

720568



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A

**CONDICIONES DE PRODUCCION Y CARACTERIZACION
PARCIAL DE UN PIGMENTO PRODUCIDO POR
*Bacillus subtilis***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

ALICIA RANGEL MANDUJANO

MEXICO, D. F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Bajo la dirección de la QBP. Elizabeth Hinojosa Rebollar y del QBP. César H. Hernández Rodríguez.

Agradezco la colaboración del Dr. Joaquín Tamariz de Química Orgánica.

A mis Padres y Hermanos

que me han apoyado siempre en todo.

Con mucho cariño.

A todas las personas del Lab.

de Microbiología General

por su ayuda y principalmente

por su amistad.

A mis asesores Elizabeth

Hinojosa R. y César H.

Hernández R.

C O N T E N I D O

	Página.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y METODOS.....	12
RESULTADOS.....	23
DISCUSION.....	45
CONCLUSIONES.....	53
APENDICE.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	55

R E S U M E N

RESUMEN

De una muestra de agua de producción del pozo Hallazgo 65-8 de Poza Rica Veracruz, se aisló una cepa de *Bacillus subtilis* que produce un pigmento negro el cual es soluble en el medio de cultivo.

La cepa es halotolerante y las condiciones óptimas para la producción del pigmento son: cultivo estacionario en medios sintéticos simples, temperatura entre 28 y 37°C, pH 7 e incubación de más de 48 h.

El tipo de fuente de carbono del medio y la luz no afectan la síntesis del pigmento, mientras que la agitación en medio de Czapek adicionado de extracto de levadura, fuentes de nitrógeno diferentes al NO_3^- y temperaturas de incubación mayores de 40°C inhiben la síntesis del pigmento.

El medio más simple en el que la cepa puede producir pigmento está compuesto de NaNO_3 , K_2HPO_4 y sacarosa.

El pigmento se purificó por el método de Sevag modificado, que precipita proteínas y por el método de Blackberg y Wanger que precipita melanina. Los pigmentos purificados poseen características similares a las de la melanina, sin embargo el pigmento obtenido por el primer método es soluble en agua y de bajo peso molecular, lo que no concuerda con los datos reportados para las melaninas.

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION

Muchas colonias de microorganismos muestran distintas coloraciones, esto se debe a que sus células son pigmentadas. Algunas especies secretan los pigmentos al medio de cultivo, mientras que otras los retienen en su membrana citoplásmica o pared celular. La capacidad de producirlos está determinada genéticamente y es una característica diagnóstica (23). Como se puede observar en la tabla 1a y b, los pigmentos microbianos están ampliamente distribuidos entre los procariontes y pueden tener muy variada naturaleza química.

Entre los pigmentos mejor estudiados están los fotosintéticos y los de algunas bacterias como *Halobacterium*, *Corynebacterium* y *Serratia marcescens* (6). El conocimiento de los pigmentos microbianos no es muy amplio y a la mayoría de éstos no se les ha encontrado una función específica en la célula, se piensa que protegen a los microorganismos contra el efecto de la luz ultravioleta y longitudes cercanas a ésta. La capacidad de formar pigmentos a algunos microorganismos les da cierta ventaja sobre las cepas no pigmentadas, las cuales son inactivadas más fácilmente en presencia de la luz (23). También los pigmentos pueden proteger contra la fagocitosis, como observó Singh en 1942 (24). El

Tabla 1a. Microorganismos productores de pigmentos.

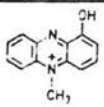
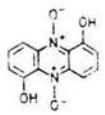
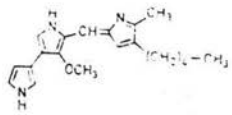
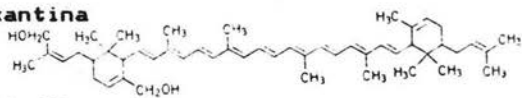
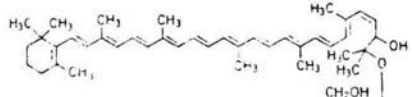
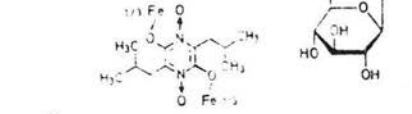
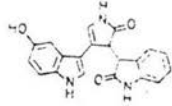
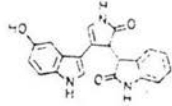
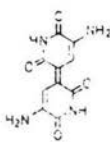
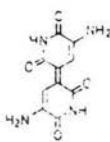
Microorganismo	Pigmento	Estructura
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (23)	Piocianina	
<i>Cromobacterium iodinum</i> (23)	Iodinina	
<i>Serratia marcescens</i> (23)	Prodigiosina	
<i>Micrococcus luteus</i> (23)	Sarcinoxantina	
<i>Mycobacterium phlei</i> (23)	Phleixantofila	
<i>Candida pulcherrima</i> (23)	Pulcherrimina	
<i>Cromobacterium violaceum</i> (23)	Violaceina	
<i>Pseudomonas indigofera</i> (23)	Indigoidina	
<i>Corynebacterium indigosum</i> (23)	Indigoidina	
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i> (23)	Indigoidina	

Tabla 1b. Microorganismos productores de pigmentos.

Microorganismo	Pigmento	Estructura
<i>Streptomyces lavendulae</i> (17)	Melanina	*
<i>Azospirillum brasilense</i> (15)	Melanina	*
<i>Bacterium salmonicida</i> (12)	Melanina	*
<i>Verticillium dahliae</i> (9)	Melanina	*
<i>Amorphotheca resinae</i> (9)	Melanina	*
<i>Epicoccum nigrum</i> (9)	Melanina	*
<i>Humicola grisea</i> (9)	Melanina	*
<i>Colletotricum coccodes</i> (9)	Melanina	*
<i>Sclerotium rolfsii</i> (9)	Melanina	*
<i>Aspergillus niger</i> (25)	Aspergilina	Perilenequinona

*= Polímero de 5,6 dihidroxiindol y 5,6 indolquinona. (19).

encontró que algunos pigmentos bacterianos como la prodigiosina de *Serratia marcescens* y la violaceína de *Cromobacterium violaceum* protegían a las células de la fagocitosis amibiana, y que el protista se enquistaba o moría en presencia del pigmento. Esto no sucedía con las bacterias no pigmentadas, las cuales eran fagocitadas por las amibas sin ningún efecto secundario. Este experimento se hizo también con *Pseudomonas pyocyanea* y *P.aeruginosa* obteniendo resultados semejantes (8).

Muchos microorganismos producen pigmentos con propiedades antibióticas (23), así por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa* cuando crece aeróbicamente en medio pobre en fosfatos, secreta gran cantidad de pigmentos, de los cuales la piocianina es el que produce en mayor cantidad. El interés del estudio de este pigmento deriva de su intenso color, sus propiedades antibióticas y la correlación entre su producción y la patogenicidad. La piocianina puede desviar el flujo de electrones, de la vía normal del citocromo a una vía productora de O_2^- y H_2O_2 , y parece ser que la acción antibiótica del pigmento se debe en gran parte a la toxicidad y al incremento en la producción de estos compues-

tos. También la cianomicina, un antibiótico producido por *Streptomyces cyanoflavus*, se ha identificado como piocianina (13).

Los pigmentos bacterianos no fotosintéticos generalmente son sintetizados durante el metabolismo secundario, es decir que su inicio y máxima producción ocurren en la fase estacionaria de crecimiento (23).

Los pigmentos café-negros de microorganismos se han estudiado principalmente en hongos, entre los cuales se reportan la aspergilina, un pigmento negro de alto peso molecular que tiene una perilenequinona y varios aminoácidos, que le dan el color a las conidias de *Aspergillus niger* (25), y las melaninas o compuestos similares, que incluyen compuestos de diversos orígenes pero que comparten características físicas y químicas y que son producidos por una amplia variedad de organismos (4,9,11,16,17,19,26,27).

En los trabajos realizados sobre estos pigmentos se estudian varios factores que influyen en su formación, principalmente el metabolismo de la tirosina y otros aminoácidos. El proceso por el que se llega a la formación final de los pigmentos es muy complejo y la información sobre la secuencia de reacciones que van de tiro-

sina a pigmento es incompleta (12,17).

Con base en estudios de degradación de melaninas naturales, Nicolaus (1969) (20) propone una clasificación arbitraria para estos pigmentos: eumelaninas, phaeocomelaninas y alomelaninas, los dos primeros tipos se encuentran principalmente en el reino animal y están formados por compuestos de tipo indol dados por la oxidación enzimática de la tirosina. Las alomelaninas se forman por la oxidación enzimática de precursores no indólicos y se encuentran en plantas, hongos y bacterias.

Existen numerosos ejemplos de estructuras fúngicas que son resistentes a condiciones ambientales adversas. Muchas de estas estructuras tienen pigmentos negros, los cuales se han reportado como melaninas (9), y se ha visto que protegen a la pared celular de las quitinasas y las endo B-1,3-glucanasas evitando la lisis por la acción enzimática microbiana (9,26).

