



**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS**

**PROFESOR PATROCINANTE**

Dr. Eduardo Valenzuela F.  
Instituto de Microbiología  
Facultad de Ciencias

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA DE PIGMENTOS OBTENIDOS DESDE CEPAS DEL GÉNERO  
*Chromobacterium, Flavobacterium, Flexibacter Y Micrococcus.***

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar al  
grado de **Licenciado en Ciencias  
Biológicas.**

**PATRICIA ELENA PUENTE OPAZO**

**Valdivia – Chile**

**2007**

*Dedico éste trabajo a mis padres, por su apoyo  
e incondicional cariño, y a mi hija Fernanda  
por llegar a ser la luz de mi vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Proyecto DID-S-2005-54 por el financiamiento de ésta tesis.

Al Dr. Eduardo Valenzuela, por su gran apoyo, su sabiduría y su incondicional paciencia, por ayudarme a lograr éste éxito.

Al profesor Juan Carlos Paredes, por su tiempo y buena disposición para ayudarme.

A Óscar, por brindarme su ayuda, siempre incondicional y valiosa.

A Karin, por ser una gran compañera y amiga, por estar en los momentos que más los necesité.

A Sandra, a pesar de que las cosas no sean como antes, te agradeceré siempre por haber sido mi apoyo, en aquellos momentos que marcaron mi vida para siempre.

A mis padres Sergio y Elena, por confiar siempre en mí, por sus sacrificios y su apoyo que me brindaron siempre, sobre todo en los momentos más difíciles, soy lo que soy gracias a ustedes.

A la Cata, por tu alegría contagiosa, que más de alguna vez me levantó, y me sirvió para seguir.

A Patricio, por su amor y compañía.

Finalmente no puedo olvidar a Dios, que es el que me brindó esta vida y todo lo valioso que tengo a mi lado.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| 1. RESUMEN  | 1           |
| SUMMARY   | 1           |
| 2. INTRODUCCIÓN   | 2           |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS   | 9           |
| 3.1 MATERIALES  | 9           |
| 3.1.1 Biológico   | 9           |
| 3.1.2 Reactivos   | 9           |
| 3.1.3 Equipos   | 10          |
| 3.1.4 Otros   | 10          |
| 3.2 MÉTODOS   | 10          |
| 3.2.1 Masificación de las cepas bacterianas pigmentadas   | 10          |
| 3.2.2 Obtención de las masas bacterianas secas de las cepas pigmentadas   | 11          |
| 3.2.3 Determinación mediante antibiograma de la capacidad antimicrobiana de las masas bacterianas secas de bacterias pigmentadas      | 12          |
| 3.2.4 Caracterización química y física de la masa bacteriana seca de la cepa pigmentada seleccionada                                  | 13          |
| 3.2.5 Purificación de la masa bacteriana seca de la cepa bacteriana seleccionada  | 15          |
| 3.2.6 Separación del pigmento de acuerdo a su solubilidad   | 15          |
| 3.2.7 Determinación de la pureza de las fracciones obtenidas del pigmento de la cepa seleccionada mediante cromatografía de capa fina | 16          |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.2.8 | Antibiograma de las fracciones obtenidas del pigmento de la cepa seleccionada  | 17 |
| 3.2.9 | Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Letal Media (CLM) y Concentración Letal (CL) de la masa bacteriana seca de la cepa pigmentada seleccionada | 17 |
| 4.    | RESULTADOS   | 19 |
| 4.1   | Actividad antimicrobiana de las masa bacterianas secas obtenidas   | 19 |
| 4.2   | Caracterización química y física de la masa bacteriana seca de la cepa pigmentada seleccionada   | 19 |
| 4.3   | Purificación de la masa bacteriana seca de la cepa bacteriana seleccionada   | 23 |
| 4.4   | Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Letal Media (CLM) y Concentración Letal (CL) de la masa bacteriana seca de la cepa pigmentada seleccionada | 25 |
| 5.    | DISCUSIÓN  | 26 |
| 5.1   | CONCLUSIONES   | 31 |
| 6.    | LITERATURA CITADA  | 32 |
| 7.    | ANEXOS   | 38 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| Tabla 1. Especies de microorganismos desde los cuales se han obtenido productos antibacterianos y antifúngicos que se usan actualmente | 3           |
| Tabla 2. Solubilidad de las masas bacterianas secas de <i>Chromobacterium</i> en diferentes solventes polares y apolares               | 20          |
| Tabla 3. Estabilidad de las masas bacterianas secas de <i>Chromobacterium</i> a diferentes puntos de pH                                | 20          |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| Figura 1. Masas bacterianas secas obtenidas de cada cepa de géneros bacterianos pigmentados 1. <i>Micrococcus</i> . 2. <i>Flexibacter</i> . 3. <i>Flavobacterium</i> . 4. <i>Chromobacterium</i> .   | 11          |
| Figura 2. Halos de inhibición producidos por alícuota de la masa seca de <i>Chromobacterium</i> en tapices de las cepas controles (desde izquierda a derecha): <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Cándida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> | 19          |
| Figura 3. Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> a pH 12, 13 y 14   | 22          |
| Figura 4. Espectro de UV/visible de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> , frente a diferentes rangos de temperatura   | 23          |
| Figura 5. Cromatografía de capa fina de las fracciones obtenidas de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> , vista bajo lámpara UV   | 24          |
| Figura 6. Cromatografía de capa fina de las fracciones de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> , revelada con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 30%  | 24          |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| ANEXO 1. Preparación de medios de cultivo  | 39          |
| ANEXO 2. Tablas de Absorbancias en relación a diferentes longitudes de onda  | 41          |
| Tabla 1. Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 1 frente a diferentes longitudes de onda | 41          |
| Tabla 2. Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 2 frente a diferentes longitudes de onda | 41          |
| Tabla 3. Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 3 frente a diferentes longitudes de onda | 42          |
| Tabla 4. Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 4 frente a diferentes longitudes de onda | 42          |
| Tabla 5. Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 5 frente a diferentes longitudes de onda | 43          |
| Tabla 6. Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 6 frente a diferentes longitudes de onda | 43          |
| Tabla 7. Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 7 frente a diferentes longitudes de onda | 44          |
| Tabla 8. Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 8 frente a diferentes longitudes de onda | 44          |



|           |   | <b>Pág.</b> |
|-----------|---|-------------|
| Tabla 9.  | Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 9 frente a diferentes longitudes de onda                 | 45          |
| Tabla 10. | Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 10 frente a diferentes longitudes de onda                | 45          |
| Tabla 11. | Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 11 frente a diferentes longitudes de onda                | 46          |
| Tabla 12. | Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 12 frente a diferentes longitudes de onda                | 46          |
| Tabla 13. | Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 13 frente a diferentes longitudes de onda                | 47          |
| Tabla 14. | Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> en solución a pH 14 frente a diferentes longitudes de onda                | 47          |
| Tabla 15. | Absorbancia de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> , frente a diferentes rangos de temperatura, a 570 nm de longitud de onda | 48          |

|            |  | <b>Pág.</b> |
|------------|--|-------------|
| ANEXO 3.   | Gráficos de espectros de UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> desde PH 1 al pH 11 | 49          |
| Figura 1.  | Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> a pH 1                   | 49          |
| Figura 2.  | Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> a pH 2                   | 50          |
| Figura 3.  | Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> a pH 3                   | 50          |
| Figura 4.  | Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> a pH 4                   | 51          |
| Figura 5.  | Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> a pH 5                   | 51          |
| Figura 6.  | Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> a pH 6                   | 52          |
| Figura 7.  | Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> a pH 7                   | 52          |
| Figura 8.  | Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> a pH 8                   | 53          |
| Figura 9.  | Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> a pH 9                   | 53          |
| Figura 10. | Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de <i>Chromobacterium</i> a pH 10                  | 54          |

Figura 11. Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 11

54

## 1. RESUMEN

En el presente estudio, se determinó la actividad antimicrobiana de masas secas de las bacterias marinas pigmentadas *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* y *Micrococcus*, sobre tapices de las cepas controles *Bacillus subtilis* (ATCC 6639), *Cándida albicans* (ATCC 9002), *Escherichia coli* (ATCC 25922), y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Se determinó que la masa bacteriana seca de *Chromobacterium* fue la única que presentó actividad inhibitoria sobre todas las cepas controles. La masa seca bacteriana de *Chromobacterium* es poco soluble en agua, soluble en metanol, muy soluble en dimetilsulfóxido e insoluble en cloroformo. Mantiene la estabilidad del color a temperaturas de 0 °C hasta 100 °C, y pH 1 a pH 11. La purificación de la masa bacteriana seca de *Chromobacterium*, dio como resultado la obtención de 3 fracciones, que no presentaron actividad antimicrobiana frente a las cepas controles.

## SUMMARY

In the present study, the antimicrobial activity of dry masses of the marine bacteria pigmented *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* and *Micrococcus* was determined, on carpets of the controls strains *Bacillus subtilis* (ATCC 6639), *Cándida albicans* (ATCC 9002), *Escherichia coli* (ATCC 25922), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). The dry bacterial mass of *Chromobacterium* is the only one that showed inhibiting activity on all the strains controls. The bacterial dry mass of *Chromobacterium* is slight soluble in water, soluble in metanol, very soluble in dimetilsulfóxido and insoluble in chloroform. It shows color stability between 0 °C and 100 °C and all over the range o pH between 1 and 11. The three fractions obtained from the bacterial mass of *Chomobacterium* did not showed antimicrobial activity toward control strains.

