no volatiliza a la temperatura alcanzada por la columna del cromatógrafo (T ≈ 325 °C), por lo que no resulta analizado por el detector de masas.

La curva voltamétrica obtenida con la disolución preparada, inicialmente de color amarillo y pH 4,00 (Fig. 1), mostró durante el primer barrido en la dirección positiva un pico

Tabla 1. Características morfológicas de la cepa bajo estudio.

| Características de la cepa elegida | |
|------------------------------------|--|
| Tinción Gram | Bacilo Gram positivo. |
| Forma | Bastón recto o casi recto. |
| Tamaño | Diámetro: 0,7 a 0,8 mm; longitud: 2 a 3 mm. |
| Arreglo | Tinción uniforme, a veces se presenta formando cadenas. |
| Estructuras | Formación de esporos centrales, elipsoidales y del mismo tamaño del esporangio, no más de uno por célula. Presenta movilidad. |
| Apariencia de la colonia | En agar LB crece formando pequeñas colonias naranjas, redondas o irregulares, opacas, rugosas y con el borde blanco. En caldo LB no agitado crece formando una película superficial membranosa naranja. |

Tabla 2. Caracterización bioquímica de la cepa bajo estudio.

| Pruebas bioquímicas | Cepa evaluada | <i>B. amvlioliauefaciens</i> | <i>B. anthracis</i> | <i>B. badius</i> | <i>B. cereus</i> | <i>B. fastidiosus</i> | <i>B. firmus</i> | <i>B. lentus</i> | <i>B. licheniformis</i> | <i>B. megaterium</i> | <i>B. mycoides</i> | <i>B. pumilus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>B. thuringiensis</i> |
|---|---------------|------------------------------|---------------------|------------------|------------------|-----------------------|------------------|------------------|-------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| Diámetro celular > 1,0 mm | - | - | + | v | + | + | - | - | - | + | + | - | - | + |
| Cristales paraesporales | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d |
| Crecimiento anaeróbico | - | - | + | - | + | - | - | - | + | - | + | - | - | + |
| Prueba de Voges Proskauer | + | + | + | - | + | NG | - | - | + | - | + | - | + | d |
| pH < 6,0 prueba de Voges Proskauer | - | ND | + | - | + | NG | - | - | + | d | + | + | d | + |
| pH > 7,0 prueba de Voges Proskauer | - | ND | - | + | - | NG | - | ND | - | - | - | - | - | - |
| Lecitina de la yema del huevo | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | + |
| Ácido de la D-glucosa | + | + | + | - | + | NG | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ácido de la L-arabinosa | + | d | - | - | - | NG | - | + | + | d | - | + | + | - |
| Ácido de la D-xylosa | + | d | - | - | - | NG | - | + | + | d | - | + | + | - |
| Ácido de la D-manitol | + | + | - | - | - | NG | + | + | + | d | - | + | + | - |
| Ácido de la D-lactosa | - | + | ND | ND | - | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - | ND |
| Gas de la glucosa | - | ND | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hidrólisis de almidón | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Hidrólisis de caseína | + | + | + | + | + | - | + | d | + | + | + | + | + | + |
| Reducción de nitrato a nitrito | + | + | + | - | + | - | d | d | + | d | + | - | + | + |
| Degradación de tirosina | - | - | d | + | + | - | d | - | - | d | ND | - | - | ND |
| Crecimiento a pH = 6,8 en caldo nutritivo | + | ND | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Crecimiento en NaCl 7 % | + | + | + | ND | d | - | + | d | + | d | d | + | + | + |
| Crecimiento a 10 °C | - | ND | - | - | d | + | d | ND | - | + | d | + | d | d |
| Crecimiento a 30 °C | + | ND | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Crecimiento a 50 °C | + | d | - | + | - | - | - | - | + | - | - | d | d | - |
| Crecimiento a 55 °C | - | ND | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Utilización del citrato | + | d | d | - | + | - | - | - | + | + | d | + | + | + |
| Utilización del propionato | - | ND | ND | - | ND | - | - | - | + | ND | ND | - | - | ND |

- 90 % o más de las cepas fueron negativas. + 90 % o más de las cepas fueron positivas. v Inestabilidad de la cepa. d 11 a 89 % de las cepas fueron positivas. ND No hubo datos disponibles. NG No crece. Fuente: Grimont, 1984.

