

## Efecto de Algunos Componentes del Medio de Cultivo en la Producción de Melanina Bacteriana

Ana María Gómez-Marín\*, Darío Naranjo-Fernández, Olga Inés Montoya, Darío de Jesús Gallego

*Grupo de Biotecnología Microbiana. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Cra 80 N° 65 – 223, bloque M7-202. Antioquia-Colombia. A. A. 3840. Tel: +57+4+234 03 52, E-mail: [amgomezma@unal.edu.co](mailto:amgomezma@unal.edu.co).*

### RESUMEN

Las melaninas son pigmentos poliméricos ampliamente difundidos en la naturaleza, incluyendo algunos géneros de bacterias, producidas en ciertos medios y bajo determinadas condiciones ambientales, con muchas aplicaciones potenciales. La síntesis microbiana de este tipo de compuestos es una opción atractiva para su producción a escala comercial, alternativa sobre otros métodos de producción. En este trabajo se estudió la influencia de varios componentes del medio de cultivo en la producción de melanina por una cepa de *Bacillus subtilis*. Para la evaluación de los ensayos se empleó un diseño unifactorial y se aplicó la prueba de Tukey para establecer diferencias estadísticamente significativas en la producción de melanina en cada medio. Los medios evaluados se derivaron del medio Luria-Bertani, al cual se le agregaron o suprimieron componentes. La producción de melanina se estimuló por fuentes de carbono y nitrógeno orgánicas, presentándose mejores rendimientos por célula cuando la primera se encuentra a bajas concentraciones. Por el contrario, el rendimiento por célula disminuyó con la adición de 0.31 mM de tirosina, 15.0  $\mu$ M de sulfato de cobre, 0.69 mM de sulfato de manganeso o al duplicar la concentración de NaCl.

**Palabras clave:** Bacterias pigmentadas, "*Bacillus subtilis*", cepas nativas, caldo de cultivo, metabolito secundario, melanina.

### ABSTRACT

Melanins are ubiquitous polymeric pigments distributed in the nature, including some bacterium genus, without known biological functions, produced in some mediums and with a specific environment conditions with many different potential applications. Microbial synthesis of this type of compounds is an attractive option for commercial-scale production, alternative over other production methods. In this study, the effect of some medium's components in melanin production by a native strain of *Bacillus subtilis* is studied. A unifactorial design and a Tukey test are employed to evaluate the trials and

establish statistical significant differences in melanin production. The culture broths were derived from Luria-Bertani medium, with or without some ingredients. The main findings indicated that organic carbon and nitrogen sources stimulated melanin production, with the best yield by cell when the former was at low concentration. In contrast, melanin yields by cell decreased by the addition of 0.31 mM tyrosine, 15.0  $\mu$ M cuprum sulfate, 0.69 mM manganese sulfate or with a twofold concentration of NaCl in the culture broth.

**Keywords:** Native strain, *Bacillus subtilis*, bacterial pigments, improvement of the culture broth, secondary metabolite, melanin.

## INTRODUCCIÓN

La cromogénesis o pigmentación de colonias bacterianas es una de las características más notables de los cultivos. En algunas especies el pigmento producido es retenido dentro de las células y su masa celular se colorea; en otras especies, por el contrario, el pigmento es expulsado al medio de cultivo. Estos pigmentos pueden ser solubles o insolubles en agua, y no son producidos en todos los medios de cultivo ni bajo todas las condiciones ambientales (Grimont & Grimont, 1984; Harwood, 1989).

Los factores que influyen en la pigmentación son variados y no se encuentran bien estudiados. Principalmente se ha encontrado que su síntesis e intensidad están afectadas por las condiciones de crecimiento, a tal punto que ciertos pigmentos se observan mejor en cultivos sólidos (Grimont & Grimont, 1984; Harwood, 1989). De la misma forma, la producción de pigmentos bacterianos se encuentra estrechamente relacionada con la composición del medio de cultivo; factores como la presencia/ausencia de fuentes de carbono o nitrógeno orgánicas/inorgánicas (Torres & Bonilla, 1999; Toro *et al.*, 2001, Gómez-Marín & Naranjo-Fernández, 2003), así

como la presencia de otros componentes: sales, aminoácidos, entre otros, pueden inhibir o estimular su síntesis (Kerr, 2000, Gómez-Marín & Naranjo-Fernández, 2003).