## 2. INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos años, los microorganismos han sido siempre objeto de estudios como productores de sustancias antibacterianas; sin embargo, también son considerados productores de sustancias antifúngicas, antivirales, antiparasitarias, citotóxicas e inhibitorias de otras formas de crecimiento celular (Pellón *et al*, 2001). Productos de origen natural son usados como fuente medicinal en el tratamiento de enfermedades de animales incluyendo el ser humano, desde tiempos inmemoriales (Pitlovanciy, 2005), lo que ha permitido reducir su mortalidad y controlar su propagación. El descubrimiento de sustancias con poder antimicrobiano y la investigación, así como el desarrollo de nuevos antibióticos semisintéticos, han adquirido un gran valor en la terapia médica (Schlegel, 1997). A principios del siglo XX, las enfermedades infecciosas y parasitarias constituían las principales causas de mortalidad de la población del planeta (Salvatierra & Benguigui, 2000). El primer antibiótico obtenido a partir de un microorganismo utilizado con fines terapéuticos fue la penicilina, obtenida a partir de un hongo llamado *Penicillium notatum*, descubierta en 1929 por Alexander Fleming (Ingraham, 1998). A partir de este descubrimiento, se inició una intensa búsqueda de microorganismos capaces de producir sustancias de interés biomédico. En el último siglo, sin embargo, ha habido un aumento en el rol que juegan los microorganismos en la producción de antibióticos y de otras drogas para el tratamiento de algunas enfermedades (Cragg & Newmann, 2001).

Varios antibióticos activos frente a organismos procariontes son también producidos por procariontes (Madigan *et al*, 1998). A continuación en la Tabla 1, se indican algunas especies de

microorganismos desde las cuales se han obtenido productos antibacterianos y antifúngicos que se usan actualmente.

**Tabla 1.** Especies de microorganismos, desde los cuales se han obtenido productos antibacterianos y antifúngicos que se usan actualmente.

| <b>Microorganismo</b>                              | <b>Antibiótico</b> | <b>Año de descubrimiento</b> |
|--|--------------------|------------------------------|
| <i>Penicillium notatum</i> - <i>P. chrysogenum</i> | Penicilina         | 1929                         |
| <i>Streptomyces grieseus</i>                       | Estreptomicina     | 1944                         |
| <i>Bacillus lincheniformis</i>                     | Bacitracina        | 1945                         |
| <i>Streptomyces venezuelae</i>                     | Cloramfenicol      | 1947                         |
| <i>Cephalosporium acremonium</i>                   | Cefalosporina      | 1948                         |
| <i>Streptomyces fradiae</i>                        | Neomicina          | 1949                         |
| <i>Streptomyces erythraeus</i>                     | Eritromicina       | 1952                         |
| <i>Fusidium coccineum</i>                          | Fucidanina         | 1960                         |
| <i>Micromonospora monopores</i>                    | Gentamicina        | 1963                         |
| <i>Streptomyces tenebraeus</i>                     | Tobramicina        | 1968                         |

Los océanos poseen la mayor riqueza filogenética sobre la tierra, presentando el mayor número de animales, plantas y microorganismos (Jensen & Fenical, 1994, Mancilla, 2003 citado por Fuenzalida 2006). El mundo marino es considerado una enorme fuente de recursos, como los antibióticos producidos en forma natural, podrían ser de gran utilidad en el control de enfermedades tanto en acuicultura como en enfermedades humanas (León & Tapia, 1999). Los microorganismos marinos han recibido particular atención en las últimas décadas como fuentes de nuevos recursos biomédicos (Kelecom, 2002). Muchos microorganismos marinos han sido considerados productores de sustancias biológicamente activas (Pellón *et al*, 2001). Bacterias de origen acuático con capacidad de producir sustancias antibacterianas tienen amplia distribución en el ecosistema marino (León & García - Tello, 1998). Estos microorganismos han sido aislados de diferentes fuentes marinas, como peces, algas (Avendaño - Herrera *et al*, 2005), agua de mar y

sedimentos (León & García - Tello, 1998; Mancilla, 2003; León *et al*, 2005; Fuenzalida, 2006) e invertebrados (Avendaño - Herrera *et al*, 2005). Se pueden mencionar entre otros: *Alteromonas luteoviolaceus*, reportada por Gauthier & Flatau (1976), como productora de 2 sustancias antimicrobianas, que presentaron actividad contra *Bacillus subtilis*, *B. epidermidis* y *B. firmus*. Según Mancilla (2003), *Pseudomonas* sp., que fue aislada a partir de agua y sedimentos marinos, presentó actividad contra *B. subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, mientras que *Actinomyces* sp., presentó actividad contra *B. subtilis* y *Candida albicans*. León & García - Tello (1998), por su parte demostraron la actividad inhibitoria de *Alteromonas* sp., contra bacterias patógenas de peces y moluscos, pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*.

Aguas y sedimentos marinos del litoral de la costa Valdiviana serían un importante reservorio de bacterias antagónicas, constituyendo una fuente potencial de nuevos agentes antimicrobianos (Mancilla, 2003). Dentro de estos microorganismos se encuentran bacterias marinas, productoras de pigmentos, también denominadas bacterias cromógenas (Fuenzalida, 2006). Muchas colonias bacterianas llaman la atención por su característica coloración, ya sea, por la excreción de un colorante al medio o por la pigmentación de las células. La capacidad de sintetizar sustancias coloreadas está determinada genéticamente y es por tanto una característica de la especie microbiana en particular (Schlegel, 1997).

Los pigmentos de los microorganismos son metabolitos secundarios, se caracterizan por no ser esenciales para el crecimiento del microorganismo y por producirse a través de una mezcla de metabolitos muy similares químicamente. Otros tipos de metabolitos secundarios producidos por bacterias son algunas toxinas, pigmentos y antibióticos. Existen estudios que indican que la

producción de sustancias inhibitorias es un fenómeno común entre bacterias aisladas de los ecosistemas naturales, proporcionando una ventaja competitiva a las bacterias capaces de producirlas sobre aquellas no productoras (Avendaño – Herrera *et al*, 2005). Algo similar mencionan Leiva *et al*, 2004, respecto a que los *Actinomycetes* sp., han desarrollado habilidades estratégicas que les otorgan mayores probabilidades de supervivencia, en relación a un proceso de adaptación al ambiente acuático, entre las cuales, la producción de metabolitos bioactivos contra otras bacterias, hongos y otros organismos es una probabilidad.

La producción de pigmentos en bacterias tiene diversas funcionalidades, por ejemplo, los carotenoides dentro del cual se encuentra el beta caroteno, que además de tener una función fotosintética, presenta una función protectora frente a la radiación UV y luz visible (Schlegel, 1997; Coello *et al* 2003), y protegen a estos organismos contra los efectos tóxicos del oxígeno. En otras bacterias, como *Pseudomonas anguilliseptica* cuando hay deficiencia de hierro, se encuentran pigmentos fluorescentes que participan como sideróforos, en la captación y transporte de este elemento al interior de la célula (Castro *et al*, 2005). Finalmente en *Chromobacterium violaceum* se encuentra la violaceína, un pigmento que fue informado como una potencial droga para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. La violaceína es también eficaz contra la leucemia y células del linfoma (Silva *et al*, 2000). *C. violaceum* es una bacteria de vida libre, aislada comúnmente desde hábitats acuáticos de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Fantinatti - Garboggini, *et al* 2004). De acuerdo a Pitlovanciv (2005), pequeñas cantidades de violaceína presentan actividad muy interesante desde el punto de vista farmacológico. Actualmente existen evidencias de que puede tener una acción antibacteriana y antivírica.



Estudios han determinado que la violaceína ejerce una función protectora frente a las radiaciones solares y de regulación de la concentración de triptófano (Meyer *et al*, 2006).

Bacterias marinas pigmentadas presentarían cepas con mayores potencialidades de producir sustancias inhibitorias contra bacterias patógenas que se encuentran en organismos marinos. Estudios resaltan la actividad antimicrobiana de bacterias del género *Flavobacterium*, además de su actividad antiparasitaria (Pellón *et al*, 2001). Por otra parte, la bacteria marina *Marinomonas mediterranea* posee un rico metabolismo secundario, este microorganismo sintetiza una proteína antimicrobiana de amplio espectro denominada marinocina. Este compuesto podría tener un gran interés en el campo biotecnológico y biofarmacéutico (Lucas - Elio *et al*, 2005).

Los resultados de los estudios de *Alteromonas* sp., *Flavobacterium*., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp y *Vibrio* sp., sobre actividades inhibitorias frente a ictiopatógenos, sugieren que dichas cepas o sus productos podrían ser útiles en el control biológico de patógenos que se desarrollan durante el cultivo intensivo de peces, cultivo de larvas de moluscos y crustáceos de importancia económica (León & García - Tello, 1998). Otra aplicación interesante dada al uso de pigmentos producidos por microorganismos como *Phaffia rhodozyma*, que produce astaxantina (un pigmento) es su inclusión en pellet utilizados en la alimentación de truchas y salmones de criadero, con el objetivo de que la carne incremente su color y así hacer de este producto más apetitoso a la vista del consumidor. Como menciona Veiga - Crespo *et al* (2005), en la industria los pigmentos bacterianos hoy en día tienen un mayor uso, así la especie bacteriana *Gordonia jacobaea* es capaz de sintetizar y acumular grandes cantidades de cantaxantina, un pigmento muy usado en la industria alimentaria y de cosméticos. De esta manera, el uso de pigmentos naturales aislados a partir de microorganismos, comercialmente se esta convirtiendo en un negocio rentable y se ha incrementado en los últimos años (Veiga - Crespo *et al*, 2005).