Tabla 3. Solubilidad del compuesto en diferentes disolventes orgánicos.

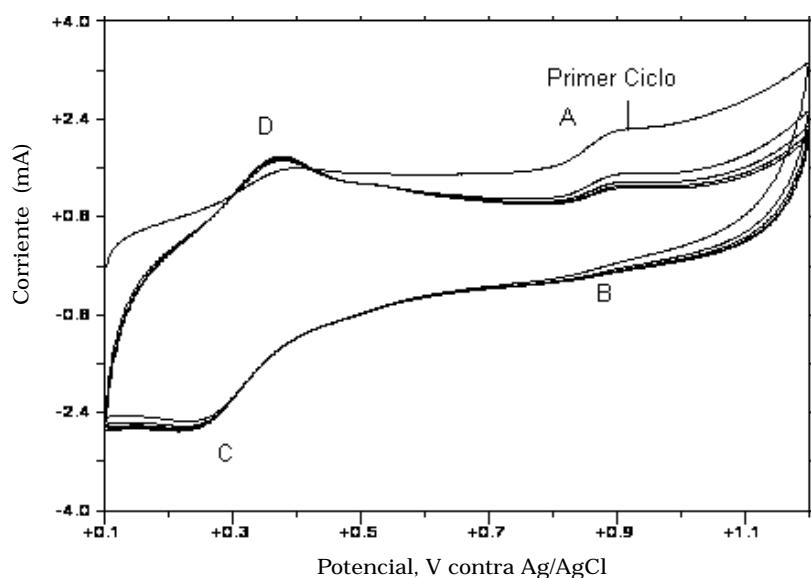
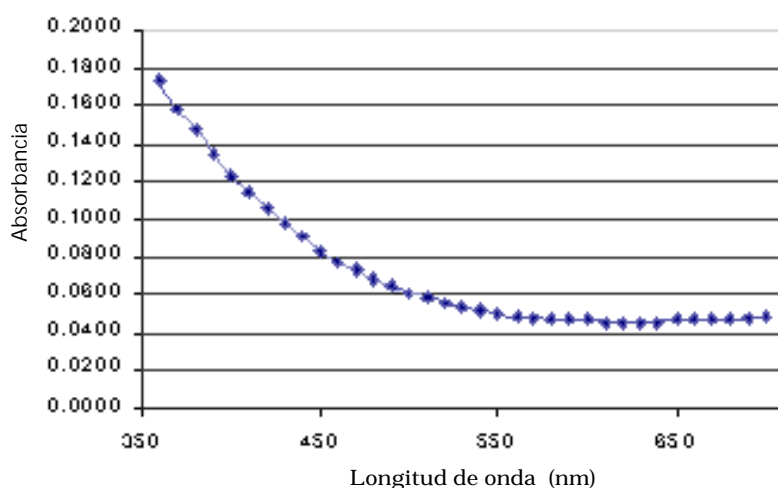
| Disolvente | Comportamiento |
|-------------------------|----------------------|
| Metanol | Insoluble |
| Etanol | Parcialmente soluble |
| Alcohol isopropílico | Insoluble |
| Alcohol isobutílico | Insoluble |
| Acetona | Parcialmente soluble |
| Cloroformo | Insoluble |
| Hexano | Insoluble |
| Éter etílico | Insoluble |
| Éter de petróleo | Insoluble |
| Etil acetato | Parcialmente soluble |
| Ácido acético | Parcialmente soluble |
| Agua destilada | Insoluble |
| Agua básica (pH = 10,0) | Parcialmente soluble |

anódico (A) a un voltaje de 880 mV aproximadamente. Luego, en la dirección contraria apareció un débil pico catódico (B) y otro mucho más evidente (C) aproximadamente a 850 y 235 mV respectivamente. En el segundo barrido, aparecieron los picos mencionados anteriormente y un nuevo pico anódico (D) a 370 mV aproximadamente y por tanto, se reafirmó la existencia de dos picos de oxidación (A) y (D), y dos de reducción (B) y (C), los cuales se repitieron durante los ciclos siguientes.