Como resultado de los estudios realizados en diferentes estructuras de hongos se encontró que la melanina se presenta en forma de "verrugas" o gránulos que se localizan dentro y/o fuera de las paredes celulares (9,26,27).

Con respecto a las bacterias existe una gran variedad de organismos que producen pigmentos cafés o negros como son *Azospirillum brasilense* (15), *Bacillus subtilis* (1,2), *Bacterium salmonicida* (12), *Rhizobium leguminosarum* (7), y *Streptomyces lavendulae* (17).

Solamente en unos cuantos reportes se menciona cual es la localización, naturaleza química o forma en que se presenta el pigmento. Unos de estos casos son, el de *Azospirillum brasilense*, donde el pigmento se encuentra en forma de gránulos en la pared (15), y el de los *Streptomyces*, donde se reporta la producción de un pigmento soluble en el medio (17).

En las bacterias del género *Bacillus* aisladas de ambientes salinos las coloraciones más comunes son el amarillo, rosa y naranja. La salinidad parece ser el factor ecológico que más influye en la distribución de las cepas pigmentadas (21). Entre las especies de este género que producen pigmento café o negro solo se reporta a *B. subtilis* var. *aterrimus* que produce el pigmento exclusivamente en medios de carbohidratos y *B. subtilis* var. *niger* que forma el pigmento en medios con tirosina (3). Más recientemente Barnett y col.

(1983) (1,2) reportaron el *B.subtilis* 168 L-4 que produce por lo menos cinco pigmentos cafés relacionados con la esporulación. Los precursores necesarios para la formación de éstos pigmentos se liberan de la célula y se acumulan en el medio de cultivo durante el crecimiento logarítmico y en la etapa temprana de la fase estacionaria. Una vez excretados, estos precursores pueden convertirse en los pigmentos por una vía no enzimática en la que es necesaria la presencia de oxígeno hidróxidos y Mn^{+2} como catalizador (2). En un trabajo posterior estos mismos autores aislaron e identificaron parcialmente uno de los pigmentos y al que llamaron T1, a pesar de tener un espectro similar al de las melaninas es diferente a éstas por su bajo peso molecular (3500 daltones), su solubilidad en agua y por el alto contenido de oxígeno en su molécula (1). De los otros pigmentos concluyen que por lo menos algunas de sus características no son iguales a las reportadas para la identificación de melaninas descritas anteriormente.

Este trabajo pretende ampliar la información sobre pigmentos bacterianos, sobre todo los de color café-negros, de los cuales la mayoría han sido reportados en

hongos. Para esto se identificará una cepa bacteriana aislada de un pozo petrolero, se estudiará el comportamiento de producción del pigmento, y se iniciarán estudios sobre sus propiedades físicas y químicas. Esperando que estos datos sirvan para comprender mejor el metabolismo secundario microbiano.

OBJETIVOS

- 1.- Identificar una cepa negra aislada de aguas de producción de pozos petroleros.
- 2.- Determinar la influencia de algunos factores físicos y del medio de cultivo sobre la producción del pigmento.
- 3.- Obtener y purificar el pigmento negro.
- 4.- Caracterizar el pigmento por métodos físicos y químicos, y compararlo con la melanina.

M A T E R I A L

Y

M E T O D O S

MATERIAL Y METODOS

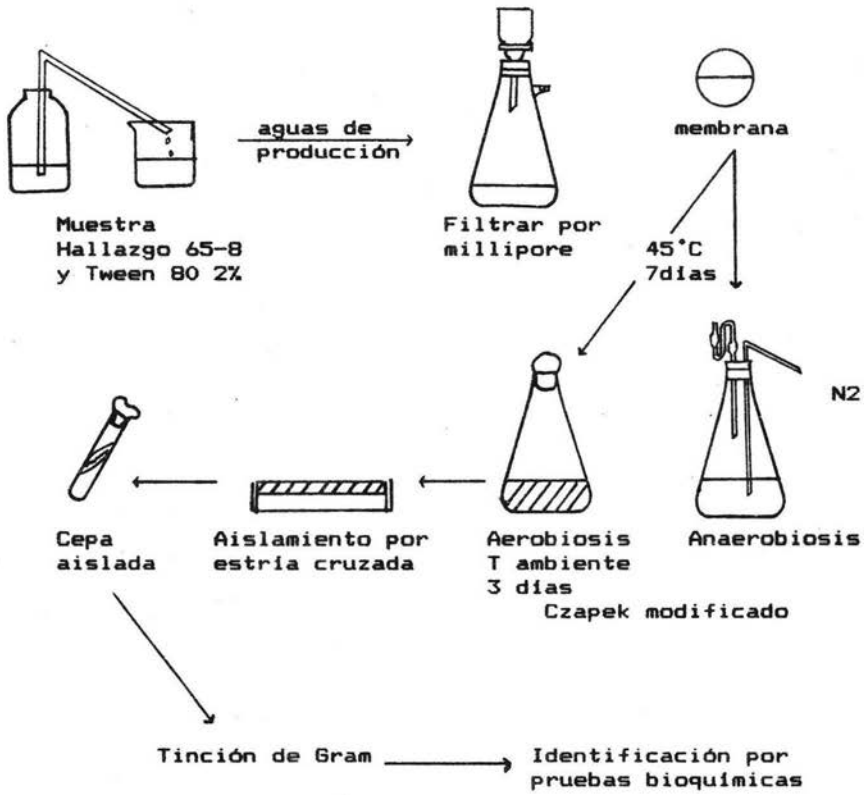
I) AISLAMIENTO A PARTIR DE AGUAS DE PRODUCCION DE POZOS PETROLEROS.

Se tomaron muestras de aguas de producción de pozos petroleros de Poza Rica Veracruz, para aislar los microorganismos existentes. A las muestras de petróleo mezclado con agua se les adicionó Tween 80 al 2%, se agitaron manualmente por 30 min. y se dejaron reposar durante dos semanas para separar las dos fases. La fase acuosa se extrajo por medio de un sifón, se filtró en equipo millipore usando membranas de 0.45 micrometros, y con éstas se inocularon dos matraces de 500 ml con 100 ml de medio Czapek modificado (apéndice) para cada muestra, incubando uno en condiciones de aerobiosis y otro en anaerobiosis a 45°C durante 7 días. Posteriormente, se mantuvieron 3 días a temperatura ambiente y el matrás del pozo Hallazgo 65-8 incubado en condiciones aeróbicas presentó la producción de un pigmento de color negro.

La cepa productora del pigmento, se aisló por el método de la estria cruzada en placas de medio de Czapek modificado. (Esquema 1).

II) IDENTIFICACION DE LA CEPA PRODUCTORA DEL PIGMENTO

Para la identificación de la cepa se describió la morfología colonial y microscópica y se realizaron las



Esquema 1. Aislamiento e identificación de la cepa negra, obtenida de aguas de producción de pozos petroleros.

siguientes pruebas bioquímicas recomendadas para la identificación de bacterias del género *Bacillus* (3,5,-21): Crecimiento en anaerobiosis y en NaCl al 7%, Voges-Proskauer, hidrólisis del almidón, reducción de NO₃- a NO₂- y producción de oxidása, catalasa y caseína.

III) EFECTO DE LAS CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE LA SINTESIS DEL PIGMENTO

La cepa se sometió a diferentes condiciones físicas y químicas de incubación. El medio de Czapek modificado, sin extracto de levadura fue el utilizado como base para la mayoría de las pruebas.

Se prepararon cultivos en matraces de 250 ml, se incubaron a 37°C, con excepción de los cultivos a diferentes temperaturas, y se observaron cada 24 h durante siete días.

Los cambios a los que se sometió la cepa fueron:

a) Iluminación.

El efecto de la luz se realizó colocando unos cultivos en obscuridad y otros en presencia de luz.

b) Temperutura.

Los cultivos se colocaron en estufas a las siguientes temperaturas: 4°C, 28°C, 32°C, 37°C, 45°C y 55°C.

c) Agitación.

Esta se realizó en medio de Czapek modificado, con y sin extracto de levadura, las velocidades utilizadas fueron: estacionario, 75, 125 y 200 revoluciones por minuto (rpm). Se usó una agitadora New Brunswick mod. G-25.

d) Concentración de NaCl

Se probaron diferentes concentraciones de NaCl para conocer el comportamiento en cuanto a tolerancia y producción de pigmento. Las concentraciones que se usaron fueron: 0,2,4,5,6,8,10,12 y 14 por ciento.

e) pH.

Los pH probados fueron 4,5,6,7,8 y 9, los cultivos se ajustaron con NaOH y HCL 1 M, usando papel pH Meditest.

f) Modificaciones al medio de Czapek

El efecto de diversos sustratos sobre el crecimiento y producción del pigmento se hicieron substituyendo algunos de los componentes originales del medio.

El sustrato original de carbono, la sacarosa se modificó cambiandola por: almidón, dulcitol, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa y ribosa al 1%.

La fuente original de nitrógeno NaNO_3 , se reemplazó por: nitrato de amonio, cloruro de amonio sulfato de amonio, nitrito de sodio, sulfato ferroso amonico,

tirosina y urea al 0.3%.

g) Otros medios de cultivo.