Debido a la selección y diseminación de poblaciones de microorganismos resistentes, es imperativo buscar nuevos antimicrobianos (González *et al*, 2002) mas eficientes, de mayor espectro y tolerancia para combatirlos (Mancilla, 2003). La resistencia a los antibióticos es la capacidad adquirida por un organismo para resistir los efectos de un antibiótico, ante el cual es normalmente susceptible (Madigan *et al*, 1998), esto es consecuencia, principalmente, de la amplia disponibilidad de antibióticos que son utilizados irracionalmente, repercutiendo en la selección de cepas de microorganismos más resistentes y para cuyo combate se hace indispensable la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos (Pitlovanciv, 2005).

En base a lo expuesto, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

Cepas bacterianas marinas tienen actividad antimicrobiana sobre cepas controles de *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Para aceptar o rechazar la hipótesis, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Masificar bacterias pigmentadas de los géneros *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* y *Micrococcus* en medios de cultivos sólidos y determinar el efecto de las masas bacterianas secas en cultivos de las cepas controles *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Analizar química y físicamente las masas bacterianas secas que presenten capacidad inhibitoria sobre las cepas controles.

- Purificar el pigmento de las masas bacterianas secas de las cepas que presenten capacidad inhibitoria sobre las cepas controles.
  
- Determinar el efecto de cada una de las fracciones pigmentadas que presenten inhibición en cultivos de cepas controles.
  
- Determinar de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Letal Media (CLM) y Concentración Letal (CL) de las masas bacterianas secas de cada una de las cepas que presenten capacidad inhibitoria sobre las cepas controles.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Biológico

De cada uno de los siguientes géneros *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* y *Micrococcus* se utilizó una cepa bacteriana pigmentada, las que previamente fueron aisladas por Fuenzalida (2006) desde muestras de agua y sedimentos del Estero de la Plata y Playa Chica de Valdivia. Además, se utilizaron las cepas controles *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (ATCC 6639), *Candida albicans* (Robin) Berkhout (ATCC 9002), *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 25922), y *Staphylococcus aureus* Rosenbach (ATCC 25923).

##### 3.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en la parte experimental se presentan ordenados alfabéticamente y se señala en paréntesis las abreviaturas usadas en el texto: acetato de etilo al 99% Merck, ácido clorhídrico al 37% (HCl) Merck, ácido sulfúrico al 30% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) Merck, agar – agar, agar peptona al 2% (AP 2%), agar extracto de malta al 2% (AEM), cloroformo pro análisis 99% Merck, cloruro de sodio (NaCl), dimetilsulfóxido (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) Merck, etanol 70% y extra puro Merck, extracto de carne, extracto de malta, hidróxido de sodio al 98% (NaOH) Merck, metanol al 99% Merck, n-hexano al 99% Merck, peptona de carne.

### **3.1.3 Equipos**

Autoclave Orthmann, balanza Hanson 1460, cámara de cultivo Kottermann, cámara de frío Eurofrigo, espectrofotómetro UV/visible Jasco modelo V-530 ,lámpara UVSL MINERALIGHT, refrigerador Trotter, rotavapor Quimis ISO 9002, vórtex manual modelo K-550-GE (220 y 50 Hz).

### **3.1.4 Otros**

Aceite de oliva Colavita, agua destilada estéril, asa de siembra, bisturí, botellas de vidrio estériles de 250 mL, capilares, columna cromatográfica Silicagel <sup>60</sup>F<sub>254</sub>, cubreobjetos, embudo de porcelana Buchner, espátulas metálicas, granallas de ebullición, guantes, hielo, horno microondas, matraces balón de 250 mL, matraces Erlenmeyer de 125 y 250 mL, matraz de succión, mechero, micropipetas de 100 µL y 500 µL, papel filtro, pinza sostén, pipetas graduadas de 1 mL, 5 mL y 10 mL, pipetas Pasteur, placas Petri, portaobjetos, probetas de vidrio de 10 mL, 50 mL y 100 mL, probetas plásticas de 100 mL y 500 mL, tómulas estériles, tubos con casquetes de 30 mL, tubos de ensayo, tubo refrigerante, tubos venoget, vasos de precipitados de 500 y 250 mL.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Masificación de las cepas bacterianas pigmentadas**

Cada una de las cepas de bacterias pigmentadas, se sembraron individualmente y por triplicado mediante el método de siembra por estrías en placas Petri que contenían AP al 2 %. Sembradas las placas se incubaron a  $23 \pm 1$  °C por 24 a 48 horas.

### 3.2.2 Obtención de las masas bacterianas secas de las cepas pigmentadas

Con la finalidad de obtener en forma individual una gran cantidad de la masa bacteriana de cada una de las cepas en estudio, los cultivos de la cepa respectiva se sometieron al procedimiento que se describe a continuación: transcurrido el tiempo de incubación señalado en el punto 3.2.1, con un bisturí se extrajo el cultivo formado en cada placa por la cepa en estudio (teniendo la precaución de no extraer agar) y se depositó en tubos que contenían 10 mL de agua destilada estéril. Luego el contenido de los tubos se mezcló en un vórtex hasta obtener una mezcla homogénea, la cual fue depositada independientemente en tapas de placas Petri, las que posteriormente se dejaron a 37 °C por 24 horas en un horno con la finalidad de evaporar toda el agua y obtener solo la masa bacteriana seca de la cepa respectiva. Obtenida la masa seca bacteriana, esta se extrajo desde las tapas de las placas y se depositó individualmente en tubos (Fig. 1) que fueron almacenados, para luego probar la capacidad antibiótica de ella.



**Figura 1.** Masas bacterianas secas obtenidas de cada cepa de géneros bacterianos pigmentados.

1. *Micrococcus*. 2. *Flexibacter*. 3. *Flavobacterium*. 4. *Chromobacterium*.

### **3.2.3 Determinación mediante antibiograma de la capacidad antimicrobiana de las masas bacterianas secas de bacterias pigmentadas**

Para realizar el antibiograma y probar la capacidad antibiótica de las masas bacterianas secas obtenidas según punto 3.2.2, se utilizaron cultivos de las cepas controles de la levadura *Candida albicans* (ATCC 90029), y las bacterias *Bacillus subtilis* (ATCC 6639), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). De cada una de las cepas controles se realizó un cultivo masificado, para ello, las cepas bacterianas controles se sembraron por estrías en tubos que contenían AP 2% y luego se incubaron a 37 °C por 24 h., mientras que la levadura control se cultivó en tubos que contenían AM 2% e incubaron a  $23 \pm 1$  °C por 24 h. Terminado el período de incubación, en forma individual de cada cepa control se realizó una suspensión en agua destilada estéril. Cada suspensión bacteriana fue individualmente sembrada con la ayuda de una tórula estéril en toda la superficie del AP 2% contenido en placas Petri, de manera de obtener un tapiz homogéneo, de igual manera se sembró la suspensión de la cepa levaduriforme control, pero en AM al 2%. Por su parte, con la masa bacteriana seca (pigmentos más restos bacterianos) obtenida de la cepa en estudio se preparó una suspensión. Para ello se pesaron 0.02 g de la masa bacteriana seca respectiva y se depositaron en un tubo que contenía 4 mL de agua destilada, la mezcla obtenida se homogenizó en vórtex.

Finalmente, tres placas sembradas con tórula de cada una de las cepas controles fueron inoculadas respectivamente con alícuotas de 10 µL, 100 µL y 200 µL de la suspensión de la masa bacteriana seca de la cepa bacteriana en estudio. Inoculadas las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas y aquellas que contenían el tapiz de la cepa de levadura control a 23 °C, tras lo cual se observó a simple vista la presencia de halos de inhibición.

En base a los resultados obtenidos (inhibición del crecimiento de las cepas controles) se seleccionó una cepa bacteriana pigmentada para continuar con la fase experimental.

### **3.2.4 Caracterización química y física de la masa bacteriana seca de la cepa pigmentada seleccionada**

- Solventes polares y apolares: para evaluar la solubilidad de la masa bacteriana, se procedió de la siguiente manera:

Se utilizaron 4 solventes, a saber: agua destilada, cloroformo, dimetilsulfóxido y metanol. Se depositaron 10 mL de cada solvente en probetas de vidrio, posteriormente se agregaron 0.2 g de la masa bacteriana seca en cada matraz con una espátula y se evaluó su solubilidad en cada solvente.

- pH: para evaluar la estabilidad de la masa bacteriana frente a variaciones de pH, se prepararon una serie de soluciones a diferentes pH, comenzando con el pH 1 hasta llegar al pH 14. Para ello se utilizó agua destilada, ácido clorhídrico al 37% p/p ( $d= 1.19 \text{ g/cm}^3$ ) e hidróxido de sodio al 98% p/p ( $2.13 \text{ g/cm}^3$ ). Las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

Solución a pH 1: se tomaron 0.82 mL de ácido clorhídrico al 37% que se colocó en un matraz de 100 mL y se aforó con agua destilada. Esta solución tenía una concentración a 0.1M. A partir de esta solución se tomaron 10 mL que se depositaron en un matraz de 100 mL que se aforó con agua destilada. Obteniendo una solución de concentración a 0.01M, pH 2. A partir de esta solución se extrajeron 10 mL se depositaron en un matraz de 100 mL que se aforó con agua destilada. Obteniendo una solución de concentración  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ , pH 3. Esta metodología se desarrolló hasta obtener un pH 6. La solución de pH 7, se preparó utilizando 100 mL de agua destilada.