Es importante resaltar que, después del primer barrido, la corriente disminuye en el voltaje del pico (A), y aumenta, lenta y progresivamente para los picos (C) y (D), comportamiento que se repite en cada ciclo, con lo que puede observarse un

Tabla 4. Pruebas químicas para la identificación del compuesto.

| Prueba | Resultados |
|--|------------------|
| Ensayo de Borntränger | Negativa |
| Shinoda | Negativa |
| Prueba del cloruro férrico | Precipitado café |
| Blanqueamiento con peróxido | Positiva |
| Solubilidad en NaOH (con respecto a la del agua) | Aumenta |
| Precipitación desde NaOH por HCl | Positiva |
| Formación del espejo de plata | Positiva |


Fig. 1. Deposición del pigmento sobre un electrodo de carbono vítreo por voltametría cíclica.

Fig. 2. Absorbancia del pigmento en la región visible.

crecimiento de la gráfica en esta última zona; sin embargo, si la disolución no se lleva hasta el voltaje del pico A, este comportamiento no se presenta (no hay crecimiento de los picos C y D), por lo que se deduce que en la disolución evaluada existe un compuesto, que al oxidarse (pico

A), forma un polímero conductor, redox, correspondiéndole a los picos C y D de la gráfica, las formas reducida y oxidada del polímero, respectivamente.

El análisis de los resultados anteriores sugiere que el pigmento analizado es una melanina, al pre-

sentar poca o nula solubilidad en disolventes orgánicos,^{10,11,35} y dar positivas las pruebas químicas características para melaninas tales como: blanqueado con peróxido; aparición de un precipitado café en la prueba del cloruro férrico; formación del espejo de plata a partir de una disolución de plata amoniacal; aumento de la solubilidad en agua en presencia de NaOH; precipitación del pigmento desde una disolución básica por adición de HCl^{10,29,36,37} y al comportamiento presentado por el pigmento bajo la voltametría cíclica,³⁸⁻⁴⁰ comportamiento similar al de una disolución de dopamina, un precursor de melanina, bajo este mismo proceso, con cambio de un estado incoloro a uno rojo, pasando por amarillo y con deposición de melanina en el electrodo de trabajo.³⁹⁻⁴¹

De igual manera, es característico de ciertos compuestos poliméricos su descomposición en presencia de oxígeno, a temperaturas superiores a 200 °C, antes de fundir y no poder ser analizados por un cromatógrafo de gases al no volatilizarse a la temperatura alcanzada por la columna, por carbonizar y quedar como contaminantes dentro de ella.¹²

Por otra parte, el espectro visible para el pigmento (Fig. 2) mostró un aumento exponencial de su absorbancia conforme la longitud de onda se acercaba a la región ultravioleta (360 a 700 nm), es decir, no se evidenció ningún pico característico en esta región, comportamiento característico para las melaninas,^{10,14} pero contrario para las fenazinas o los carotenoides, ya que estas sustancias presentan al menos un pico característico en el espectro visible y son solubles en algunos de los disolventes ensayados para el pigmento.^{34,42} Adicionalmente, una gráfica del logaritmo de la absorbancia contra la longitud de onda para el pigmento es una línea recta con una pendiente del mismo orden de magnitud encontrado para las melaninas e igual a $-0,0022 \text{ nm}^{-1}$ entre 400 y 600 nm, mientras que para la dopa melanina según se ha informado es de $-0,0018 \text{ nm}^{-1}$ recién se toma el espectro y de $-0,0033 \text{ nm}^{-1}$ 48 h después, ya que la absorbancia cambia según el grado de oxidación, manteniendo la misma tendencia.^{37,43}

En la región ultravioleta (220 a 400 nm) la absorbancia del pigmento presenta un "hombro" alrededor de 260 nm, similar al observado en el espectro ultravioleta reportado para un pigmento café producido

por *Bacillus subtilis* y que identifican como un compuesto que parece no ser una melanina.¹⁰ Sin embargo, en estudios más recientes, se asocia la aparición de este "hombro" con la presencia de monómeros precursores de la melanina.⁴⁴