Las funciones específicas de la mayoría de los pigmentos en los cultivos bacterianos no están determinadas. En general, son metabolitos secundarios sin función biológica definida en el crecimiento celular, a los cuales se les han atribuido diversas funciones, como ser amortiguadores redox o generar/neutralizar radicales libres tóxicos de oxígeno, razones que podrían explicar la actividad antibiótica encontrada en algunos de estos compuestos, relacionando la habilidad de producirlos con la supervivencia del organismo y con el incremento *in vivo* de la virulencia de algunos microorganismos (Kerr, 2000).

La mayoría de las especies del género *Bacillus* no son pigmentadas; sin embargo, algunas cepas de *Bacillus subtilis* sintetizan diferentes clases de pigmentos: rojo (Uffen & Canale, 1972), rosa, amarillo, naranja, café, negro y fluorescente de color amarillo verdoso (Grimont & Grimont, 1984, Harwood, 1989); dependiendo de la subespecie y el medio en el cual se cultiva. La cepa de *B. subtilis* que produce un pigmento color naranja se conoce

como *Bacillus subtilis* var. *niger* (*Bacillus globigii* DSM 2277); recientemente, reclasificada a partir de estudios en reasociación de ADN como *Bacillus atrophaeus* (Fritze & Pukall, 2001). Este microorganismo no es patogénico, es fácil de cultivar, aerobio, de rápido reconocimiento visual por el pigmento que produce en diferentes medios de cultivo y forma esporas, una de las formas microbianas más resistentes. Entre sus principales usos comerciales esta emplearlo como bioindicador de la efectividad de los procesos de esterilización (Grimont & Grimont, 1984), en el desarrollo de tecnologías para mejorar los detectores de armas biológicas, en operaciones para descontaminar los ambientes afectados por las mismas y como trazadores biológicos de aguas (Hinojosa-Rebollar *et al.*, 1995).

Estudios relacionados con los pigmentos café y negro producidos por *B. subtilis* han revelado que parecen ser melaninas (Hinojosa-Rebollar *et al.*, 1995), sin embargo, se ha reportado que son al menos cinco pigmentos diferentes los que dan origen al color oscuro de sus colonias, entre ellos uno originado de la oxidación de manganeso (Hullo *et al.*, 2001; Francis & Tebo, 2002) y otro que se encuentra parcialmente caracterizado y parece no ser una melanina (Barnett & Hageman, 1983; Barnett *et al.*, 1983).

Las melaninas son pigmentos ampliamente difundidos en la naturaleza, difíciles de purificar y caracterizar por métodos químicos convencionales (Nicolaus & Nicolaus, 1997). En general, son polímeros policíclicos,

producto de reacciones reversibles de óxido-reducción entre quinonas, formados a través de procesos fluctuantes y no reproducibles que involucran radicales libres, sujetos a un continuo cambio (Nicolaus *et al.*, 2002), presentes en organismos aerobios en forma extracelular o intracelular, siendo esta última la más común.

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; lo que las convierten en una nueva clase de biomateriales con potencial tecnológico y que podrían ser utilizadas en el desarrollo de actuadores, tejidos artificiales, aparatos fotovoltaicos, opto-electrónicos y fotónicos, y en el diseño de sensores químicos y de humedad.

Desde este punto de vista, y teniendo en cuenta la riqueza de especies y variedades microbianas con posible potencial biotecnológico de ciertos países, es importante la búsqueda de cepas nativas productoras de compuestos de interés industrial, bajo condiciones de cultivo adecuadas, como una forma de impulsar avances científicos, económicos y sociales; cepas cuyo manejo, aunque requiere condiciones apropiadas para su crecimiento, manipulación y adaptación a biotransformaciones genéticas, puede ser más sencillo, económico y fácil que el de las adquiridas comercialmente.

El principal objetivo de esta investigación fue estudiar la influencia de varios

componentes del medio de cultivo, como el tipo de fuente de carbono y/o nitrógeno, en la producción de melanina por una cepa nativa de *B. subtilis* con el fin de aumentar el rendimiento de pigmento por célula y determinar un medio adecuado para su producción. De esta forma, la síntesis microbiana de este tipo de compuestos puede convertirse en una opción atractiva para su producción a escala comercial, mucho más viable que otros métodos de producción alternativos, como el empleo de enzimas puras, la síntesis química o la extracción directa del polímero a partir de tejidos animales o vegetales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CEPA.

Se trabajó con una cepa nativa de *B. subtilis* obtenida del cepario de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, la cual produce un pigmento naranja cuando es cultivada en medio Luria-Bertani –LB–, previamente identificado como melanina, y que se encuentra conservada como solución de esporas a un patrón de Mac-Farland de 10 (Gómez-Marín *et al.*, 2007).