Los medios diferentes al Czapek se utilizaron para conocer el comportamiento de la cepa ante diferentes condiciones nutricionales. Se probaron medios sintéticos y medios complejos.

sintéticos:

Medio Czapek

Medio E

Medio de Horikoshi-Akiba (22)

complejos:

Caldo Nutritivo

Caldo Soya tripticasa

Caldo Infusión cerebro corazón.

h) Requerimientos mínimos para la síntesis del pigmento

Para conocer los requerimientos nutricionales mínimos que la cepa necesita para crecer y producir pigmento, se fueron suprimiendo cada uno de los componentes del medio de Czapek modificado.

IV) OBTENCION Y PURIFICACION DE LOS PIGMENTOS

- Obtención del pigmento negro de la cepa Hallazgo

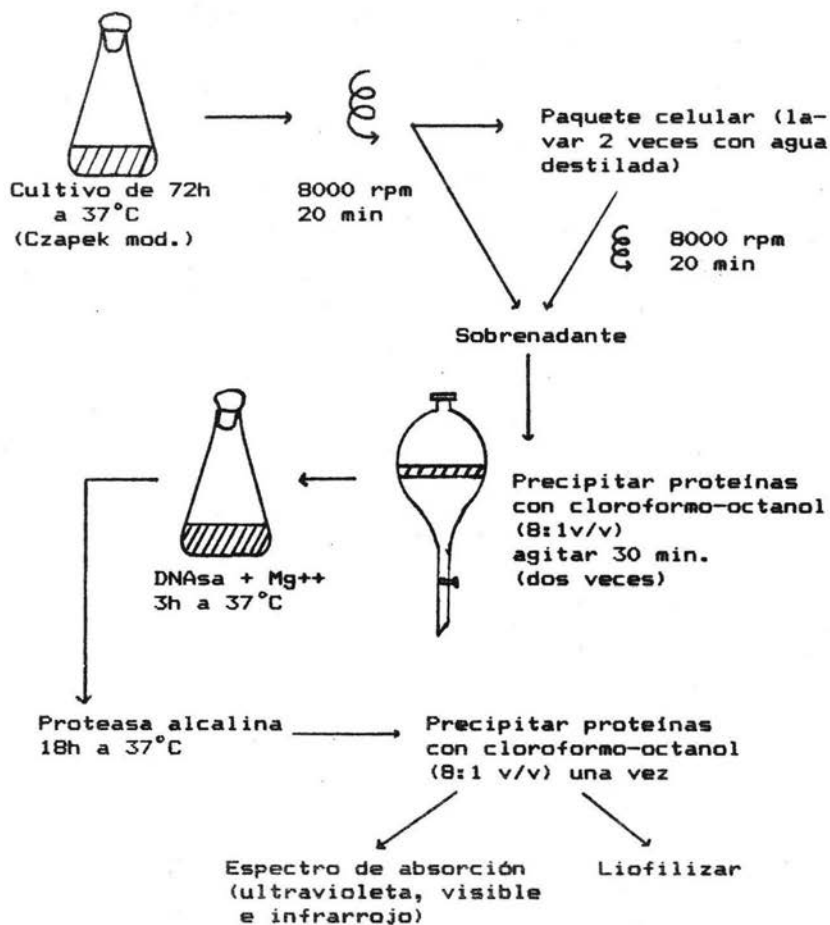
65-8.

El microorganismo se inoculó en matraces de 500 ml con 100 ml de medio de Czapek modificado, se incubó hasta que presentó el pigmento negro y se separó el paquete celular por centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos, en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B.

Se probaron dos métodos de purificación: El método de Sevag modificado (*Op cit* 18) y el método de Blackberg y Wanger (17).

1.- Método de Sevag modificado para extracción de proteínas. Esquema 2.

- a) Agregar una mezcla de cloroformo-octanol (8:1) a un volumen igual del pigmento en un embudo de separación y agitar manualmente 30 min.
- b) Dejar separar las fases y el precipitado, recolectar la fase acuosa donde se encuentra el pigmento.
- c) Repetir los pasos a y b hasta que no se presente precipitado protéico.
- d) Agregar a la fase acuosa 1 mg/ml de DNAsa y 0.01 mg/ml de MgSO₄ e incubar a 37°C durante 3 horas, con agitaciones ocasionales
- e) Agregar proteasa alcalina y dejar a 37°C por 18 horas.
- f) Repetir pasos a y b.
- g) Liofilizar el pigmento.



Esquema 2. Purificación del pigmento por el método de Sevag modificado (Op cit 18).

2.- Método de Blackberg y Wanger para precipitar melanina. Esquema 3.

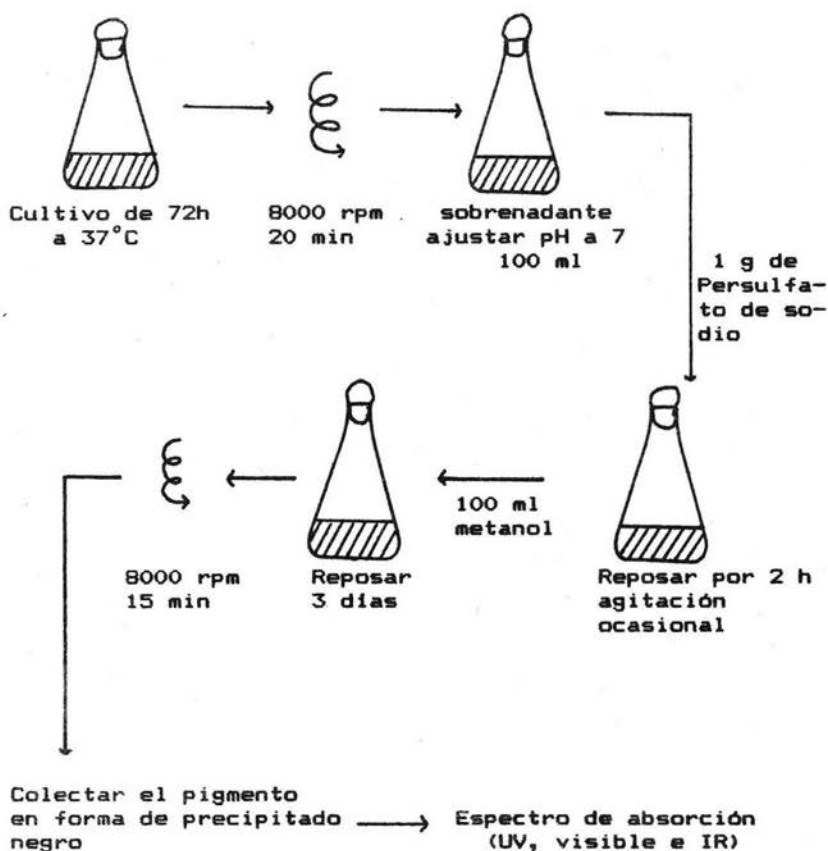
- a) Ajustar el sobrenadante del cultivo a pH de 7.0.
- b) Agregar 1 g de Persulfato de potasio por cada 100 ml.
- c) Dejar reposar por 2 horas con agitaciones ocasionales.
- d) Agregar 100 ml de metanol por cada 100 ml de cultivo y dejar reposar la mezcla por 3 días.
- e) Colectar por centrifugación el pigmento precipitado.

3.- Para tener una melanina con que comparar el pigmento purificado, se obtuvo melanina a partir de cabello humano (19). Esquema 4.

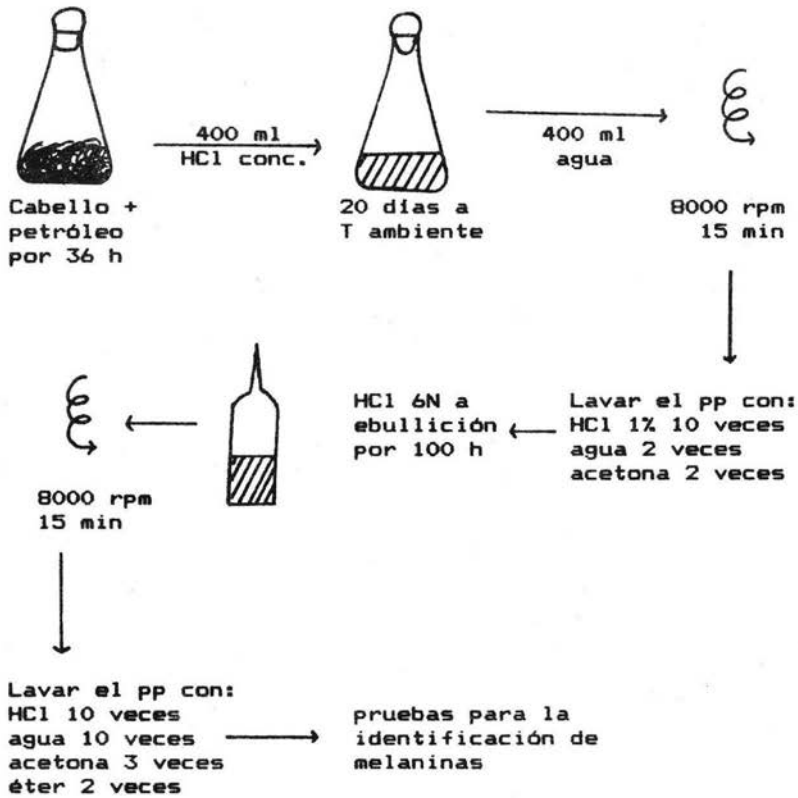
- a) Desengrasar 280 g de cabello humano con petróleo ligero durante 36 horas
- b) Dejarlo en 400 ml de HCl concentrado por 20 días a temperatura ambiente
- c) Adicionar 400 ml de agua y centrifugar
- d) Lavar el precipitado con HCl 1% (10 veces), agua (2 veces) y acetona (2 veces)
- e) Tratar el pigmento con HCl 6 N a ebullición por 100 h
- f) Centrifugar y lavar con HCl 1% (10 veces), agua (10 veces), acetona (3 veces) y éter (2 veces)

V) ESTUDIO FISICO Y QUIMICO DE LOS PIGMENTOS

- 1.- Determinación del espectro de absorción.