El espectro infrarrojo obtenido para el pigmento (Fig. 3) se asemeja a otros reportados para las melaninas;^{27,29,36,37} siendo sus principales picos: la amplia banda en 3 406,1 cm⁻¹, lo que evidencia la presencia del grupo OH⁻ en las estructuras poliméricas y la presencia de agua; la fuerte banda a 1 645,97 cm⁻¹ junto con el pico a 1 149,36 cm⁻¹, típicos de cetonas y(o) grupos carboxílicos (COO⁻) e indicativo de la conjugación del C=O con un anillo bencénico correspondiente a una estructura quinónica típica de las melaninas; el pico a 1 394,97 cm⁻¹, que representa un enlace del tipo —NH⁻ (grupo indol o pirrol) y(o) la presencia de grupos OH⁻ de los compuestos fenólicos; el pico a 1 028,37 cm⁻¹, que sugiere la presencia de grupos C-O-C, y asociado a la presencia de la banda en 1 645,97 cm⁻¹, que puede sugerir la presencia de aminoácidos, atribuidos a la incorporación de proteínas en la estructura del pigmento. Adicionalmente, en este espectro, se evidencia un pico a 2 926,66 cm⁻¹, que representa grupos alifáticos CH₂, pero que no se diferencia claramente debido a la presencia de la amplia banda del OH⁻, asimismo podría estar oculto el triplete CH entre 2 930 y 2 860 cm⁻¹ característico de la estructura aromática.

CONCLUSIONES

La cepa bacteriana se comporta bioquímicamente como un *Bacillus subtilis*, probablemente el denominado *Bacillus globigii*, el cual, según reportes bibliográficos,^{6,24} tiene la capacidad de producir un pigmento naranja. Sin embargo, son necesarios estudios más profundos y confirmatorios principalmente a nivel molecular para esclarecer esta posibilidad.

El pigmento bacteriano caracterizado es probablemente una melanina, más específicamente, una alomelanina, dado su origen microbiano, aunque esta última forma de caracterización es muy ambigua.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a los Profesores Orlando Ruiz V., Director del Laboratorio de Suelos; Carlos Sánchez S., Director de los Laboratorios de Termodinámica y Electroquímica; Jairo Quijano

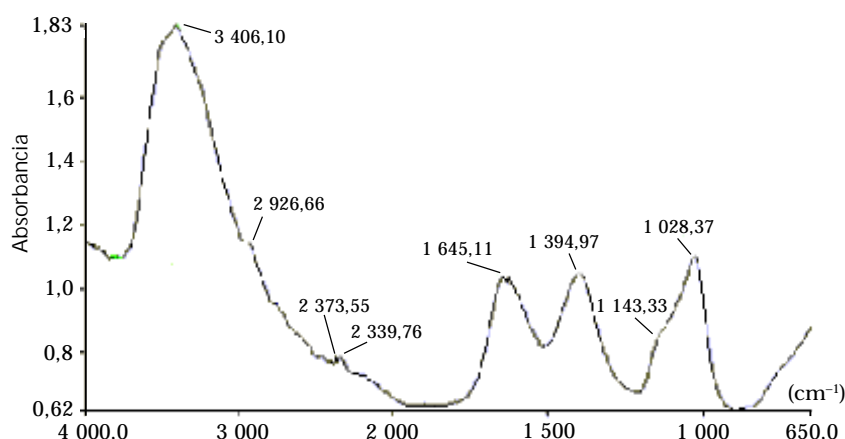


Fig. 3. Espectro infrarrojo del pigmento en la región de 650 a 4000 cm⁻¹.

T., Director del Postgrado en Ciencias Químicas; Carmen L. Hernández y Ricardo Torres C., Director del Laboratorio de Productos Naturales.