La pureza del cultivo se determinó por medio de la apariencia de las colonias cultivadas en una caja de petri con agar LB en superficie sólida, inoculada a partir de cada experimento, y empleando la tinción de Gram.

### Medios de cultivo.

La composición exacta de los medios evaluados se resume en la Tabla 1. Se trabajó con diez medios de cultivo que tuvieron como

base al medio LB (medio 1), al que se le quitaron o agregaron componentes, reportados en la literatura como estimulantes del crecimiento celular y/o de la producción de pigmento (Hullo *et al.*, 2001, Gómez-Marín & Naranjo-Fernández, 2003).

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave tipo horizontal marca Trident Medical Corporation EA – 620 a 121°C, 15 psi por 15 min. La glucosa, el almidón, la tirosina y el sulfato de manganeso se esterilizaron por separado para evitar reacciones de caramelización y/o gelatinización. Se adicionaron al medio de cultivo en una cámara de flujo laminar para asegurar condiciones de esterilidad (Grimont & Grimont, 1984).

Para la evaluación de los medios de cultivo se utilizó un agitador/incubador marca INNOVA 4400, un medidor de pH marca Hanna pH 210 y un espectrofotómetro de luz visible marca Spectronic 21 Bausch & Lomb. Las condiciones experimentales se determinaron basadas en la bibliografía y de acuerdo a ensayos previos (Barnett *et al.*, 1983; Torres & Bonilla, 1999; Toro *et al.*, 2001; Gómez-Marín & Naranjo-Fernández, 2003).

### *Curva de crecimiento y producción de pigmento en medio LB*

El inóculo se incubó a 37°C por 24 h y correspondió al 10.0% del volumen del medio cultivado. Se utilizaron 50 matraces de 100 ml, cada uno con 20 ml de caldo LB. Los cultivos fueron incubados a 37°C y 100 rpm.

Cada cierto tiempo se tomaron tres matraces y se les midió pH, crecimiento celular

**Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo

<b>Componentes</b>	<b>LB (1)</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
Extracto de levadura (g/l)	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Peptona (g/l)	6.0	6.0	-	-	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Cloruro de sodio (g/l)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Almidón (g/l)	-	10.6	-	10.6	-	-	-	-	-	-
Citrato de diamonio (g/l)	-	-	1.0	1.0	-	-	-	-	-	-
Sulfato de manganeso (mM)	-	-	-	-	0.69	-	-	-	-	-
Tirosina (mM)	-	-	-	-	-	0.31	-	-	-	-
Sulfato de cobre ( $\mu$ M)	-	-	-	-	-	-	15.0	-	-	-
Glucosa (mM)	-	-	-	-	-	-	-	35.2	70.4	-

y producción de pigmento. Al comienzo del cultivo celular las muestras fueron tomadas en intervalos de 2 h, luego este lapso de tiempo se fue extendiendo, de acuerdo a la evolución del cultivo bacteriano, hasta ser de 5 h hacia el final del periodo de incubación.

#### *Medición del crecimiento celular y la producción de pigmento.*

Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 20 min para separar las células del caldo de cultivo. La producción de melanina se cuantificó mediante la medición de absorbancia a 550 nm al medio libre de células

diluido (1:2). Las células fueron resuspendidas y diluidas en agua destilada (1:2) y a las soluciones resultantes se les midió la absorbancia a 660 nm. Para conocer la concentración de células en el cultivo (g/l), se construyó una gráfica de peso seco contra absorbancia, como se ha sugerido en otras investigaciones (Rojas & Gil, 1998).

#### *Evaluación de diferentes medios de cultivo.*

El proceso de inoculación se realizó en tres pasos: Primero el microorganismo se reactivó en caldo LB a 37°C, 95 rpm por 24 h. Luego, las células fueron adaptadas a cada medio