Para preparar las soluciones desde el pH 8 al 14 se utilizó hidróxido de sodio al 98% en forma granulada, del cual se pesaron 4 g que se disolvieron en 100 mL de agua destilada. Ésta solución tenía una concentración 1M y un pH 14. A partir de esta solución se tomaron 10 mL que se depositaron en un matraz de 100 mL que se aforo con agua destilada. Obteniendo una solución de concentración a 0.1M, pH 13. A partir de esta solución se extrajeron 10 mL se depositaron en un matraz de 100 mL que se aforo con agua destilada. Obteniendo una solución de concentración 0.01M, pH 12. Esta metodología se desarrollo hasta obtener un pH 8.

Posteriormente, se pesaron 0.5 g de la masa bacteriana, que se resuspendieron en 50 mL de agua. Finalmente a cada solución de pH preparada, se le adicionaron 5 mL de la resuspensión, y se observó la estabilidad del color de la masa bacteriana.

- Espectro al visible y UV: para medir el espectro de absorción, se utilizaron las soluciones preparadas a diferentes pH. Se trabajó con el programa Spectra Manager para realizar las mediciones. El espectrofotómetro de calibró con agua destilada y las mediciones se realizaron desde 200 nm a 700 nm de longitud de onda. Posteriormente se fueron depositando en el portacubetas cada una de las soluciones y para cada una se realizó el barrido para medir su espectro.

- Temperatura: la estabilidad de la masa bacteriana se probó utilizando diferentes rangos de temperatura, comenzando desde los 0 °C, hasta llegar a los 100 °C, con intervalos de 10 grados entre cada temperatura. Para ello se diluyó 1 g de la masa bacteriana en 250 mL de agua destilada. Se utilizaron 11 tubos de precipitados, a los cuales se le agregó 20 mL de solución a

cada uno. Posteriormente cada tubo se sometió a un rango de temperatura diferente, comenzando por los 0 °C; hasta los 100 °C. En cada tubo se observó la estabilidad del color frente a los cambios de temperatura, y posteriormente se midió su espectro al UV-visible en el espectrofotómetro.

### **3.2.5 Purificación de la masa bacteriana seca de la cepa bacteriana seleccionada**

Para realizar la purificación del pigmento desde la masa seca de la cepa seleccionada, se utilizó el método de extracción Soxhlet (sólido-líquido), para lo cual se pesaron 11.2 g de la masa seca (pigmento mas restos bacterianos) obtenidos de la cepa bacteriana del género *Chromobacterium*, estos se depositaron dentro de un dedal de papel filtro, el cual posteriormente fue depositado al interior del sistema soxhlet. Para disolver el pigmento y separarlo de algún tipo de impureza se utilizaron 150 mL de metanol al 99% de pureza, de modo de obtener solo el pigmento puro. La extracción se realizó a 62°C por 3 días, hasta que finalmente el metanol no se coloreó. Posteriormente el extracto obtenido se llevó a un rotavapor, para concentrarlo y con el fin de eliminar todo el solvente. Posteriormente se realizó la separación del pigmento de acuerdo a su solubilidad.

### **3.2.6 Separación del pigmento de acuerdo a su solubilidad**

Con el pigmento obtenido de la extracción señalada en el punto 3.2.5, se procedió a separarlo de acuerdo a su solubilidad, para esto se realizaron 3 lavados empleándose tres solventes orgánicos. Primero se utilizaron 50 mL de n-hexano al 99% de pureza, que se agregaron al pigmento con el fin de disolver todo lo soluble en este solvente, para esto se llevó la solución a baño Maria a 40 °C, con el fin de aumentar la solubilidad. Finalmente toda la solución se filtró al vacío, para

separar todo lo que quedaba como insoluble en n – hexano. Este procedimiento se repitió 3 veces, con lo que se obtuvo la primera fracción, que se llevó a concentrar al rotavapor, para eliminar todo el n- hexano existente.

Luego a todo lo que quedó del pigmento, que no fue capaz de disolver el n-hexano se le agregaron 50 mL de acetato de etilo al 99% de pureza y se procedió como se señaló anteriormente, también la solución obtenida se llevó a concentrar al rotavapor para obtener la segunda fracción. Finalmente todo lo que quedó del pigmento, que no fue disuelto por el n – hexano y tampoco por el acetato de etilo, se le agregaron 50 mL de metanol al 99% de pureza, para finalmente concentrarlo en el rotavapor y obtener la tercera fracción, que se denominaron:

A: Fracción obtenida con n-hexano

B: Fracción obtenida con acetato de etilo

C: Fracción obtenida con metanol

### **3.2.7 Determinación de la pureza de las fracciones obtenidas del pigmento de la cepa seleccionada mediante cromatografía de capa fina**

Se sembraron muestras de las fracciones obtenidas del pigmento, con la ayuda de un capilar en una placa de Silicagel <sup>60</sup>F<sub>254</sub>. Cada muestra fue sembrada con 1 cm de separación entre si, para evitar posibles errores. Luego la placa fue introducida en una cámara de vidrio con 30 mL de una solución 7:3 de metanol (21 mL) y acetato de etilo (9 mL). Las muestras de las fracciones se dejaron correr a través de la placa por 45 minutos. Finalizado este período la placa cromatográfica fue revelada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 30%, lo que permitió visualizar todos aquellos componentes incoloros presentes en el pigmento.

### **3.2.8 Antibiograma de las fracciones obtenidas del pigmento obtenido de la cepa seleccionada**

Se realizó un antibiograma para determinar cuál fracción obtenida del pigmento es la que posee la capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas patrones.

Para esto, las fracciones A, B, C del pigmento obtenido se de acuerdo al punto 3.2.7 se disolvieron de la siguiente manera, la fracción A se disolvió en aceite de oliva estéril, mientras que las fracciones B y C se disolvieron en agua destilada estéril y se procedió a realizar los antibiogramas respectivos de la misma manera como se señaló en el punto 3.2.3, a excepción que se utilizaron alícuotas de 10  $\mu$ L y 200  $\mu$ L de las fracciones del pigmento obtenidas.

### **3.2.9 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Letal Media (CLM) y Concentración Letal (CL) de la masa bacteriana seca de la cepa pigmentada seleccionada**

Para determinar la CIM, CLM Y CL de la masa bacteriana seca de la cepa seleccionada, se realizó la técnica utilizada por Maldonado, 2003. Primero se realizaron una serie de diluciones en forma independiente de cada una de las cepas controles. Para ello, de un cultivo de la cepa respectiva se extrajo 1 inóculo del tamaño de un asa de siembra y se depositó en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada estéril (obteniéndose una dilución  $10^{-1}$ ), la mezcla obtenida se homogenizó y a partir de ella se extrajo 1 mL y se depositó en otro tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril (obteniéndose una dilución  $10^{-2}$ ), una vez homogenizado el contenido de este tubo se extrajo 1 mL y se depositó en un nuevo tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril (obteniéndose una dilución  $10^{-3}$ ), este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución de la cepa de  $10^{-7}$ . De cada una de las diluciones obtenidas se sembraron 0.1 mL

individualmente y por triplicado en placas Petri que contenían AP 2% para las cepas bacterianas controles y en AEM 2% para la cepa de levadura control. Las placas sembradas se incubaron a 37° C por 24 h, tras lo cual se realizó a ojo desnudo el recuento de las colonias, finalmente los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias/ mL (UFC/mL).

En forma paralela, cada una de las diluciones fue tratada en forma individual de la siguiente manera: se preparo una batería de tubos (7 en total por dilución) a cada uno de los tubos que contenían 5 mL de caldo peptona al 2% se le adiciono 1 mL de dilución en estudio y una concentración definida del pigmento (0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.80, 0.90 y 1.0 mg/mL), así al primer tubo de la batería se le agregaron 0.30 mg de pigmento/mL y al último tubo de la batería 1.0 mg de pigmento/mL. Lo mismo se realizó con la levadura, en que se utilizó CM 2%. Luego los tubos se incubaron a 37 °C por 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación se extrajo una alícuota de 0.1 mL del tubo respectivo y fue sembrada con rastrillo en forma individual y por duplicado en placas Petri que contenían AP al 2%. Sembradas las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas y se realizó el recuento de colonias bacterianas.

De esta manera se determinó la concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de pigmento para inhibir el crecimiento de la población bacteriana de la cepa control analizada, también se determinó la concentración Letal Media (CLM) de pigmento que mata la mitad de la población bacteriana de la cepa control analizada y la concentración Letal (CL) del pigmento que mata la totalidad de la población bacteriana de la cepa control analizada.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Actividad antimicrobiana de las masas bacterianas secas obtenidas

Se obtuvieron masas secas de las cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* y *Micrococcus*, cuya actividad antimicrobiana se ensayó en tapices de las cepas controles de *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En los ensayos realizados solo se determinó actividad antimicrobiana de la masa seca bacteriana obtenida de *Chromobacterium*, cuya capacidad inhibitoria se presentó sobre todas las cepas controles ensayadas. En la Figura 2, se presentan una fotografía que muestra los halos de inhibición observados.



**Figura 2.** Halos de inhibición producidos por alícuota de la masa seca de *Chromobacterium* en tapices de las cepas controles (desde izquierda a derecha): *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*.

### 4.2 Caracterización química y física de la masa bacteriana seca de la cepa pigmentada seleccionada

En la Tabla 2, se indica la solubilidad de las masas secas bacterianas de *Chromobacterium* en diferentes solventes polares y apolares.