BIBLIOGRAFÍA

- Pelczar M. y Reid Roger. Microbiología, 4 ed., McGraw-Hill, México, 1982.
- Grimont P. and Grimont F. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, N. R. Krieg Williams and Wilkins, 1984.
- Simone D.G. *et al.* Influence of Growth Medium in Proteinase and Pigment Production by *Streptomyces cyaneus*, Memorias Instituto Oswaldo Cruz, 94, 2, Río de Janeiro, 173-177, 1999.
- Barakate M. Characterization of rhizospheric soil *Streptomyces* from Moroccan habitats and their antimicrobial activities, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 18, 49, 2002.
- Picazo Juan J. Procedimientos en microbiología clínica: Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, España, 1999.
- Fritze D. and Pukall R. Reclassification of Bioindicator Strains *Bacillus subtilis* DSM675 and *Bacillus subtilis* DSM2277 as *Bacillus atrophaeus*, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, 35, 2001.
- Hinojosa R.E. *et al.* Trazadores biológicos de flujos: Crecimiento y sobrevivencia de *Bacillus subtilis* 65-8 bajo estrés ambiental, **Revista Latinoamericana de Microbiología**, 37, 43, 1995.
- Francis Chris and Tebo Bradley. Enzimatic Manganese (II) Oxidation by Metabolically Dormant Spores of Diverse *Bacillus* species, **Applied and Environmental Microbiology**, 68, 874, 2002.
- Hullo M. *et al.* Cot A of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccasa, **Journal of Bacteriology**, 183, 5426, 2001.
- Barnett T.A. and Hageman J. Caracterization of a Brown Pigment from *Bacillus subtilis*, **Canadian Journal of Microbiology**, 29, 309, 1983.
- Nicolaus R.A. and Nicolaus B.J.R. Speculating on the band colours in Nature, **Napoli: Atti Accademia Pontaniana**, XLV, 365, 1997.
- Nicolaus R.A., Bolognese A. and Nicolaus B. The Pigment Cell and its Biogenesis, **Napoli: Accademia Pontaniana**, 2002.
- Galvao Douglas Soares. Estrutura electronica das melaninas. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Fisica Gleb Wataghin, Campinas, 154, 1989.
- Meredith P. *et al.* Semiconducting Photoactive Biopolymers, Queensland University, Physics Department, Australia, 2003. Disponible en: <http://www.softsolids.physics.uq.edu.au>.
- Dezidério S.N. *et al.* Thin films of synthetic melanin. **Journal of Non-Crystalline Solids**, 338-340, 634, 2004.
- Butler M.J. and Day A.W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, 44, 1115, 1998.
- Gómez Marín A.M. y Naranjo Fernández D. Producción de un pigmento a partir de una cepa nativa bacteriana, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Minas, Escuela de Procesos y Energía, Medellín, 57, 2003.
- Montoya Campuzano O.I. Aislamiento, purificación, caracterización y conservación de microorganismos de interés industrial. En: Primer Simposio Sobre Biofábricas: Biología y aplicaciones de la célula cultivada, Memorias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 2002.
- Nierman W.C. and Felblyum T. Symposium: Criopreservación in Industry and Biotechnology, Capitulo 29: Criopreservación of Cultures that contain plamids, 423-434, 1983.
- Demain A. Minimal Media for Quantitative Studies with *Bacillus subtilis*, **Journal of Bacteriology**, 75, 517, 1958.
- Galindo E. and Ramirez O. Advances in Bioprocess Engineering, Klumer Academic Publishers, 1994.
- Munakata N. and Rupert C. Genetically Controlled Removal of "Spore