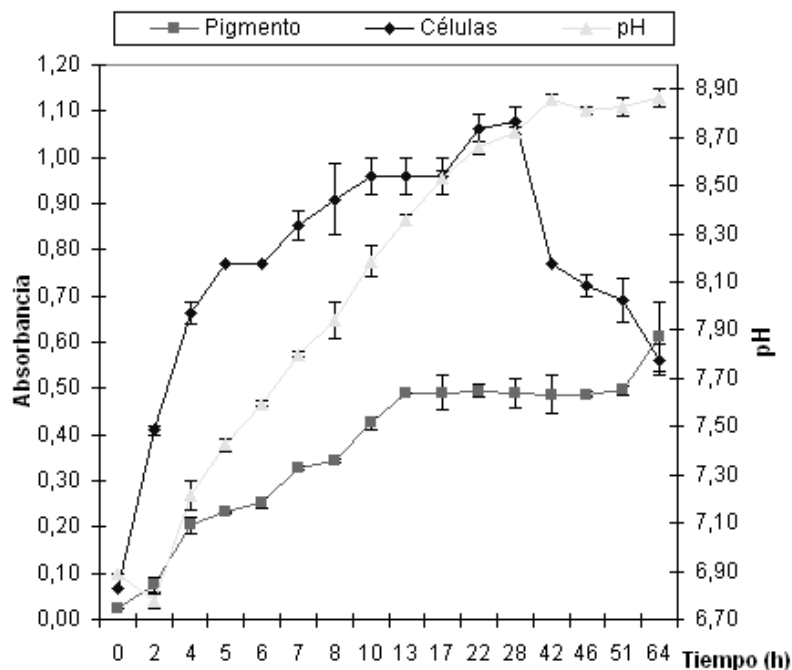
# Artículos

propuesto (tabla 1) incubándolas a 37°C, 95 rpm por 8 h; finalmente, fueron transferidas a medio de cultivo nuevo, empleando una relación de volumen entre el caldo y el volumen del matraz de 1:7, y se incubaron a 37°C, 95 rpm por 24 h. En todo el proceso, el inóculo correspondió al 10.0% del volumen del medio cultivado

El análisis de cada tratamiento se realizó empleando un diseño experimental unifactorial y aplicando una prueba bilateral de Tukey, con la ayuda del paquete estadístico SAS 8.2. Se realizaron tres observaciones para cada muestra y nueve para la muestra control (Medio LB) (Montgomery, 1991), y se comparó la producción de pigmento y el crecimiento

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La variación de pH, la curva de crecimiento celular y producción de pigmento en medio LB se muestra en la Fig. 1. Puede observarse que el microorganismo no presentó fase de adaptación y entró rápidamente a la fase de crecimiento exponencial, comportamiento debido a que el inóculo provino del mismo medio de cultivo. Adicionalmente, durante el crecimiento del microorganismo se presentó un aumento continuo del pH del medio de cultivo (pH inicial = 6.89), lo cual sugiere la producción de un metabolito primario con características básicas, probablemente proteasas alcalinas como ha sido sugerido en otros estudios (Montoya, 1997). Sin embargo,



**Fig. 1.** Cambio de pH en el medio, cinética de crecimiento celular y producción de melanina por una cepa nativa de *B. subtilis* en medio LB

en el momento no se cuenta con una evidencia directa que permita identificar exactamente el origen de este fenómeno.

Junto al aumento continuo del pH, el medio comenzó desarrollar un color café-rojizo en la fase exponencial del crecimiento celular, que se transformó en un naranja intenso durante la fase de crecimiento estacionario (pH del medio > 8.0). Este desarrollo del pigmento durante la fase estacionaria del cultivo indica que es un metabolito secundario, similar a lo generalmente reportado para otros pigmentos bacterianos (Torres & Bonilla, 1999; Kerr, 2000; Toro *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002) y en particular para las melaninas (Hoty & Balaraman, 1993; Jacobson & Hong, 1997). Por otro lado, diversos estudios han reportado que un pH > 8.0 facilita la oxidación y polimerización de la melanina (Saxena *et al.*, 2002; Plonka & Grabacka, 2006), y que este grado de oxidación está relacionado con el color del pigmento (Jacobson & Hong, 1997), lo cual está de acuerdo con el comportamiento encontrado.

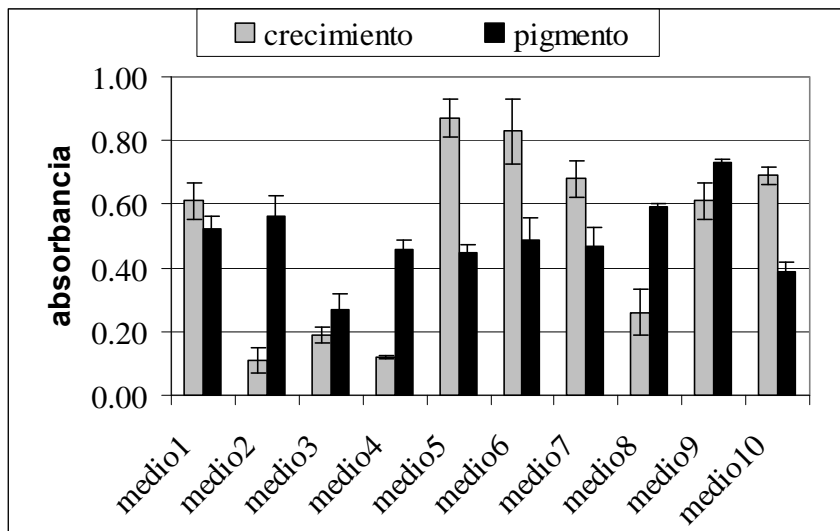
Durante el cultivo, aparentemente, el bacilo presentó un crecimiento diáuxico, es decir, una cinética de crecimiento con dos fases exponenciales cada una con una velocidad específica de crecimiento menor a la anterior (Galindo & Ramírez, 1994). Este comportamiento, probablemente, fue originado por la existencia en el medio de cultivo de dos fuentes de carbono diferentes: los carbohidratos presentes del extracto de