**Tabla 2.** Solubilidad de las masas bacterianas secas de *Chromobacterium* en diferentes solventes polares y apolares

| <b>Solvente</b>  | <b>Solubilidad</b> | <b>Color</b>   |
|------------------|--------------------|----------------|
| Agua destilada   | Poco soluble       | Violeta turbio |
| Cloroformo       | No soluble         | No coloreó     |
| Dimetilsulfóxido | Muy soluble        | Azul violeta   |
| Metanol          | Soluble            | Violeta turbio |

En la Tabla 2, se observa que los análisis de solubilidad mostraron que la masa bacteriana seca de *Chromobacterium* es muy soluble en dimetilsulfóxido, soluble en metanol, poco soluble en agua, donde se observó una turbidez, a pesar de dejarlo decantar por 30 minutos e insoluble en cloroformo.

En la Tabla 3, se indica la estabilidad de la masa seca bacteriana de *Chromobacterium* a diferentes puntos de pH.

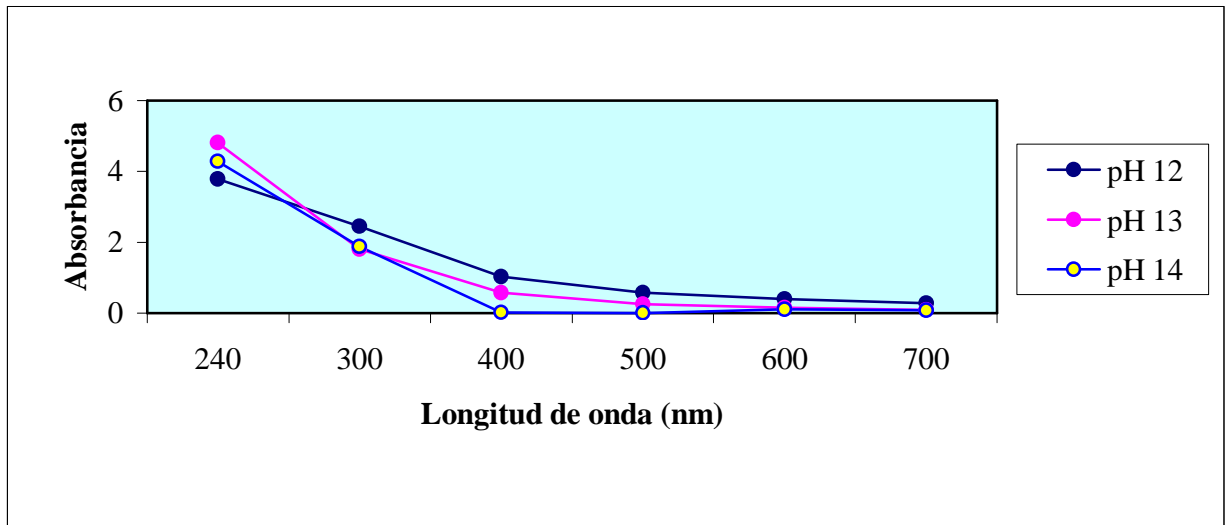
**Tabla 3.** Estabilidad de las masas bacterianas secas de *Chromobacterium* a diferentes puntos de pH

| <b>pH</b> | <b>Cambios</b>         | <b>Color</b> |
|-----------|------------------------|--------------|
| 1         | no se observan cambios | Violeta      |
| 2         | no se observan cambios | Violeta      |
| 3         | no se observan cambios | Violeta      |
| 4         | no se observan cambios | Violeta      |
| 5         | no se observan cambios | Violeta      |
| 6         | no se observan cambios | Violeta      |
| 7         | no se observan cambios | Violeta      |
| 8         | no se observan cambios | Violeta      |
| 9         | no se observan cambios | Violeta      |
| 10        | no se observan cambios | Violeta      |
| 11        | no se observan cambios | Violeta      |
| 12        | se observan cambios    | Amarillo     |
| 13        | se observan cambios    | Amarillo     |
| 14        | se observan cambios    | Amarillo     |

Como se observa en la Tabla 3, los tubos preparados con soluciones de pH 1 al 12 conteniendo la masa seca de *Chromobacterium* no presentaron cambio visible alguno, solo quedaron de color violeta, en cambio los tubos preparados con soluciones de pH 13 y pH 14 conteniendo la masa seca de *Chromobacterium* sí presentaron cambio visible, ambos cambiaron al color verde oliva. Cabe destacar, que al realizar el ensayo, y transcurrido los primeros 5 minutos, solo se denoto un cambio visible respecto al color en los tubos con solución pH 13 y pH 14, que en un principio eran de color verde oliva. Sin embargo, las soluciones fueron guardadas y al transcurrir 24 horas, se observaron cambios en el tubo que contenía la solución pH 12, que en un principio era de color violeta que viró al amarillo. Los tubos con solución a pH 13 y pH 14 también habían cambiado desde el color verde oliva al color amarillo, similar a lo que ocurría a pH 11.

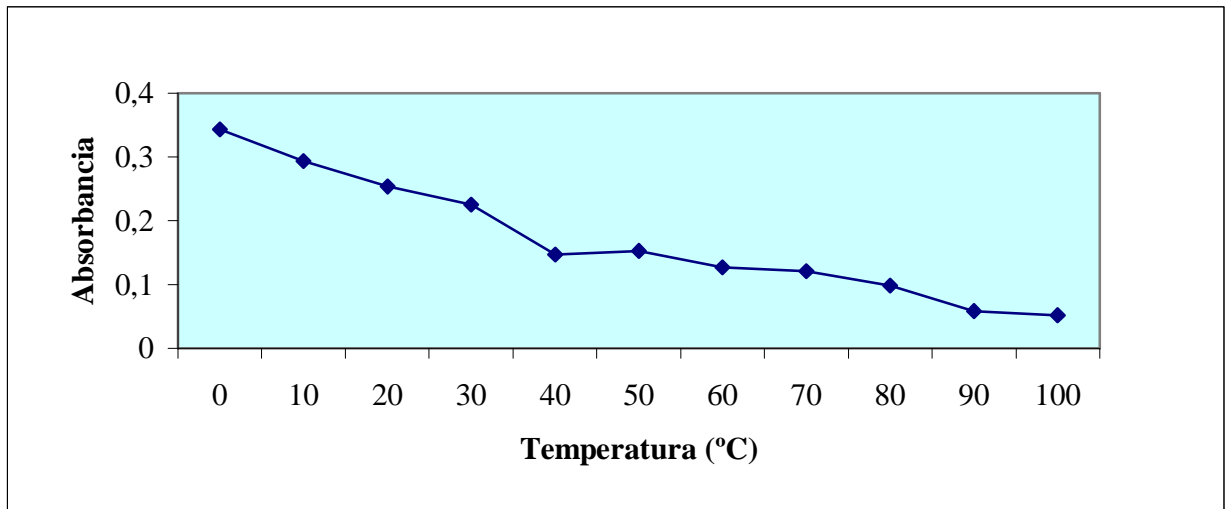
En lo que respecta a los espectros UV - visibles de las soluciones a distintos pH, muestran una absorbancia relacionada al cambio de color que experimentaron los tubos (ver anexos 2 y 3). Los tubos que contenían soluciones a pH 1 al pH 11, no presentaron mayor diferencia, en todos los gráficos se pudo observar una disminución de la absorbancia a medida que aumentaba la longitud de onda. En la Figura 3, se puede observar el espectro de UV-visible de las soluciones a pH 12, 13 y 14. Como se observa en la Fig. 3, se determinaron resultados concordantes en relación a lo observado en los cambios de color respecto del pH. Nótese que a partir de los 240 nm la absorbancia cae abruptamente, hasta alrededor de los 400 nm, donde posteriormente hasta los 700 nm se mantiene estable.





**Figura 3.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 12, 13 y 14

Respecto a la estabilidad del color de la masa bacteriana seca de *Chromobacterium*, resuspendida en agua destilada y sometida a diferentes rangos de temperatura, no experimentó ningún cambio apreciable a simple vista, en cuanto a su color. Sin embargo, a las soluciones se les midió su absorbancia, para apreciar si existe algún cambio en relación al aumento de temperatura en la solución. En la Figura 4, se aprecia el Espectro de UV/visible de la masa bacteriana seca de *Chromobacterium*, frente a diferentes rangos de temperatura. Nótese como disminuye casi de forma constante la absorbancia respecto al aumento de la temperatura.



**Figura 4.** Gráfico de espectro de UV/visible de la masa bacteriana de *Chromobacterium*, frente a diferentes rangos de temperatura

#### 4.3 Purificación del pigmento de la cepa bacteriana seleccionada

De la Extracción de Soxhlet (sólido-líquido), a la que se sometió la masa bacteriana de *Chromobacterium* se obtuvo como resultado 3 g de pigmento, que fue concentrado en rotavapor, como lo señala el punto 3.2.5. Posteriormente, se realizó la separación del pigmento de acuerdo a su solubilidad, que dio como resultado 3 fracciones denominadas:

- A: Fracción obtenida con n-hexano: de color muy oscuro, casi negro.
- B: Fracción obtenida con acetato de etilo: de color violeta.
- C: Fracción obtenida con metanol: de color azul-violáceo.