Esquema 3. Purificación del pigmento por el método de Blackberg y Wanger (17).



Esquema 4. Obtención de melanina a partir de cabello humano (19).

Se midió el espectro de absorción de los tres pigmentos purificados. Para ultravioleta y luz visible se leyó de 190 a 700 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer mod. UV/VIS lambda 1A. El espectro de infrarrojo se leyó entre 4000 y 200 cm^{-1} en un Perkin-Elmer mod. 599-B.

2.- Pruebas para la determinación de melanina (9,17)

- a) Solubilidad en agua
- b) Solubilidad en KOH o NaOH 1M.
- c) Solubilidad en solventes orgánicos
- d) Precipitación del pigmento con HCl
- e) Decoloración con agentes oxidantes (H_2O_2 o NaOCl)
- f) Reacción para polifenoles con FeCl_3

3.- Determinación de proteínas por el método de Lowry (10).

4.- Estimación del peso molecular del pigmento (10)

Se utilizó una columna de 2.5 cm de ancho por 40 cm de largo y regulador de fosfatos como eluyente. Se montó una con Sephadex G-100 y otra con Sephadex G-25, como proteínas de referencia se usaron Albúmina, Tripsina y Dextrana azul 2000. Se colectaron fracciones de 30 gotas en un recolector LKB Ultrorac 7000.

Las fracciones de las dos columnas se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer mod. 55 .

RESULTADOS

RESULTADOS

I) AISLAMIENTO DE LA CEPA PRODUCTORA DEL PIGMENTO.

La cepa productora del pigmento se obtuvo de las aguas de producción del pozo petrolero Hallazgo 65-8. Esta creció en el medio de Czapek modificado incubado en condiciones de aerobiosis. La cepa se aisló por el método de la estria cruzada, incubada a 37°C. Sus características coloniales y microscópicas en este medio se muestran en la tabla 2. A la cepa se le puso el nombre de Hallazgo 65-8 negra, ya que en la misma muestra se encontró otra cepa no pigmentada. La cepa se conservó por resiembras en medio de Czapek modificado y las esporas se guardaron en tubos con tierra estéril. En las resiembras consecutivas durante dos años, no se observó pérdida o disminución de la capacidad de producción del pigmento.

II) IDENTIFICACION DE LA CEPA PRODUCTORA.

Las características coloniales, microscópicas y el crecimiento en aerobiosis estricta de la cepa corresponden al género *Bacillus*. Como se observa en la tabla 3, con los resultados de las pruebas bioquímicas la cepa se identificó como *Bacillus subtilis*.

Tabla 2. Características coloniales y microscópicas de la cepa productora del pigmento

Característica colonial	Tiempo de incubación (h)	
	24	48
Tamaño	4 mm	7-8 mm
Color	Crema	café
Forma	irregular	irregular
Elevación	Pulvinada con una vejiga	plana
Superficie	lisa	rrugosa
Aspecto	seco	seco
Bordes	irregulares	irregulares
Luz reflejada	mate	mate
Luz transmitida	opaca	opaca
Consistencia	mucoide	mucoide

Características microscópicas: Bacilo Gram + esporulado. Espora subterminal

Tabla 3. Pruebas bioquímicas para la identificación de la cepa.

	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> Hallazgo 65-8 negra
Crecimiento en anaerobiosis *	-	-
Producción de Catalasa *	+	+
Voges-Proskauer *	+	+
Hidrólisis del Almidón *	+	+
Crecimiento en NaCl al 7%	+	+
Reducción de nitratos	+	+
Producción de Caseína	+	+
Producción de Oxidasa	+	+

- = Negativo

+ = Positivo

* = Pruebas principales para llegar a especie. (3,21).

III) EFECTO DE LAS CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE LA SINTESIS DEL PIGMENTO.

Los cambios físicos en los que se probó el crecimiento y la síntesis del pigmento fueron: iluminación, temperatura y agitación.

a) Con respecto a la iluminación no se encontró ninguna influencia aparente sobre el crecimiento o la producción del pigmento.

b) Los resultados de la influencia de la temperatura sobre la pigmentación y el crecimiento se encuentran en la tabla 4, en donde se observa que la producción del pigmento se presenta más rápido entre 32°C y 37°C a las 48 h, y que a 45°C aunque el crecimiento es bueno, el pigmento no se produce.

c) En los resultados que se presentan en la tabla 5 se observa que tanto la agitación rápida (200 rpm) como la lenta (70 rpm) en el medio con extracto de levadura la cepa crece pero no pigmenta. En agitación media (125 rpm) la cepa pigmenta al transcurrir 5 días de incubación quedando de color café-rojizo y nunca llegando a negro. En el medio sin extracto de levadura la agitación en ninguna de las velocidades afecta la producción del pigmento.

Tabla 4. Efecto de la temperatura de incubación sobre la producción del pigmento.

Temperatura °C	Tiempo de incubación (h)			
	24	48	72	144
4	-	-	-	-
28	+	+	+	+
32	+	+	*	*
37	+	*	*	*
45	+	+	+	+
55	-	-	-	-

-= Sin crecimiento.

+= Crecimiento sin producción de pigmento.

*= Producción de pigmento.

Tabla 5. Efecto de la agitación sobre la producción del pigmento.

		Tiempo de incubación (h)				
rpm		24	48	72	96	144
0	c/ext	+	*	*	*	*
	s/ext	+	*	*	*	*
75	c/ext	+	+	+	+	+
	s/ext	+	*	*	*	*
125	c/ext	+	+	+	+	*
	s/ext	+	*	*	*	*
200	c/ext	+	+	+	+	+
	s/ext	+	*	*	*	*

+ = Crecimiento sin producción de pigmento.

* = Producción de pigmento.

rpm = revoluciones por minuto.

c/ext = con extracto de levadura.

s/ext = sin extracto de levadura.

d) Los resultados de la concentración de NaCl se muestran en la tabla 6 en donde se observa que la cepa es halotolerante ya que crece a concentraciones del 8%, la producción del pigmento no se vé afectada por la presencia o ausencia de sal, este se produce de 0% a 8%, variando solamente el tiempo de incubación.

e) El efecto del pH sobre el crecimiento y la síntesis del pigmento se encuentra en la tabla 7 en la que se observa que a pH 7 la cepa crece y produce el pigmento a las 48 h, mientras que a pH 8 crece después de 72 h de incubación y produce el pigmento hasta las 120 horas. En los demás pH la cepa no crece.

f) En la tabla 8, se observa que el *Bacillus subtilis* Hallazgo 65-8 negra es capaz de producir el pigmento con cualquier fuente de carbono que pueda metabolizar. Con la glucosa, la producción del pigmento se presenta poco antes de las 24 horas.

Con relación a la fuente de nitrógeno como se observa en la tabla 9, la cepa puede crecer con compuestos nitrogenados que contengan amonio, pero es capaz de producir el pigmento solo en presencia de nitratos.

Tabla 6. Efecto de la concentración de NaCl sobre la producción del pigmento.

Concentración %	tiempo de incubación (h)			
	24	48	72	120
0	+	+	*	*
2	+	*	*	*
4	+	*	*	*
5	+	*	*	*
6	+	*	*	*
8	-	+	+	*
10	-	-	-	-
12	-	-	-	-
14	-	-	-	-

-= Sin crecimiento.

+= Crecimiento sin producción de pigmento.

*= Producción de pigmento.

Tabla 7. Efecto del pH sobre la producción del pigmento.

pH	Tiempo de incubación (h)				
	24	48	72	96	120
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	+	*	*	*	*
8	-	-	+	+	*
9	-	-	-	-	-

-- Sin crecimiento.

+= Crecimiento sin producción de pigmento.

*= Producción de pigmento.

Tabla 8. Producción de pigmento con diferentes fuentes de Carbono.