levadura y los aminoácidos. Para la primera fase exponencial, se encontró una velocidad específica de crecimiento (Galindo & Ramírez, 1994) mayor que para la segunda  $\mu_1=0.73 \text{ h}^{-1}$  >  $\mu_2=0.25 \text{ h}^{-1}$ , reflejando la mayor accesibilidad biológica de los carbohidratos.

La producción de pigmento se detuvo al agotarse la primera fuente de carbono (Fig. 1). Si la segunda fuente de carbono presente en el medio fueron aminoácidos, como se propuso en el párrafo anterior, este comportamiento es contrario a lo encontrado en la producción de prodigiosín, la cual se estimuló cuando la fuente de carbono fue un aminoácido (Uffen & Canale, 1972); sin embargo, es necesario una investigación más profunda entorno a este tema. El aumento en la producción de pigmento posterior, durante la fase de descenso del microorganismo, probablemente fue originado por el envejecimiento del cultivo, lo cual incrementó los procesos de oxidación del cultivo, generando polimerización de compuestos fenólicos adicionalmente generados (Nicolaus & Nicolaus, 1997; Nicolaus *et al.*, 2002).

#### *Evaluación de diferentes medios de cultivo.*

En la Fig. 2 se resumen los datos obtenidos para el crecimiento celular y la producción de pigmento cuando el microorganismo se cultivó en los diferentes medios propuestos. Los resultados indicaron que el mayor crecimiento celular se presentó en los medios 5, 6 y 7, y el menor en los medios 2, 4 y 3. Por otro



**Fig. 2.** Crecimiento celular y producción de melanina en los diferentes medios de cultivo. Tiempo de incubación 24 h.

lado, con relación a la producción de pigmento, la mayor síntesis se dio en el medio 9 y la menor en el medio 3.

El análisis de varianza para la producción de pigmento en los diferentes medios de cultivo, arrojó un coeficiente de variación de 10.20% y un  $R^2=0.8481$ , y se encontraron diferencias significativas entre las medias calculadas para los tratamientos  $-F_{\alpha=0.025, 9, 26}=2.65-$  (Mongomery, 1991). Por lo anterior, los datos experimentales se evalúan por la prueba de Tukey para la comparación de medias y de ella encontrar los medios de cultivo que presentaron una producción de pigmento significativamente diferente a la alcanzada en el caldo LB (los datos no se muestran).

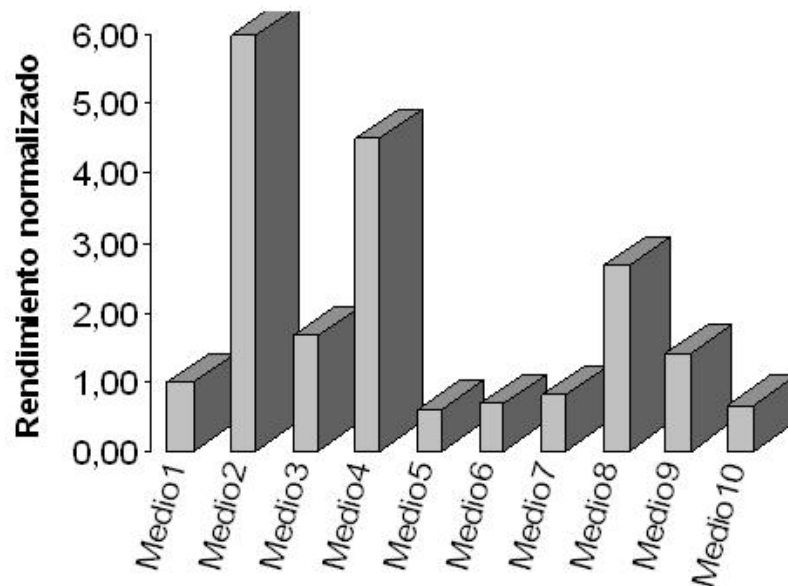
Teniendo en cuenta los resultados de aplicar la prueba de Tukey, puede decirse que, estadísticamente, los únicos medios que