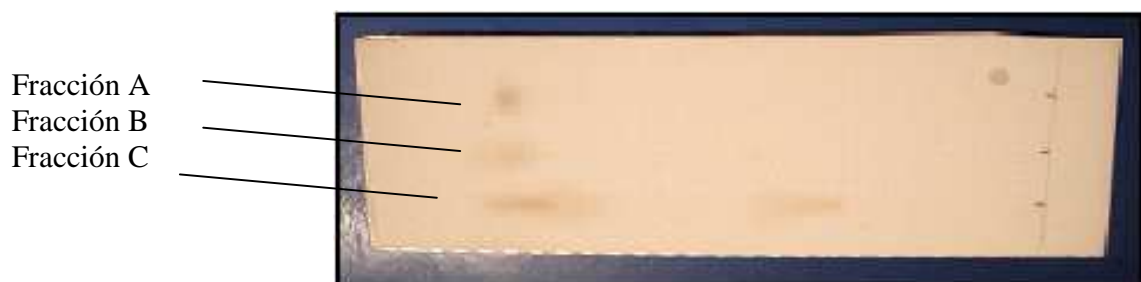
Posteriormente se determinó la pureza de las fracciones obtenidas a través de una cromatografía de capa fina en silicagel.

La cromatografía de capa fina (Fig. 5), al ser observada bajo la lámpara de UV, reveló la presencia de componentes diferentes en cada fracción, lo que indica que las fracciones no se encontraban puras.



**Figura 5.** Cromatografía de capa fina de las fracciones obtenidas de la masa bacteriana de *Chromobacterium*, vista bajo lámpara UV.

Posteriormente, se realizó la revelación de la cromatografía de capa fina con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 30%, con el fin de poder visualizar todos aquellos componentes incoloros. En la Figura 6 se puede visualizar, la presencia de compuestos diferentes en cada una de las fracciones. Lo que permite decir que las fracciones no están puras.



**Figura 6.** Cromatografía de capa fina de las fracciones obtenidas de la masa bacteriana de *Chromobacterium*, revelada con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 30%.

La actividad antimicrobiana de cada una de estas fracciones, se probó en tapices de las cepas controles de *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*. En los ensayos realizados no se observó la presencia de halos de inhibición, en ninguna de las cepas controles ensayadas por lo que se presume que el pigmento pierde su actividad al ser separado.

#### **4.4 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Letal Media (CLM) y Concentración Letal (CL) de la masa bacteriana seca de la cepa pigmentada seleccionada**

La determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Letal Media (CLM) y Concentración Letal (CL) de la masa bacteriana seca de la cepa pigmentada seleccionada, en este caso *Chromobacterium*, no se pudo llevar a cabo, ya que la masa bacteriana seca se contaminó con bacterias durante su almacenamiento. A pesar de los muchos intentos que se realizaron por esterilizar la masa a través filtración o someténdola a 100 °C por varios minutos, no se pudo lograr su completa esterilización.

## 5. DISCUSIÓN

Respecto a la actividad antimicrobiana de las masas bacterianas secas obtenidas. Del total de 4 cepas bacterianas marinas utilizadas, previamente aisladas por Fuenzalida (2006), que pertenecen a los géneros *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* y *Micrococcus*, se obtuvieron las masas bacterianas secas, cuya actividad antimicrobiana fue ensayada sobre tapices de las cepas controles *Bacillus subtilis*, *Cándida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se determinó actividad inhibitoria de la masa bacteriana seca obtenida desde el género *Chromobacterium*, observándose halos de inhibición a simple vista sobre todos los tapices de las cepas controles ensayadas. Algo similar han reportado Castillo *et al*, (2001), quienes determinaron que bacterias marinas pigmentadas pertenecientes a los géneros *Chromobacterium* y *Alteromonas*, eran productoras de sustancias inhibitorias para *S. aureus*, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio. Esta característica presente en *Chromobacterium* fue también informada por Pitlovanciv, (2005), quien determinó que esta bacteria es la responsable de la producción de un metabolito secundario de un gran potencial biotecnológico.

Es de importancia mencionar, que en el género *Chromobacterium* se observó el fenómeno de autoinhibición previamente descrito por Andersen *et al*, (1974); Gauthier & Flatau, (1976) y Castillo *et al*, (2001); probablemente esto se deba al mantenimiento de las cepas en estudio a una temperatura menor a la que fueron aisladas. Concordando con Castillo *et al*, (2001) quienes recomiendan mantener las mismas condiciones de temperatura en que se aislaron las bacterias. Es de importancia mencionar el cambio en la capacidad de inhibición que presentó *Chromobacterium*, frente a *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*, ya que cuando la cepa fue mantenida por varias semanas en cepario a 4° C, y se extrajo su pigmento, se determinó una

disminución en su capacidad de inhibir a las cepas controles. Ésta alteración en el comportamiento de cepas de *Chromobacterium* ha sido indicado por León & García – Tello, (1998), los que mencionan, que si las cepas se mantienen a 20 °C con los nutrientes necesarios, la actividad inhibitoria se mantiene constante, pero, si los cultivos eran replicados después de pasar varias semanas en cepario, se observaba una disminución muy marcada de su actividad inhibitoria y un aumento de su autoinhibición. Se ha descrito también que la producción de metabolitos secundarios como bacteriocinas, antibióticos, sideróforos, está influenciada directamente por la competencia que se genera en el medio en que se desarrolla la bacteria en condiciones naturales, que se ve disminuida en condiciones de cepario, lo que se pudo determinar en este estudio, ya que después de un tiempo, la cepa bacteriana disminuyó su capacidad inhibitoria, fenómeno anteriormente descrito por Pellón *et al*, 2001; Fantinatti - Garboggini *et al*, 2004 y Avendaño – Herrera *et al*, 2005.

Bacterias del género *Flavobacterium* fueron aisladas por Pellón *et al*, (2001) y ensayadas contra varios tipos de bacterias, entre otras, *S. aureus* obteniendo resultados positivos de inhibición, estos no concuerdan con los del presente estudio, pues la masa bacteriana seca de *Flavobacterium*, no presentó halos de inhibición sobre *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*. Algo similar a lo señalado por Pellón *et al*, (2001), fue informado por León & García – Tello (1998), quienes indican que *Flavobacterium* presentó actividad contra *B. subtilis*, *E. coli* y *S. aureus*. Aun así, estos resultados no concuerdan con los obtenidos en la presente investigación, pues como se señaló anteriormente no se observó presencia de halos de inhibición en ningún tapiz de las cepas controles ensayadas.

Respecto a la cepa bacteriana del género *Micrococcus* Bultel-Poncé *et al*, (1994), señalan la presencia de un metabolito secundario responsable de la inhibición antimicrobiana. Por su parte, León & García – Tello, (1998), han reportado a *Micrococcus*, aislado del bacterioneuston como un gran inhibidor del crecimiento de bacterias patógenas de peces y moluscos, además de determinar su actividad contra patógenos humanos como *B. subtilis*, *E. coli* y *S. aureus*. Lo señalado por los anteriores autores, no concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación, pues la masa seca bacteriana de *Micrococcus* no inhibió el desarrollo de ninguna de las cepas controles. Aunque queda la posibilidad que la masa seca bacteriana de *Micrococcus* presente actividad inhibitoria para otros microorganismos.

Finalmente, actividad inhibitoria de cepas bacterianas del género *Flexibacter* ha sido reportado por Pellón *et al*, (2001) tanto contra *S. aureus* como para algunos otros microorganismos patógenos para peces. Estos resultados tampoco concuerdan con los del presente estudio, pues la masa seca obtenida de *Flexibacter* no inhibió a ninguna de las cepas controles ensayadas.

Tal vez, los resultados obtenidos en el presente estudio, respecto a la nula inhibición de las masas bacterianas secas obtenidas de las bacterias pertenecientes a los géneros *Flavobacterium*, *Flexibacter* y *Micrococcus*, se podría deber a que durante el secado de la masa bacteriana se pierdan o alteren las sustancias con capacidad antibiótica, o simplemente las cepas utilizadas no producen metabolitos con capacidad antibiótica.

Referente a la caracterización química y física de la masa bacteriana seca de la cepa pigmentada seleccionada del género *Chromobacterium*. La masa bacteriana fue poco soluble en agua lo que concuerda con lo descrito por Pitlovanciv, (2005), pues los pigmentos producidos por *Chromobacterium* son compuestos hidrofóbicos. Buchanan & Gibbons, (1974); Pitlovanciv (2005) y Meyer *et al*, (2006), determinaron que la violaceína era un pigmento insoluble en agua, cloroformo y soluble en metanol, lo que concordaría con los resultados del presente estudio, si el pigmento fuera violaceína. Además en los ensayos realizados se determinó que la masa bacteriana seca de *Chromobacterium* es muy soluble en dimetilsulfóxido aspecto que otros autores no han indicado, respecto a algún pigmento bacteriano. En otros pigmentos, sin embargo, como la astaxantina, que se extrae de una levadura, se determinó que este pigmento era altamente soluble en dimetilsulfóxido (Salazar, 2000), un resultado muy similar al obtenido en este estudio. La coloración de la masa bacteriana seca obtenida desde el género *Chromobacterium*, determinó que se mantiene estable dentro de un rango de pH 1 al 11, pues no varió la tonalidad del color, lo que se pudo verificar al medir el Espectro UV/visible a cada solución (ver nexos 2 y 3), los cuales arrojaron una tendencia similar donde se pudo observar una disminución de la absorbancia a medida que aumentaba la longitud de onda. Algo diferente se observó en los pH 12, 13 14, que sufrieron cambios significativos respecto al color, variando sus tonalidades al color amarillo, algo distinto a lo reportado por Jiménez *et al*, (2004), quienes determinaron que otros pigmentos como los carotenoides, son capaces de resistir pH extremos, no variando su intensidad del color.