Fuente de C (1%)	Tiempo de incubación (h)			
	24	48	72	168
Almidón	+	*	*	*
Dulcitol	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-
Glucosa	*	*	*	*
Lactosa	-	-	-	-
Maltosa	+	*	*	*
Manitol	+	*	*	*
Manosa	+	*	*	*
Ribosa	+	+	*	*
Sacarosa	+	*	*	*

- = Sin crecimiento.

+ = Crecimiento sin producción de pigmento.

* = Producción de pigmento.

Tabla 9. Producción de pigmento con diferentes fuentes de Nitrógeno.

Fuente de Nitrógeno (0.3%)	Tiempo de incubación (h)		
	24	48	72
Nitrato de amonio	+	*	*
Nitrato de sodio	+	*	*
Cloruro de amonio	-	+	+
Sulfato de amonio	-	+	+
Nitrito de sodio	-	-	-
Sulfato ferroso amonico	-	-	-
Tirosina	-	-	-
Urea	-	-	-

-- Sin crecimiento.

+= Crecimiento sin producción de pigmento.

*= Producción de pigmento.

g) Los resultados del crecimiento y producción del pigmento en los diferentes medios de cultivo se encuentran en la tabla 10. Ahí se observa que la producción del pigmento solo ocurre en los medios sintéticos, mientras que en los medios complejos solo se presenta crecimiento.

h) Los requerimientos mínimos nutricionales se muestran en la tabla 11, donde se observa que el microorganismo necesita para crecer y pigmentar de solo 3 compuestos que son : NaNO_3 , K_2HPO_4 y la sacarosa.

IV) OBTENCION Y PURIFICACION DE LOS PIGMENTOS.

1) Después de separar el paquete celular se comprobó que el pigmento se libera al medio de cultivo, y por observaciones microscópicas se encontró que cuando se presenta el pigmento negro predominan las esporas en el cultivo.

Después de la purificación del pigmento por el método de Sevag modificado, el aspecto del pigmento liofilizado fue el de una pastilla muy porosa soluble en agua, e insoluble en solventes orgánicos.

El pigmento purificado a partir del cultivo original por el método de Blackberg-Wanger es un precipita-

Tabla 10. Producción de pigmento en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Tiempo de incubación (h)			
	24	48	72	168
Czapek 3% Sac.	+	*	*	*
Czapek modificado	+	*	*	*
Medio E	+	*	*	*
Medio de Horikoshi-Akiba	+	*	*	*
Caldo nutritivo	+	+	+	+
Caldo TS	+	+	+	+
Caldo BHI	+	+	+	+

+ = Crecimiento sin producción de pigmento.

* = Producción de pigmento.

Sac = Sacarosa.

TS = Soya-tripticosa.

BHI = Infusión cerebro corazón.

Tabla 11. Efecto de los componentes del medio de Czapek modificado sobre la producción del pigmento.

	tiempo de incubación (h)			
	24	48	72	120
Sin nitrato de sodio	-	-	-	-
Sin fosfato dipotásico	+	+	+	+
Sin sacarosa	-	-	-	-
Sin sulfato de magnesio	+	*	*	*
Sin cloruro de potasio	+	*	*	*
Sin sulfato ferroso	+	*	*	*
Sin cloruro de sodio	+	*	*	*
Sin extracto de levadura	+	*	*	*

-= Sin crecimiento.

+ = Crecimiento sin producción de pigmento.

* = Producción de pigmento.

do de color café insoluble en agua y solventes orgánicos, únicamente se ha podido solubilizar en soluciones alcalinas (NaOH y KOH 1 M).

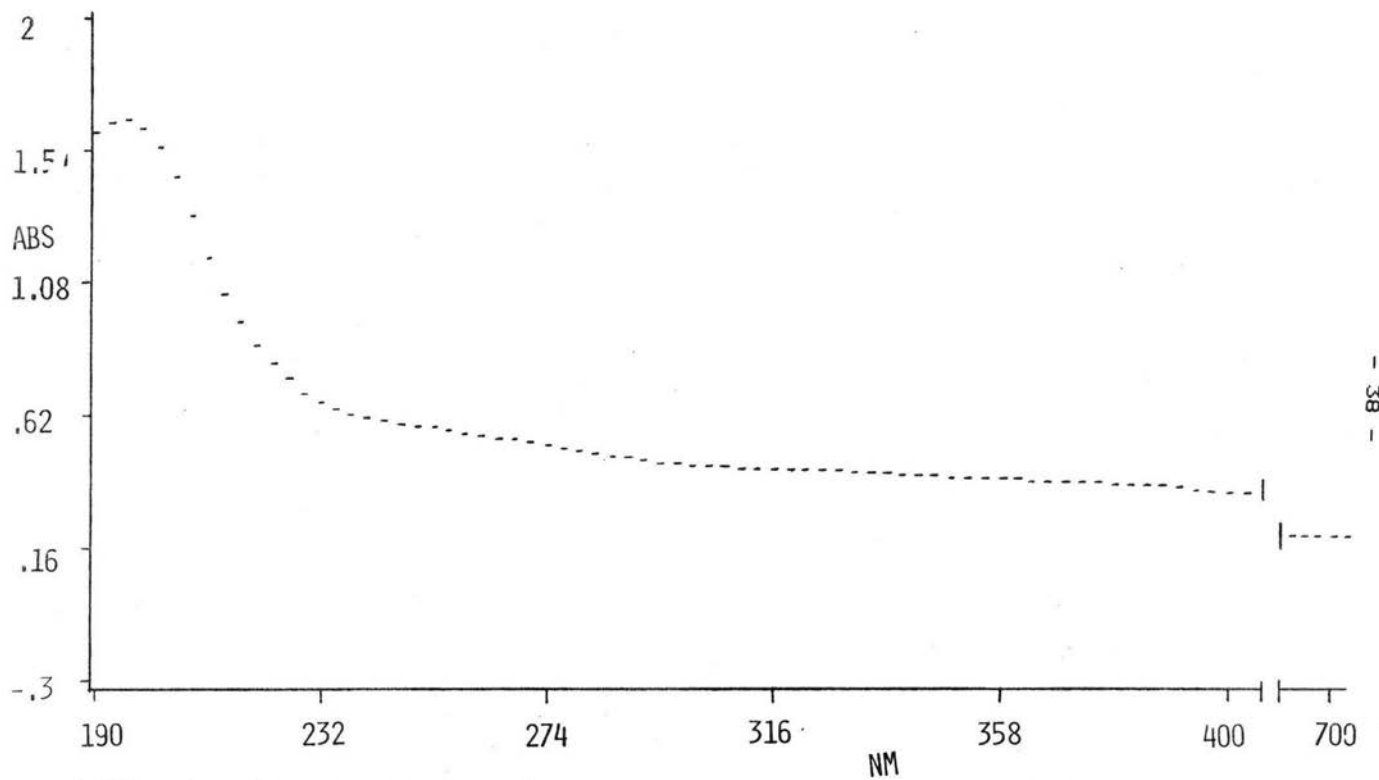
La melanina obtenida de cabello humano al final del proceso presentó el aspecto de un polvo muy fino de color negro.

V) ESTUDIO FISICO Y QUIMICO DE LOS PIGMENTOS.

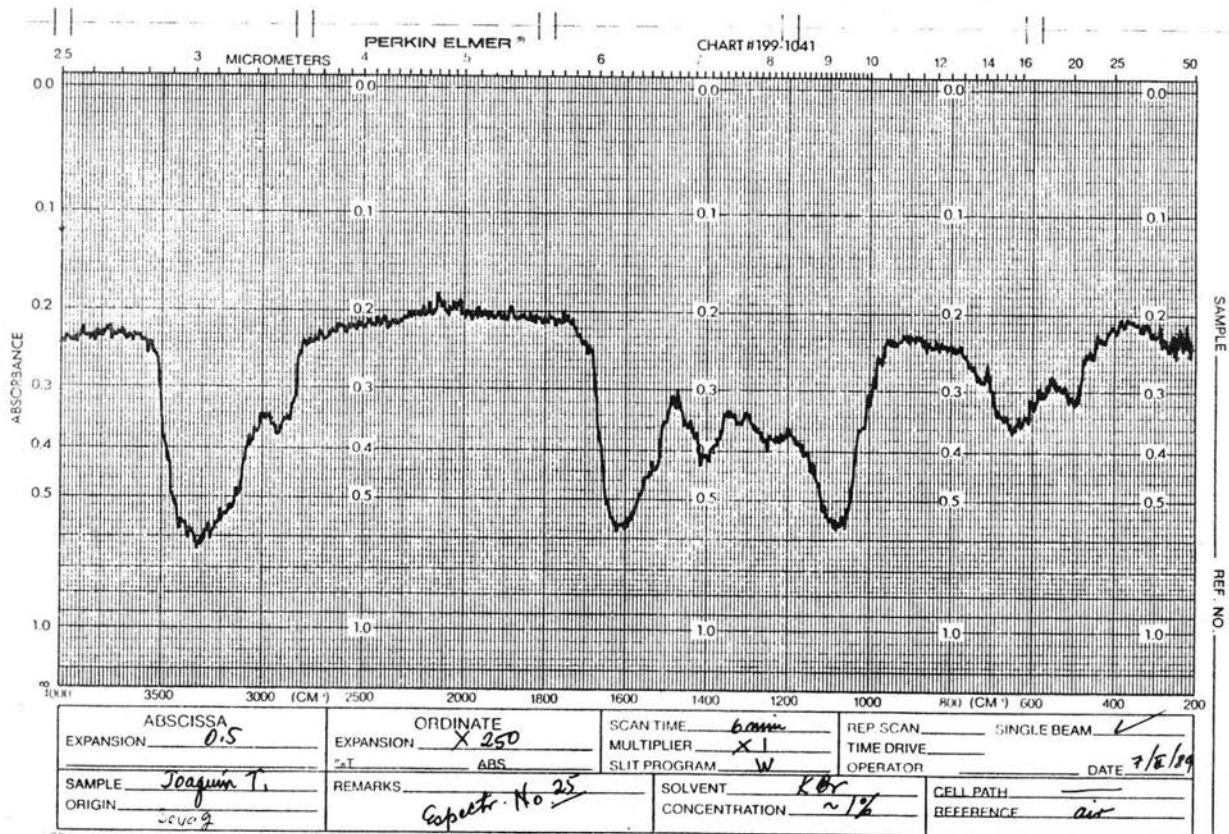
1.- Determinación del espectro de absorción de los tres pigmentos