presentaron diferencias significativas en la producción de pigmento, con un porcentaje de confiabilidad del 95%, fueron los medios 3, 9 y 10 (Tabla 1), y de estos, el que produjo mayor cantidad de pigmento fue el medio 9. Por otro lado, si consideramos el rendimiento en la producción de pigmento por célula como la razón entre los resultados obtenidos para la determinación cualitativa de melanina (Absorbancia a 550 nm) y del crecimiento celular (Absorbancia a 660 nm), normalizado con respecto al rendimiento, así definido, calculado para el medio LB (Fig. 3), los resultados obtenidos en esta investigación pueden extrapolarse para discutir algunas tendencias generales.

La presencia de una fuente de carbono orgánica en el medio estimuló la producción de pigmento por célula (Fig. 3). Resultado contrario a lo encontrado para otros



# Artículos



**Fig. 3.** Rendimiento normalizado en la producción de pigmento por célula en los diferentes medios de cultivo. Calculado como la razón entre la absorbancia medida a 550 nm y a 660 nm, dividido entre el rendimiento alcanzado en el medio LB.

pigmentos bacterianos, para los cuales en algunos casos la presencia de glucosa inhibe su síntesis (Kerr, 2000), mientras que en otros no la estimula, aunque su presencia es necesaria para su producción (Uffen & Canale, 1972). Por otro lado, similar a lo reportado para las melaninas (Saxena *et al.*, 2002), una alta disponibilidad de nutrientes afectó negativamente su producción: el rendimiento del medio 9 (Glucosa 70.4 mM) fue menor que el del medio 8 (Glucosa 35.2 mM), y esta a su vez muchísimo menor que el del medio 2 (Almidón 10.6 g/l), en el cual alcanzó a ser casi 6 veces mayor que el del medio LB. Lo anterior sugiere que el catabolismo de la fuente de carbono está asociado con el anabolismo de la materia orgánica, y que esta relación varía de acuerdo a las condiciones alimenticias del entorno (Costa *et al.*, 2004).

En el caso del medio 2, el bajo crecimiento celular alcanzado pudo ser causado a un factor adicional al considerado en el párrafo anterior. La poca disponibilidad como fuente de energía del almidón hizo que el microorganismo que creció en este medio tuviera un menor periodo de producción celular, al sufrir una fase adicional de acondicionamiento para producir las enzimas necesarias para degradarlo y, por tanto, después de 24 h de inoculado, este medio aún se encontraba en la fase exponencial, mientras que el cultivo en medio LB estaba en la fase estacionaria. Sin embargo, esta hipótesis sólo puede ser confirmada realizando una curva de crecimiento de la bacteria en este medio con almidón.

La sustitución de peptona por citrato de diamonio (medio 3) afectó negativamente el crecimiento celular, causando una drástica

disminución en la producción de pigmento. Esto pudo ser debido al cambio de la fuente de nitrógeno orgánica por una inorgánica, ya que el *B. subtilis* es un organismo quimiorganotrófico (Harwood, 1989). Sin embargo, el rendimiento en la producción de pigmento por célula calculado fue mayor que el obtenido en el medio LB (Fig. 3). Lo anterior sugiere una relación indirecta entre la concentración de nitrógeno disponible y la producción de melanina, similar a lo encontrado para la bacteria del suelo aerobia *Azotobacter chroococcum*, para la cual se propuso el empleo de la melanogénesis para aumentar la utilización de oxígeno y mantener condiciones redox en su entorno, adecuadas para su desarrollo, cuando la concentración de nitrógeno del medio es escasa (Plonka & Grabacka, 2006).

La adición de almidón al medio 3 (medio 4) aumentó significativamente la producción de pigmento por célula, lo cual confirma los resultados expresados en párrafos anteriores: el origen y la concentración molar de las fuentes de nitrógeno y de carbono afectaron la producción de pigmento. El rendimiento en el medio 4 fue 1.3 veces menor al del medio 2, disminución por el cambio de la peptona por dicitrato de amonio, y fue, aproximadamente, 2.7 veces mayor al del medio 3, debido a la presencia del almidón.