La estabilidad del color de la masa seca bacteriana de *Chromobacterium* frente a la temperatura, se pudo observar desde los 0 °C hasta llegar a los 100 °C aproximadamente, donde la coloración del pigmento se mantuvo estable, sin mayor variación a simple vista. Estudios en



otros tipos de pigmentos como carotenoides, antocianinas, carotenos y clorofilas, han determinado que mantienen estable su coloración, frente a temperaturas que bordean los 80 ° C (Jiménez *et al*, 2004), por lo que se concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, pues el pigmento no varió su color al estar expuesto a temperaturas diferentes.

Con respecto a la purificación del pigmento de la cepa bacteriana seleccionada de *Chromobacterium*, la extracción dio como resultado la obtención de un pigmento concentrado, que al ser separado de acuerdo a su solubilidad, se obtuvieron 3 fracciones. La fracción A, de color negro, obtenida con n- hexano. La fracción B, que fue obtenida con acetato de etilo que era de color púrpura y la fracción C obtenida con metanol, que era de color violeta. Algo similar a lo determinado por Pitlovanciv *et al*, (2006), quien obtuvo dos extractos pigmentados, uno de color púrpura, extraído con acetato de etilo y otro de color violeta extraído con metanol, denominados desoxiviolaceina y violaceína, respectivamente. Posteriormente, la cromatografía de capa fina determinó que la fracción B, migró mas que la fracción A y C, al igual que lo informado por Pitlovanciv *et al*, (2006), cuya fracción correspondía a la extraída con acetato de etilo.

En la presente investigación, las tres fracciones, fueron ensayadas para determinar su actividad inhibitoria en las cepas controles.

Los resultados de actividad antimicrobiana de cada una de estas fracciones, parcialmente purificadas, demostraron que el pigmento perdió su actividad inhibitoria, ya que no se observaron halos de inhibición en ninguna de las cepas controles ensayadas, esto tal vez se deba a que constituyentes de la masa bacteriana seca pierden sus propiedades antimicrobianas al ser separados, ya sea, porque sus propiedades se alteran a temperaturas elevadas, como 62 °C, a los que se realizó la extracción de Soxhlet (sólido-líquido), durante 3 días. Este aspecto, lo

determinaron León & Tapia, (1999), quienes constataron una disminución en la actividad inhibitoria de sustancias extraídas de bacterias marinas, al ser sometidas a temperaturas desde los 70 °C a los 90 °C, durante 45 minutos. Tal vez, la temperatura a la que se sometió la masa seca de *Chromobacterium* era algo menor, pero se realizó durante 3 días, lo que pudo haber alterado su actividad inhibitoria. La falta de actividad, puede atribuirse también a que el pigmento pierde su propiedad al separar sus componentes.

## 5.1 CONCLUSIONES

La masa bacteriana seca de *Chromobacterium* tiene capacidad antimicrobiana frente a las cepas controles de *Bacillus subtilis*, *Cándida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

La masa bacteriana seca obtenida de *Chromobacterium* es insoluble en cloroformo, poco soluble en agua, soluble en metanol y muy soluble en dimetilsulfóxido. Además, mantiene su color a temperaturas entre 0 °C a 100 °C, y lo pierde a pH 12, 13 y 14.

Las fracciones obtenidas de la masa bacteriana seca de *Chromobacterium*, no poseen actividad antimicrobiana sobre las cepas controles de *Bacillus subtilis*, *Cándida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

De acuerdo a los resultados obtenidos la hipótesis del presente estudio se acepta.

## 6. LITERATURA CITADA

Andersen, R., Wolfe, M. & Faulkner, D. (1974). Autotoxic antibiotic production by a marine *Chromobacterium*. *Mar. Biol.*, 27(4): 281 - 285.

Avendaño-Herrera, R., Lody, M. & Riquelme, C. (2005). Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en substratos marinos. *Rev. biol. mar. oceanogr.*, 40(2): 117 – 125.

Buchanan, R & Gibbons, N. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Editorial Board and Trustees of Bergey's Manual Trust. Eighth Edition. United States of América. 1268p.

Bultel-Poncé, V., Debitus, C., Berge, J., Cerceau, C. & Guyot, M. (1994). Metabolites from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. *J. Mar. Biotechnol.*, 6(4): 233 – 236.

Castillo, I., Lodeiros, C., Núñez, M. & Campos, E. (2001). Evaluación *in vitro* de sustancias antibacterianas producidas por bacterias aisladas de diferentes organismos marinos. *Rev. biol. trop.*, 49: (3, 4): 1213-1221.

Castro, N., Magariños, B., Avendaño-Herrera, R., Osorio, C. & Toranzo A. (2005). Presencia de mecanismos de captación de hierro en *Pseudomonas anguilliseptica*. (en línea). <http://micelio.unex.es/sem2005/comunicaweb/H341>. Fecha de consulta 26/11/2006.

Coello, N., Bernal, C., Bertsch, A., Estrada, O., Moccó, Y. & Hasegawa, M. (2003). Las plumas como residuo agroindustrial: su utilización biotecnológica para producir insumos de interés industrial. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la U. C. V.*, 18 (3): 119 – 123.

Cragg, G. & Newman, D. (2001). Medicinals for the millennia - *The historical record. Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 953: 3 – 25.

Fantinatti-Garboggini, F., Almeida, R., Amaral, V., Barbosa, T., Beltramini, P., Ramalho, C., Duarte, R., Wanderlei, D., Bartoleti, L., Hanna, E., Brocchi, M. & Manfio1, G. (2004). Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. *Genet. mol. res.*, 3 (1): 134 - 147.

Fuenzalida, K. (2006). Comparación cuali-cuantitativa de bacterias cromógenas aisladas de dos cuerpos de agua de la provincia de Valdivia. Tesis de Pregrado. Escuela de Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. 68 p.

Gauthier, M. & Flatau, G. (1976). Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Can. J. Microbiol.*, 22(11):1612 - 1619.

González, I., Niebla, A., Roura, G., González, L., Travieso, F., Lemus, M., Contreras, R. & Vallin, C. (2002). Resistencia a las penicilinas en la Habana, Cuba, y su incidencia en le género *Staphylococcus*. Frecuencia de aparición de estafilococos resistentes a meticilina. *Rev. Pan. infectol.*, 5(1): 30 - 44.

Ingraham, J. (1998). *Introducción a la Microbiología*. Editorial Reverté S.A. Edición en español. Barcelona, España. 327p.

Jensen, P & Fenical, W. (1994). Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Ann Rev. Microbiol.*, 48, 559 – 584.

Jiménez, M., Zambrano, M. & Aguilar, M. (2004). Estabilidad de Pigmentos en Frutas Sometidas a Tratamiento con Energía de Microondas. *Inf. tecnol.*, 15(3): 61 - 66.

Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 74 (1): 151 - 170.

Leiva, S., Yañez, M., Zaror, L., Rodríguez, H. & García-Quintana, H. (2004). Actividad antimicrobiana de *Actinomycetes* aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev. méd. Chile.*, 132(2): 151-159.

León, J & Tapia, G. (1999). Caracterización parcial y espectro antimicrobiano de sustancias inhibitorias producidas por *Alteromonas* marinas. *Rev. peru biol.*, 6 (1): 94 – 103.

León, J., Tapia, G. & Avalos, R (2005). Purificación parcial y caracterización de una sustancia antimicrobiana producida por *Alteromonas* sp., de origen marino. *Rev. peru biol.*, 12(3): 359 - 368.

León & García Tello. (1998). Cepas nativas del bacterioneuston marino y su actividad inhibitoria de bacterias ictiopatógenas. *Rev. peru biol.*, 5(1): 47 – 64.

Lucas-Elio, P., Gómez, D., Solano, F. & Sánchez-Amat, A. (2005). Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*. (en línea). <http://micelio.unex.es/sem2005/comunicaweb/H341>  
Fecha de consulta 26/11/2006.

Maldonado, C. (2003). Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de Quitosano Carbamato de Etilo sobre cepas de *Candida albicans*. Tesis de Pregrado. Escuela de Química y Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. 39p.

Mancilla, C. (2003). Aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de la Microbiota Bacteriana de agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia. Tesis de Pregrado. Escuela de Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. 52p.

Madigan, M., Martingo, J. & Parker, J. (1998). Biología de los Microorganismos. Ediciones Omega. S. A. Barcelona. 986p.

Meyer, D., Lok – Tan, T. & Meter, F. (2006). Violacein and Desoxyviolacein. Microbiological procedure for the biosynthesis of the natural blue-violet dyes. (en línea): <http://www.awi-bremerhaven.de/TT/viola/index-d.html>. Fecha de consulta: 27/12/2006.

Pellón, F., Orozco, R. & León, J. (2001). Bacterias marinas con capacidad antimicrobiana aisladas de moluscos bivalvos en cultivos. *Rev. peru biol.* (en línea): [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/biologia/v08\\_n2/bacte\\_marinas.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/biologia/v08_n2/bacte_marinas.htm). Fecha de consulta 26/11/2006.

Pitlovanciv, A. (2005). Antividade Antibiótica de Extratos obtidos de culturas de *Chromobacterium violaceum*. Programa de Pós – Graduação em Biotecnología. Departamento de Microbiología y Parasitología. Centro de Ciencias Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina. 80p.

Pitlovanciv, A., Caris, M., Marques, L., Curi, R. & Vasconcellos, R. (2006). Condições de cultivo e produção de pigmentos por *Chromobacterium violaceum*. *Biotemas.*, 19(1): 13 – 18.

Salazar, M. (2000). La Astaxantina y su biosíntesis. *Rev. Contactos.*, 63: 61 – 64.