En las gráficas de los espectros de absorción en radiación UV y visible de los pigmentos purificados por los métodos de Sevag mod. (gráfica 1) y Blackberg-Wanger y la melanina. Se encontró una curva descendente en la que no existen picos característicos, este comportamiento es igual al que se presenta en las melaninas ya reportadas.

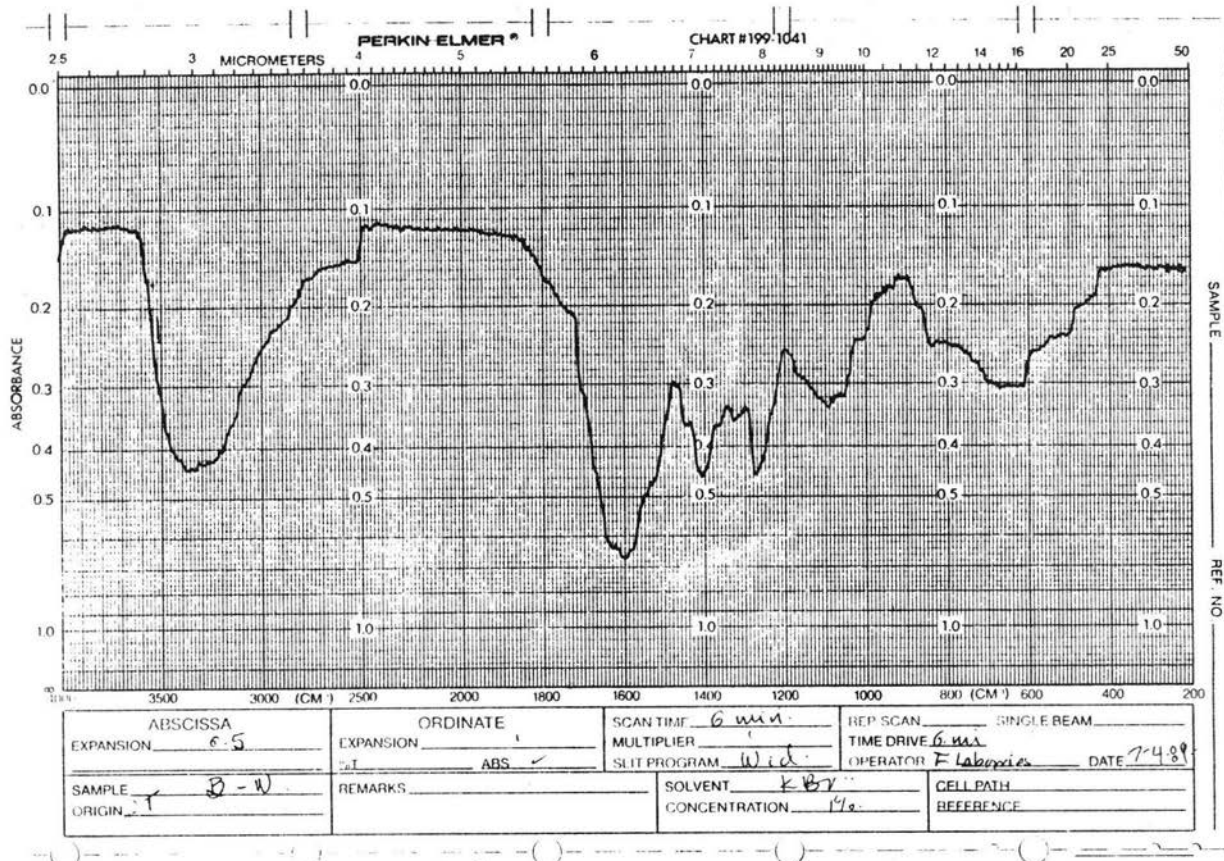
Las gráficas 2,3 y 4 corresponden a los espectros en infrarrojo, donde se observa que los pigmentos purificados por los métodos de Sevag mod y Blackberg-Wanger presentan picos similares; la primera zona de absorción se localiza entre 3300 y 3400 cm^{-1} que posiblemente pertenezca a un grupo $-\text{COOH}$. El segundo pico



Gráfica 1.- Espectro de absorción en luz visible y ultravioleta del pigmento purificado por el método de Sevag modificado.

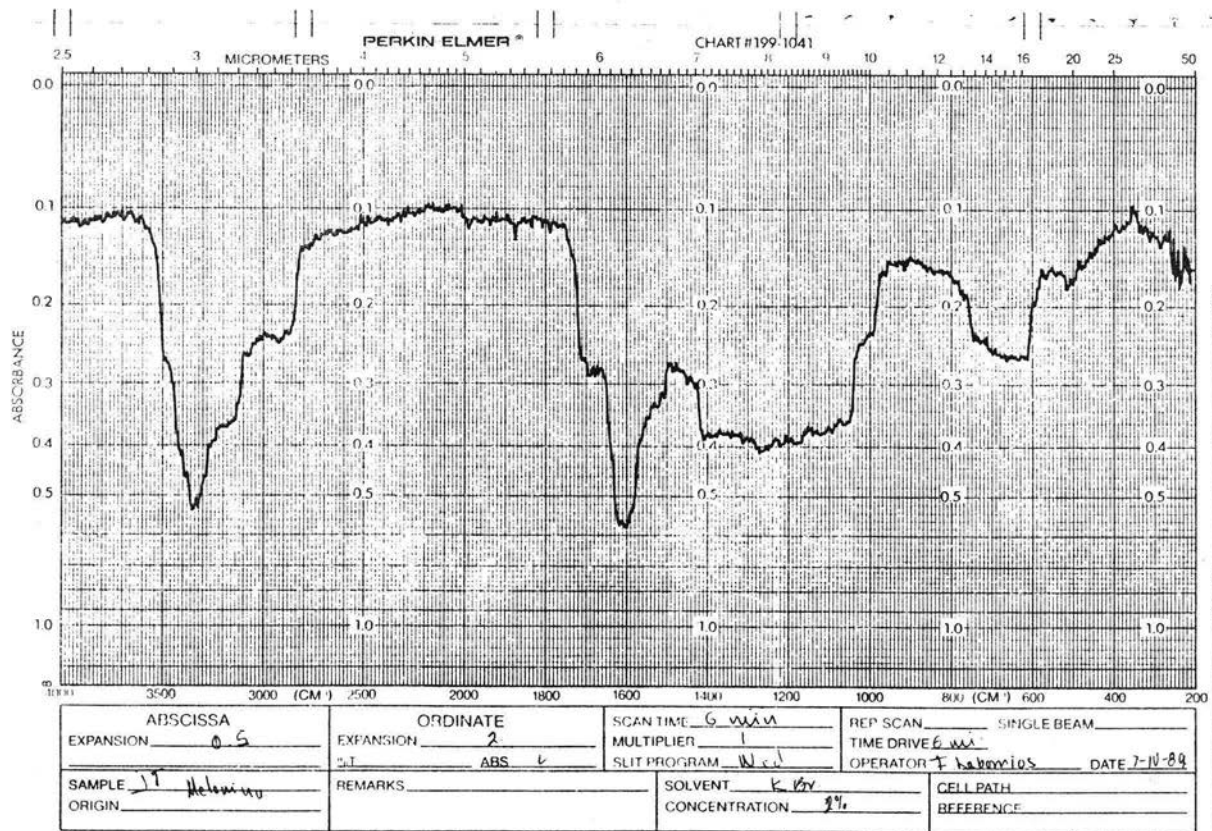


Gráfica 2.- Espectro en infrarrojo del pigmento purificado por el método de Sevag modificado.



SAMPLE REF. NO.

Gráfica 3.- Espectro en infrarrojo del pigmento purificado por el método de Blackberg-Wanger.