La presencia de manganeso (medio 5), de tirosina (medio 6), de trazas de sulfato de cobre (medio 7) y el aumento en la concentración de NaCl (medio 10) en el medio de cultivo, estimularon el crecimiento celular, disminuyendo el rendimiento en la producción

de pigmento por célula (Fig. 3). En el caso del NaCl, los resultados concordaron con los obtenidos en las pruebas de caracterización del microorganismo (Gómez-Marín *et al.*, 2007), en las cuales pudo notarse que en agar nutritivo con 7% de NaCl el microorganismo crece pero no produce pigmento. Es importante notar que no existen reportes acerca de la influencia de la concentración de sales en la producción de pigmentos bacterianos.

La disminución en el rendimiento de la producción de pigmento debido a la presencia de manganeso o tirosina en el medio de cultivo fue reportado para la producción de un pigmento negro por *B. subtilis* (Hinojosa-Rebollar *et al.*, 1995), pero es un comportamiento contrario a lo encontrado para la producción de melaninas (Barnett *et al.*, 1983; Hoty & Balaraman, 1993; Francis & Tebo, 2002, Gómez-Marín & Naranjo-Fernández, 2003). Sin embargo, en estos trabajos la concentración de tirosina trabajada fue igual o superior a 4.0 mM, muchísimo mayor a la evaluada en esta investigación. En el caso del cobre, los resultados publicados son diversos: mientras en algunos trabajos estimuló la producción de pigmento (Hullo *et al.*, 2001), aún a concentraciones de cobre iguales a 0.25 mM (Martins *et al.*, 2002), en otros la síntesis es inhibida a 0.67 mM (Barnett *et al.*, 1983).

La producción de melanina es una de las adaptaciones a las condiciones variables de la tierra más universales y enigmáticas de los organismos vivos. En el momento, no existe acuerdo entre cuales son sus funciones

básicas y sus procesos de formación aún no están claramente establecidos, especialmente entre los microorganismos (Coon *et al.*, 1994, Plonka & Grabacka, 2006). En general, los reportes acerca del aumento en la producción de melanina debido al incremento en la concentración de tirosina y cobre en el medio, ha sido asociado a su relación con enzimas implicadas con los procesos melanogénicos, como las tirosinasas. Sin embargo, en estos procesos se han reportado otra variedad de enzimas involucradas, algunas de las cuales no emplean tirosina como sustrato ni contienen cobre en sus sitios activos (Plonka & Grabacka, 2006), lo cual puede explicar los resultados encontrados en este estudio.

Otra posible explicación, a parte de las planteadas en párrafos precedentes, para justificar el nulo efecto del manganeso, el cobre y la tirosina como agentes inductores en la producción de melanina encontrado en esta investigación, es considerar que su concentración en el medio, y por tanto su concentración iónica disponible, esta modificada debido a la acción como agentes complejantes, o precipitantes de iones metálicos, de ciertas sustancias del medio como el extracto de levadura y la peptona. Sin embargo, los autores no tienen conocimiento de algún trabajo publicado hasta el momento que evalúe la disponibilidad real de estos compuestos para las células, y para la validación de esta hipótesis se hace necesaria más investigación al respecto.

## CONCLUSIONES

Los resultados revelan la importancia de los factores nutricionales en la producción de melanina por *B. subtilis*, especialmente en situaciones adversas, como el crecimiento del microorganismo con poca disponibilidad de nutrientes. En este trabajo, se encuentra que la síntesis de melanina es estimulada por una fuente de carbono orgánica, como los carbohidratos, presentándose mayor rendimiento de la producción de pigmento por célula a bajas concentraciones. De manera similar, es favorecida por una fuente de nitrógeno orgánica.

El manganeso, el cobre, la tirosina y el aumento de la concentración de NaCl en el medio estimulan el crecimiento celular, disminuyendo el rendimiento en la producción de melanina.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores de ésta investigación expresan sus agradecimientos a Rosalba Alzate Castrillón, Ángela María Mora Velásquez y Blanca Lucía Pineda Gómez, del Laboratorio de Microbiología, y a las profesoras Edna Judith Márquez Fernández y María Elena Márquez Fernández.

## REFERENCIAS

- Barnett T & Hageman J (1983) Characterization of a brown pigment from *Bacillus subtilis*. *Can. J. Microbiol.* 29: 309-315.