- Photoproduct" from Deoxyribonucleic Acid of Ultraviolet-Irradiated *Bacillus subtilis* Spores, **Journal of Bacteriology**, **111**, 192, 1972.
23. Riesenman P. and Nicholson W. Role of the Spore Coat Layers in *Bacillus subtilis* Spore Resistance to Hydrogen Peroxide, Artificial UV-C, UV-B, and Solar UV Radiation, **Applied and Environmental Microbiology**, **66**, 620, 2000.
 24. Harwood Colin R. *Bacillus*, Plenum Press, New York, 1989.
 25. Montoya Campuzano O.I. Manual de Prácticas de Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 1999.
 26. Ertola R., Yantorno O. y Mignone C. Microbiología Industrial, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Argentina, 103, 1989.
 27. Bridelli M.G., Tampellini D. and Zecca L. The Structure of neuromelanin and its iron binding site studied by infrared spectroscopy, **Letters**, **457**, 18, 1999.
 28. Cornell R. Natural Products Isolation, Humana Press, U.S.A, 1998.
 29. Hoty, S. L. and Balaraman, K. Formation of Melanin Pigment by a mutant of *Bacillus thuringiensis* H-14, **Journal of General Microbiology**, **139**, 2365, 1993.
 30. Napolitano A., *et al.* Oxidative Degradation of Melanins to Pyrrole Acids : a Model Study, **Tetrahedron**, **51**, 5913, 1995.
 31. Shriner R.L. *et al.* The Systematic Identification of Organic Compounds, 7ed, John Wiley & Sons, New York, 1998.
 32. Nicolaus R.A. y Olivieri M. Sulla DHI-melanina, **Napoli: Rend. Acc. Sci. Fis. Mat.**, **LXVI**, 1999. Disponible en: <http://www.tightrope.it/nicolaus/fundamental.htm>.
 33. Farrington D., *et al.* Curso de Físico Química Experimental, Centro regional de ayuda técnica, México, 1972.
 34. Domínguez X.A. Métodos de Investigación Fitoquímica, Editorial Limusa, México, 1988.
 35. Nicolaus R.A. y Scherillo G. La Melanina: Un riesame su struttura, proprietà e sistemi, **Napoli: Atti della Accademia Pontaniana**, **XLIV**, 1995.
 36. Saxena Deepak *et al.* A UV Tolerant Mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki Producing Melanin, **Current Microbiology**, **44**, 25, 2002.
 37. Turick C.E. Tisa L.S. and Caccavo F. Melanin Production and Use as a Soluble Electron Shuttle for Fe(III) Oxide Reduction and as a Terminal Electron Acceptor by *Shewanella* algae BrY, **Applied and Environmental Microbiology**, **68**, 2436, 2002.
 38. Jacobson E. Pathogenic Roles for Fungal Melanins, **Clinical Microbiology Reviews**, **13**, 708, 2000.
 39. Jacobson E. and Hong J. Redox Buffering by Melanin and Fe (II) in *Cryptococcus neoformans*, **Journal of Bacteriology**, **179**, 5340, 1997.
 40. Xiayan W., Baokang J. and Xiangqin L. *In-situ* FTIR Spectroelectrochemical Study of Dopamine at a Glassy Carbon Electrode in a Neutral Solution, **Analytical Sciences**, **18**, 931, 2002.
 41. Horak V. and Weeks G. Poly(5,6-dihydroxyindole) Melanin Film Electrode, **Bioorganic Chemistry**, **21**, 24, 1993.
 42. Kerr J.R. Phenazine pigments: antibiotics and virulence factors, *The Infectious Disease Review: microbes of man, animals and the environment*, **2**, 184, 2000.
 43. Hanki F, Talau T. and Dargent R. Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* vitt. **Food Chemistry**, **58**, 69, 1997.
 44. Meredith P. Harvesting Photons with Biopolymers – Broadband Photovoltaics, Universidad de Queensland, Departamento de Física, Australia, 2003. Disponible en: http://www.softsolids.physics.uq.edu.au/our_publications.html.



RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

ELECTRODOS SELECTIVOS A IONES DE MEMBRANAS LÍQUIDAS SELECTIVAS A NITRATO Y METALES PESADOS

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente.

Los electrodos selectivos (ES) a iones constituyen una revolución en el reconocimiento de un substrato por un receptor o inóforo. Los métodos potenciométricos han sido muy beneficiados por el desarrollo que este tipo de electrodo ha alcanzado en la última década.

La utilización de sensores químicos y biosensores para la detección de la concentración iónica constituye un nuevo campo de investigación aplicada. Su objetivo prioritario ha sido la obtención de dispositivos que permitan alcanzar bajos límites de detección con elevada selectividad y reproducibilidad. El elevado costo por unidad de estos dispositivos en el mercado constituye un obstáculo para disponer de ellos en los laboratorios de producción.

Entre los contaminantes químicos del agua se encuentran los nitratos y metales pesados, entre otros. A estos se le ha dedicado especial atención, debido a su fácil ingreso en la cadena alimentaria.

El agua es uno de los recursos renovables en peligro como consecuencia de la actividad humana. En muchos casos, en las zonas muy industrializadas el agua pura que procede de la lluvia recibe, antes de llegar al suelo, su primera carga contaminante que la convierte en lluvia ácida. El nitrato se encuentra en muchas de las comidas que consumimos diariamente, la mayor parte se ingiere en el agua; además, se puede encontrar en algunos vegetales. Elevadas concentraciones de nitrato en el organismo ocasionan serias afectaciones, llegando a ser causa de muerte en seres humanos menores de seis meses de vida. Provoca cáncer, malformaciones congénitas y afectaciones al sistema nervioso central, entre otras enfermedades.

El trabajo ha permitido la construcción, caracterización y aplicación de ES a los iones plomo, cadmio y nitrato en diversas muestras mediante el método potenciométrico como una alternativa a los clásicos.

Entre las ventajas que presentan, se pueden citar: rapidez en la preparación de la muestra; simplicidad en las mediciones; empleo de pequeños volúmenes de muestra para las determinaciones; no requerimiento de equipo costoso de medición y no afectación de las determinaciones por el color, la turbidez, la materia en suspensión o la viscosidad que posea la muestra.