Gráfica 4.- Espectro en infrarrojo de la melanina de cabello humano.

está entre 1620 y 1580 cm^{-1} el cual corrobora el grupo $-\text{COOH}$, pero su corrimiento hacia 1600 cm^{-1} indica que puede estar conjugado a un grupo carbonilo lo que daría el siguiente arreglo $\text{O}=\text{C}-\text{COOH}$, o también podría estar unido a un grupo amida que podría dar la siguiente estructura $\text{O}=\text{C}-\text{NR}$.

Con respecto a la melanina solo se pueden interpretar dos picos, uno en 3400 cm^{-1} que corresponde a grupos OH y otro en 1400 cm^{-1} que indica grupos amida.

2.- En la tabla 12 se comparan las características físicas y químicas de los tres pigmentos purificados con las de la melanina.

Como se observa los tres pigmentos estudiados presentan características iguales a las reportadas para las melaninas, con excepción del pigmento purificado por el método de Sevag mod., el cual es soluble en agua.

3.- Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Los resultados de contenido de proteínas para los tres pigmentos son los siguientes:

Sevag mod.	0.029 mg/gr de pigmento.
Blackberg-Wanger	0.021 mg/gr de pigmento.
Melanina	0.017 mg/gr de pigmento.

Tabla 12. Comparación de las características físicas y químicas de los pigmentos purificados contra la melanina.

Propiedad	Pigmento purificado			
	Melanina ¹	Sevag	B-W*	Melanina
Solubilidad en agua	-	+	-	-
Solubilidad en metanol	-	-	-	-
Solubilidad en butanol a pH 1.5 y 10.5	-	-	-	-
Color	café-negro	café-negro	café-negro	café-negro
Solubilidad en KOH y NaOH 1 M	+	+	+	+
Precipitación del pigmento con HCl	+	+	+	+
Solubilidad en solventes orgánicos	-	-	-	-
Decoloración con agentes oxidantes	+	+	+	+
Reacción para polifenoles con FeCl ₃	+	+	+	+
Espectro de absorción (190-700)	SPC	SPC	SPC	SPC

*= Blackber-Wanger.

-= Negativo.

SPC= Sin pico característico

! = Referencias 9 y 16

+ = Positivo

4.- Estimación del peso molecular del pigmento.

El peso molecular se obtuvo a partir del pigmento purificado por el método de Sevag mod. del cual se obtiene un producto que conserva las características de solubilidad originales del pigmento. Se utilizaron columnas de Sephadex G-25 y G-100.

En la columna de Sephadex G-25, las proteínas y el pigmento salieron en el volumen vacío. El intervalo de exclusión para proteínas de este Sephadex está entre 1000 y 5000 daltones de peso molecular, por lo que la molécula del pigmento pesa más de 5000 daltones.

Mientras que en la columna de Sephadex G-100 salió en un volumen mayor que todas las proteínas usadas, lo que quiere decir que es de peso molecular menor, la proteína patrón de menor peso fue la Tripsina (PM 24,000).

Con estos resultados podemos decir que el peso del pigmento se encuentra entre 5000 d y 24,000 d.

Esto no se puede asegurar completamente porque los pesos de referencia se hicieron con proteínas, y el pigmento al no ser una proteína puede comportarse diferente en la columna de Sephadex.

DISCUSSION

DISCUSION

De la muestra de aguas de producción del pozo Hallazgo 65-8 se aislaron dos cepas, una no pigmentada y otra pigmentada. Este trabajo se enfocó al estudio de esta última ya que el conocimiento de los pigmentos bacterianos está reducido a unas pocas especies, como *Serratia marcescens*, *Corynebacterium* (6), *Pseudomonas aeruginosa* (13) y *Bacterium salmonicida* (12) principalmente.

A las 24 h de incubación la colonia que se aisló es de color crema-amarillenta, irregular y de elevación pulvinada por la formación de una vejiga llena de líquido muy viscoso (probablemente un polisacárido). A las 48 h, las colonias ya presentan el pigmento y son de color café-grisáceo, planas y de superficie muy rugosa. Este último hecho puede ser debido a la evaporación del agua del líquido viscoso, o posiblemente a la producción de una despolimerasa que actúa sobre el polisacárido, para la posterior utilización de sus componentes en el metabolismo de la bacteria. Mientras tanto, el medio de cultivo que rodea a las colonias va cambiando su color a negro debido al pigmento soluble que difunde fácilmente.

Las principales pruebas bioquímicas que nos

permitieron identificar a la cepa como *Bacillus subtilis* fueron: crecimiento en aerobiosis, producción de catalasa, Voges-Proskauer e hidrólisis del almidón (3,21). En un estudio taxonómico más amplio se recomienda hacer estudios de la proporción Guanina-Citocina, homologías de DNA y susceptibilidad a fagos.

Con relación al efecto a las condiciones del cultivo vemos que no existe efecto de la luz sobre la producción del pigmento, esto no descarta la posibilidad de que otra longitud de onda como la UV o cercana al visible tenga algún efecto. Schlegel (1986) (23) sugiere que algunos pigmentos protegen a las células de la actividad nociva de la luz. Para saber si el pigmento cumple este papel en las células de la cepa Hallazgo 65-8 negra, se puede obtener una mutante apigmentada y comparar su resistencia a la luz visible o radiación ultravioleta con respecto a la cepa silvestre.

La agitación es un factor que influye notablemente en la producción del pigmento, dependiendo de la composición del medio en que se siembre, ya que con extracto de levadura la cepa no pigmenta a 75 y 200 rpm, y a 125 rpm pigmenta después de incubarse mucho tiempo

(144 h). Sin embargo en el medio sin extracto de levadura no hubo cambio y la cepa pigmentó normalmente. La agitación provoca una mayor oxigenación en el cultivo y se ha visto que esto favorece la producción de algunos pigmentos microbianos como el de *Bacterium salmonicida* (12). Sin embargo, para *B. subtilis* Hallazgo 65-8 negra la aereación en condiciones específicas inhibe la síntesis del pigmento, este hecho es digno de estudios posteriores por no encontrarse reportado en trabajos realizados en otros pigmentos.

La cepa de *B. subtilis* Hallazgo 65-8 negra es halotolerante, al igual que otras bacterias del mismo género aisladas de pozos petroleros (14). La cepa pigmentada puede crecer bien en un medio de cultivo simple con una concentración del 8% de NaCl y en esta misma concentración el pigmento también se produce, aunque transcurre más tiempo del normal. En la bibliografía se reporta que la salinidad es un factor importante para la producción de pigmentos en éste género (21), sin embargo esto no se observa con nuestra cepa, ya que la presencia o ausencia de sal no impide la producción del pigmento.

De las fuentes de carbono probadas el microorganismo

puede utilizar 6 de ellas y con todas producir el pigmento. Con la glucosa el pigmento y la esporulación se produce antes de las 24 h, probablemente porque la bacteria tiene una mayor velocidad específica de crecimiento con este sustrato, y llega más rápido a la fase estacionaria.

Los investigadores que han estudiado las melaninas o pigmentos negros y sus precursores se enfocan principalmente en la influencia que tiene la tirosina sobre estos. Han encontrado que al estar presente en los cultivos aumenta la cantidad del pigmento o favorece su producción (2,12,17). Con la cepa la tirosina se probó como fuente de nitrógeno, en un medio simplificado, pero es incapaz de utilizarla. Por lo que pensamos que la tirosina no influye en la formación del pigmento, ni es parte constituyente de la molécula.

En estudios posteriores se puede probar la influencia de otros aminoácidos o compuestos inhibidores de pigmentos melaninicos como el Tricyclazole (4) o el p-Benzoyloxy-fenol (17) sobre la producción del pigmento.

La mayoría de las bacterias pigmentadas requieren de medios, sustancias o condiciones específicas que

favorezcan la producción del pigmento, como por ejemplo ausencia o presencia de sales o aminoácidos, cambios en la temperatura de incubación o agitación, (12,13). Por el contrario nuestra cepa no requiere ningún factor especial.

Por medio de modificaciones hechas al medio Czapek, se llegó a un medio mínimo constituido de NaN_3 , K_2HPO_4 y sacarosa en el que la cepa es capaz de producir pigmento.

En la zona de los cultivos donde se encuentra más concentrado el crecimiento es donde se produce primero el pigmento, debido posiblemente a que en dicha zona se alcanza más rápidamente la fase estacionaria de crecimiento, por lo que se inicia la esporulación y la síntesis de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran la mayoría de los pigmentos. Se reporta que en *Bacillus subtilis* la producción de pigmentos negros está relacionada con la esporulación, pero existen excepciones a esto y se han encontrado cepas pigmentadas que no tienen una buena esporulación (2). Sin que lo que hemos observado sea una evidencia contundente la esporulación y la producción de pigmento en nuestra cepa parece estar relacionada, ya que en los culti-

vos donde se está iniciando la producción del pigmento se observan muchos bacilos y algunas esporas, mientras que en los cultivos ya pigmentados se vé gran número de esporas y muy pocos bacilos. En nuestro caso, es importante mencionar que en los cultivos en que no se produce el pigmento se encuentran muy pocas esporas o están ausentes. Por lo que pensamos que posiblemente una mutante apigmentada será incapaz de esporular adecuadamente.