# Artículos

- Barnett TA, Valenzuela D, Riner S & Hageman JH (1983) Production by *Bacillus subtilis* of brown sporulation-associated pigments. *Can. J. Microbiol.* 29: 96-101.
- Coon SL, Kotob SI, Jarvis BB, Wang S, Fuqua WC & Weiner RM (1994) Homogentisic acid is the product of MelA, which mediates melanogenesis in the marine bacterium *Shewanella colwelliana* D. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3006-3010.
- Costa JM, Corbellini VA & Scroferneker ML (2004) Study of different nitrogen sources on glucose uptake and production of melanin precursors and fungal mass of *Fonsecaea pedrosoi* cultured in tricyclazole. *Process Biochem.* 39: 633-636.
- Francis C & Tebo B (2002) Enzymatic manganese (II) oxidation by metabolically dormant spores of diverse *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 874-880.
- Fritze D & Pukall R (2001) Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM675 and *Bacillus subtilis* DSM2277 as *Bacillus atrophaeus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 35-37.
- Gómez-Marín AM, Naranjo-Fernández D, Montoya OI & Gallego D (2007) Caracterización de un pigmento naranja producido por una cepa nativa de *Bacillus* spp. *Rev. CENIC Cienc. Biol.* 38: 55-61.
- Gómez-Marín AM & Naranjo-Fernández D (2003) Producción de un pigmento a partir de una cepa nativa bacteriana. Trabajo dirigido de grado de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. pp. 57.
- Grimont P & Grimont F (1984) Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Holt JG (ed.), NR Krieg Williams and Wilkins, Baltimore, MD. pp. 1104-1207.
- Harwood C (1989) *Bacillus*. Plenum Press, New York.
- Hinojosa-Rebollar RE, Hernández-Delgadillo R, Mesta-Howard AM, Tapia-Mendieta MP & Ortigoza-Ferado J (1995) Trazadores biológicos de flujos: Crecimiento y sobrevivencia de *Bacillus subtilis* 65-8 bajo estrés ambiental. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 37: 43-53.
- Hoty S & Balaraman K (1993) Formation of melanin pigment by a mutant of *Bacillus thuringiensis* H-14. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2365-2369.
- Hubbard DW, Ledger SE & Hoffman JA (1994) Scaling-up aerobic fermentation which produce non-newtonian, viscoelastic broths. In: Advances in Bioprocess Engineering. Galindo E & Ramírez OT (eds.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 95-101.
- Hullo M, Moszer I, Danchin A & Martin-Verstraete I (2001) Cot A of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.* 183: 5426-5430.
- Jacobson E & Hong J (1997) Redox buffering by melanin and Fe (II) in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* 179: 5340-5346.
- Kerr JR (2000) Phenazine pigments: antibiotics and virulence factors. *Infect. Dis. Rev.* 2: 184-194.

# Artículos

- Martins L, Soares C, Pereira M, Teixeira M, Costa T, Jones G & Henriques A (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 200: 8-27.
- Montoya OI (1997) Aislamiento de cepas nativas de *Bacillus* spp. alcalofílicas productoras de proteasas alcalinas. Tesis de grado de Maestría en Ciencias -área de Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1997. p. 101.
- Mongomery D (1991) Diseño y análisis de experimentos. Editorial Iberoamericana, México.
- Nicolaus RA, Bolognese A & Nicolaus B (2002) The pigment cell and its biogenesis. *Napoli: Atti Accademia Pontaniana*. L: 225-243.
- Nicolaus RA & Nicolaus BJR (1997) Speculating on the band colors in nature". *Napoli: Atti Accademia Pontaniana*. XLV: 365-385.
- Plonka PM & Grabacka M (2006) Melanin synthesis in microorganisms- biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim. Pol.* 53: 429-443.
- Rojas MC & Gil JO (1998) Obtención de proteína unicelular en discontinuo a partir del suero de leche. Trabajo dirigido de grado de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Minas. Medellín. p. 120.
- Saxena D, Ben-Dov E, Manasherob R, Barak Z, Boussiba S & Zaritsky A (2002) A UV Tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki producing melanin. *Curr. Microbiol.* 44: 25-30.
- Toro C, Patiño P & Ríos R (2001) Formulación de un medio de cultivo para la producción de pigmento a partir de *Serratia marcescens*. *Rev. Facultad de Ing., Colombia*, 23: 71-80.
- Torres AM & Bonilla G (1999) Estudio de la relación carbono/nitrógeno y su influencia en la síntesis de prodigiosín a partir de *Serratia* spp. Trabajo dirigido de grado de Ingeniería Química. Universidad de Antioquia. Medellín. p. 68.
- Uffen R & Canale-Parola E (1972) Synthesis of pulcherriminic acid by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 111: 86-93.