En la cepa de *Bacillus subtilis* 168 L-4 estudiada por Barnett y col 1983 (1,2), los pigmentos se sintetizan extracelularmente ya que al eliminar las células en el inicio de la fase estacionaria el pigmento se sigue formando, lo que indica que sus precursores se liberan y acumulan en el medio durante la fase logarítmica de crecimiento. Al parecer en la cepa de *Bacillus subtilis* Hallazgo 65-8 es similar ya que al extraer las células del cultivo cuando el pigmento se comienza a observar, éste sigue aumentando su color hasta llegar casi a negro.

De los pigmentos purificados la única diferencia que se encontró fue con el purificado por el método de Sevag, el cual es soluble en agua, característica

que no corresponde a las melaninas. Sin embargo el resto de sus características son iguales a la melanina.

Los tres pigmentos purificados cumplen las cuatro propiedades con las que se identifican las melaninas esta son: insolubilidad en solventes orgánicos, decoloración con agentes oxidantes, reacción positiva para polifenoles y espectro de absorción sin picos característicos (9).

De la interpretación de los espectros de infrarrojo , solo se puede decir que las bandas de absorción en ambos pigmentos se debe a la presencia de los mismos grupos químicos, lo cual no implica necesariamente la misma estructura. Posiblemente las bandas observadas corresponden a la parte cromófora de la molécula principalmente.

Del espectro de la melanina no se puede obtener información sobre su estructura.

De los resultados obtenidos en la cuantificación de proteínas no podemos asegurar que todo pertenezca a éstas. Posiblemente parte de la absorbancia se deba al propio color del pigmento o a que la molécula de este interfiera con los reactivos de la técnica. Una de las reacciones es la del cobre con los grupos aminos de

las proteínas; y probablemente el pigmento tenga estos radicales, con lo que la reacción colorida no se debería totalmente a las proteínas.

De acuerdo con los resultados, el pigmento posee la mayoría de las características de la melanina, pero existen diferencias. Por lo mismo, no podemos concluir que se trate de una melanina como tal, pero posiblemente pertenezca a un grupo de compuestos similares.

Para seguir las investigaciones y complementar el trabajo se debe buscar una técnica de purificación (electroforésis o cromatografía) que asegure obtener la molécula pura y con esto aplicarle resonancia magnética nuclear y poder dilucidar su estructura.

Como se ha visto en las sugerencias hechas en la discusión, a partir de este trabajo se pueden tomar numerosos caminos en el estudio de este pigmento, los cuales pueden estar dirigidos a la regulación y producción o a la naturaleza y composición química del pigmento.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La cepa se identificó como *Bacillus subtilis* y se le llamó *B. subtilis* Hallazgo 65-8 negra.
- 2.- El pigmento se produce en medios sintéticos simples y los medios complejos inhiben su síntesis.
- 3.- El medio mínimo donde se produce pigmento contiene NaNO_3 , K_2HPO_4 y sacarosa.
- 4.- Las condiciones óptimas para la producción del pigmento son: cultivo estacionario en medio Czapek modificado a 37°C , pH 7 e incubación de 48 a 72 h.
- 5.- El pigmento purificado por el método de Sevag sigue siendo soluble en agua, mientras que el purificado por Blackberg-Wanger pierde esta capacidad.
- 6.- El pigmento purificado por Sevag tiene un peso molecular entre 5000 y 24,000 d.
- 7.- El pigmento de la cepa *B. subtilis* Hallago 65-8 negra presenta características físicas, químicas y espectrofotométricas semejantes a la melanina.

A P E N D I C E

APENDICE

Composición del medio Czapek modificado:

Nitrato de sodio	3.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Cloruro de potasio	0.5 g
Sulfato ferroso	0.01 g
Sacarosa	60.0 g
Cloruro de sodio	50.0 g
Extracto de levadura	10.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Barnett, T.A., and J.H. Hageman. 1983. Characterization of a brown pigment from *Bacillus subtilis* cultures. *Can. J. Microbiol.* 29:309-315.
- 2.- Barnett, T.A., D. Valenzuela, S. Riner, and J.H. Hageman. 1983. Production by *Bacillus subtilis* of brown sporulation-associated pigments. *Can. J. Microbiol.* 29:96-101.
- 3.- Buchanan and Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8a edición. Baltimore, E.U.A pp.529-533.
- 4.- Butler, M.J. and M.A. Lachance. 1987. Inhibition of melanin synthesis in the black yeast *Phaeococomyces* sp by growth on low pH ascorbate medium: production of spheroplasts from "albinized" cells. *Can. J. Microbiol.* 33:184-187.
- 5.- Cowan, S.T. and K.J. Steel. 1973. *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press. Gran Bretaña. pp.45-46,55,58.
- 6.- Cruz Camarillo, R. 1972. Características estructurales y posible papel biológico del complejo glicoproteína-prodigiosina en *Serratia marcescens*. Tesis doctoral ENCB-IPN.
- 7.- Cubo, M.A., Buendia-Claveria, A.M. 1988. Melanin pro-

- duction by *Rhizobium* strains. App. and Environmental Microbiol. 54:1812-1817.
- 8.- Demain, A.L. and J.M. Piret. 1981. Microbiology. Ed. by David Schlessinger. American Society for Microbiology. Wash. D.C. pp.363-366.
- 9.- Ellis, D.H. and D.A. Griffiths. 1974. The location of melanins in the cell walls of soil fungi. Can. J. Microbiol. 20:1379-1386.
- 10.- ENCB. 1978. Curso experimental de métodos analíticos especiales. Depto. de Bioquímica. pp.44-47, 67-71.
- 11.- Fox, D.L. and K.P. Kuchnow. 1965. Reversible, Light-screening pigment of Elasmobranch eyes: chemical identity with melanin. Science 150:612-614.
- 12.- Griffin, P.J., S.F. Snieszko y S.B. Friddle. 1953. Pigment formation by *Bacterium salmonicida*. J. of Bacteriology 65:652-659.
- 13.- Hassan, M.H. and I. Fridovich. 1980. Mechanism of the Antibiotic of Pyocyanine. J. of Bacteriology 141:156-163.
- 14.- Hinojosa R.E. y col. 1985. Aislamiento de microorganismos del género *Bacillus* de agua de producción de pozos petroleros en Poza Rica, Ver. Resu-

- menes XVI Congreso Nacional de Microbiología.
pp.39.
- 15.- Lakshmi, S. and C.A. Neyra. 1987. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. *J. of Bacteriology* 169:1670-1677.
 - 16.- Lozano, S.A. 1985. Pigmentos y Radiaciones. Investigación y Ciencia. 105:42-44.
 - 17.- Mencher, J.R. and A.H. Heim. 1962. Melanin Biosynthesis by *Streptomyces lavendulae*. *J. Gen. Microbiol.* 28:665-670.
 - 18.- Mesta Howard, A.M. 1980. *Klebsiella pneumoniae* como agente patógeno. Tesis doctoral. ENCB-IPN. pp.36-40.
 - 19.- Nicolaus, R.A., M. Plattelli and E. Fattorusso. 1964. The structure of melanins and melanogenesis IV. On some natural melanins. *Tetrahedron* 20:1163-1172.
 - 20.- Nicolaus, R.A. 1969. Melanins. Herman. Paris. *Op cit* 9.
 - 21.- Norris, J.R. et al 1981. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus* En "The Prokaryotes". Starr, P.M., H. Stolp, H.G. Trupper, A. Ballows and Shllegel, Eds. Alemania. Vol. II cap 135. pp.1711-1717, 1730-1731.

- 22.- Sánchez Sánchez, A. 1986. Detección de plásmidos que codifican para la resistencia a altas concentraciones de plata, en bacterias. Tesis de licenciatura. FES-Cuautitlán.
- 23.- Schlegel, H.G. 1986. General Microbiology. 6a. edición. Cambridge University Press. Gran Bretaña. pp. 76-80.
- 24.- Singh, B.N. 1942. Toxic effects of certain bacterial metabolic products on soil protozoa. Nature (London) 149:168. *Op cit* 8.
- 25.- Weber, Darrell, W.M. Hess. 1976. The fungal spore form and function. Wiley Interscience. E.U.A. pp.42.
- 26.- Wheeler, M.H., W.J. Tolmsoff and S. Meola. 1976. Ultrastructure of melanin formation in *Verticillium dahliae* with (+)-scytalone as a biosynthetic intermediate. Can. J. Microbiol. 22:702-711.
- 27.- Wheeler, M.H., W.J. Tolmsoff, A.A. Bell and H.H. Mollenhauer. 1978. Ultrastructural and chemical distinction of melanins formed by *Verticillium dahliae* from (+)-scytalone, 1,8-dihydroxyphthalene catechol, and L-3,4-dihydroxyphenilalanine. Can. J. Microbiol. 24:289-297.