Salvatierra, R & Benguigui. (2000). Resistencia antimicrobiana en las Américas: Magnitud del problema y su contención. Editado por Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C., Estados Unidos de América. 267 p.

Schlegel, H. (1997). Microbiología General. Ed. Omega, Barcelona. 654p.

Silva, P., Stuchi, S., Campos, B., Haun, M. & Durán, N. (2000). Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In vitro & Developmental Biology-Animal.*, 36(8): 539 - 543.

Veiga-Crespo, P., Blasco, L., Rosa do Santos, F., Poza, M. & Villa, T. (2005). Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production. *Int. Microbiol.*, 8(1): 55-58.



**ANEXOS**

**ANEXO 1**

Preparación de medios de cultivo.

| <b>Agar Peptona:</b>    |         |
|-------------------------|---------|
| Cloruro de Sodio (NaCl) | 5 g     |
| Extracto de Carne       | 3 g     |
| Peptona de Carne        | 10 g    |
| Agar - agar             | 20 g    |
| Agua destilada          | 1000 mL |

Se mezclan todos los ingredientes y luego se esteriliza a 1 atmósfera (121 °C) por 15 minutos.

| <b>Caldo Peptona:</b>   |         |
|-------------------------|---------|
| Cloruro de Sodio (NaCl) | 5g      |
| Extracto de Carne       | 3g      |
| Peptona de Carne        | 20 g    |
| Agua destilada          | 1000 mL |

Se mezclan todos los ingredientes y luego se esteriliza a 1 atmósfera (121 °C) por 15 minutos.

| <b>Agar Malta:</b> |         |
|--------------------|---------|
| Agar – agar        | 20 g    |
| Extracto de Malta  | 20 g    |
| Agua destilada     | 1000 mL |

Se mezclan todos los ingredientes y luego se esteriliza a 1 atmósfera (121 °C) por 15 minutos.

| <b>Caldo Malta:</b> |         |
|---------------------|---------|
| Extracto de Malta   | 20 g    |
| Agua destilada      | 1000 mL |

Se mezclan todos los ingredientes y luego se esteriliza a 1 atmósfera (121 °C) por 15 minutos.

## ANEXO 2

Tablas de Absorbancias en relación a diferentes longitudes de onda

**Tabla 1.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 1 frente a diferentes longitudes de onda

| <b>Solución pH 1</b> |                              |
|----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>   | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 2,739                | 240                          |
| 1,861                | 300                          |
| 1,201                | 400                          |
| 0,868                | 500                          |
| 0,731                | 600                          |
| 0,513                | 700                          |

**Tabla 2.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 2 frente a diferentes longitudes de onda

| <b>Solución pH 2</b> |                              |
|----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>   | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 3,345                | 240                          |
| 2,066                | 300                          |
| 1,451                | 400                          |
| 1,103                | 500                          |
| 0,948                | 600                          |
| 0,668                | 700                          |

**Tabla 3.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 3 frente a diferentes longitudes de onda

| <b>Solución pH 3</b> |                              |
|----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>   | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 3,852                | 240                          |
| 2,333                | 300                          |
| 1,766                | 400                          |
| 1,412                | 500                          |
| 1,225                | 600                          |
| 0,212                | 700                          |

**Tabla 4.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 4 frente a diferentes longitudes de onda

| <b>Solución pH 4</b> |                              |
|----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>   | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 3,679                | 240                          |
| 2,147                | 300                          |
| 1,448                | 400                          |
| 1,037                | 500                          |
| 0,859                | 600                          |
| 0,506                | 700                          |

**Tabla 5.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 5 frente a diferentes longitudes de onda

| Solución pH 5 |                       |
|---------------|-----------------------|
| Absorbancia   | Longitud de onda (nm) |
| 3,339         | 240                   |
| 2,019         | 300                   |
| 1,230         | 400                   |
| 0,899         | 500                   |
| 0,753         | 600                   |
| 0,421         | 700                   |

**Tabla 6.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 6 frente a diferentes longitudes de onda

| Solución pH 6 |                       |
|---------------|-----------------------|
| Absorbancia   | Longitud de onda (nm) |
| 3,891         | 240                   |
| 2,427         | 300                   |
| 1,814         | 400                   |
| 1,422         | 500                   |
| 1,231         | 600                   |
| 0,738         | 700                   |

**Tabla 7.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 7 frente a diferentes longitudes de onda

| <b>Solución pH 7</b> |                              |
|----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>   | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 4,088                | 240                          |
| 3,157                | 300                          |
| 2,500                | 400                          |
| 2,151                | 500                          |
| 2,243                | 600                          |
| 1,149                | 700                          |

**Tabla 8.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 8 frente a diferentes longitudes de onda

| <b>Solución pH 8</b> |                              |
|----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>   | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 4,881                | 240                          |
| 2,833                | 300                          |
| 2,083                | 400                          |
| 1,698                | 500                          |
| 1,670                | 600                          |
| 0,854                | 700                          |

**Tabla 9.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 9 frente a diferentes longitudes de onda

| <b>Solución pH 9</b> |                              |
|----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>   | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 3,447                | 240                          |
| 2,545                | 300                          |
| 1,710                | 400                          |
| 1,379                | 500                          |
| 1,311                | 600                          |
| 0,671                | 700                          |

**Tabla 10.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 10 frente a diferentes longitudes de onda

| <b>Solución pH 10</b> |                              |
|-----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>    | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 4,442                 | 240                          |
| 3,131                 | 300                          |
| 2,693                 | 400                          |
| 2,505                 | 500                          |
| 2,540                 | 600                          |
| 1,288                 | 700                          |



**Tabla 11.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 11 frente a diferentes longitudes de onda

| <b>Solución pH 11</b> |                              |
|-----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>    | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 3,625                 | 240                          |
| 2,660                 | 300                          |
| 1,772                 | 400                          |
| 1,417                 | 500                          |
| 1,317                 | 600                          |
| 0,685                 | 700                          |

**Tabla 12.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 12 frente a diferentes longitudes de onda

| <b>Solución pH 12</b> |                              |
|-----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>    | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 3,783                 | 240                          |
| 2,450                 | 300                          |
| 1,021                 | 400                          |
| 0,566                 | 500                          |
| 0,397                 | 600                          |
| 0,281                 | 700                          |

**Tabla 13.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 13 frente a diferentes longitudes de onda

| <b>Solución pH 13</b> |                              |
|-----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>    | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 4,811                 | 240                          |
| 1,805                 | 300                          |
| 0,572                 | 400                          |
| 0,247                 | 500                          |
| 0,150                 | 600                          |
| 0,093                 | 700                          |

**Tabla 14.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium* en solución a pH 14 frente a diferentes longitudes de onda

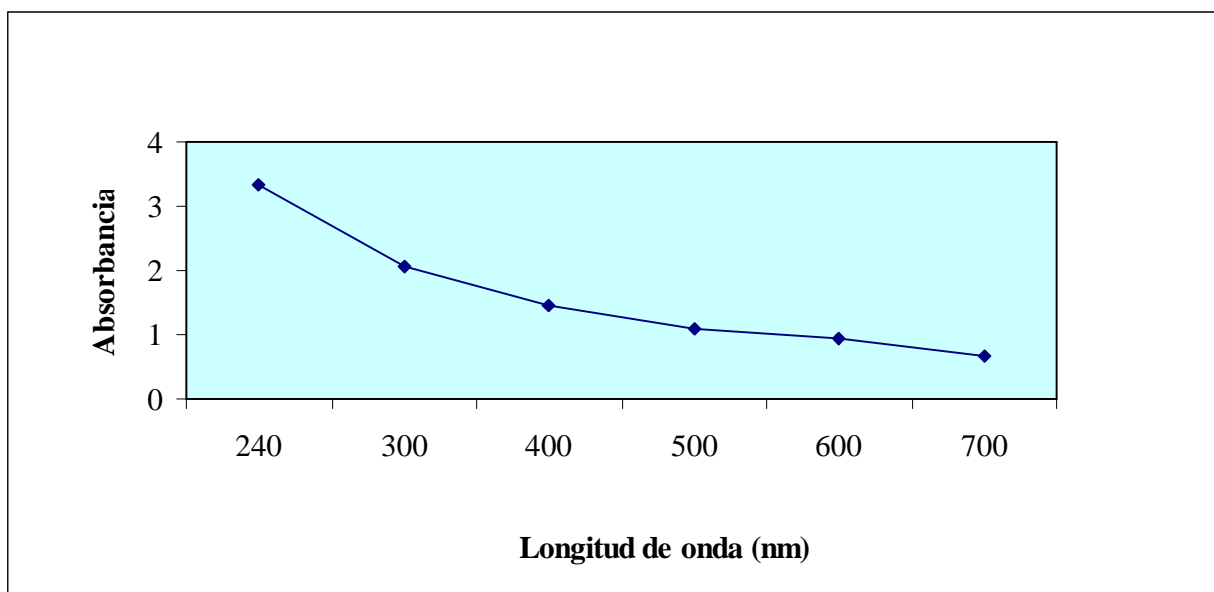
| <b>Solución pH 14</b> |                              |
|-----------------------|------------------------------|
| <b>Absorbancia</b>    | <b>Longitud de onda (nm)</b> |
| 4,280                 | 240                          |
| 1,880                 | 300                          |
| 0,013                 | 400                          |
| 0,000                 | 500                          |
| 0,107                 | 600                          |
| 0,070                 | 700                          |

**Tabla 15.** Absorbancia de la masa bacteriana de *Chromobacterium*, frente a diferentes rangos de temperatura, a 570 nm de longitud de onda

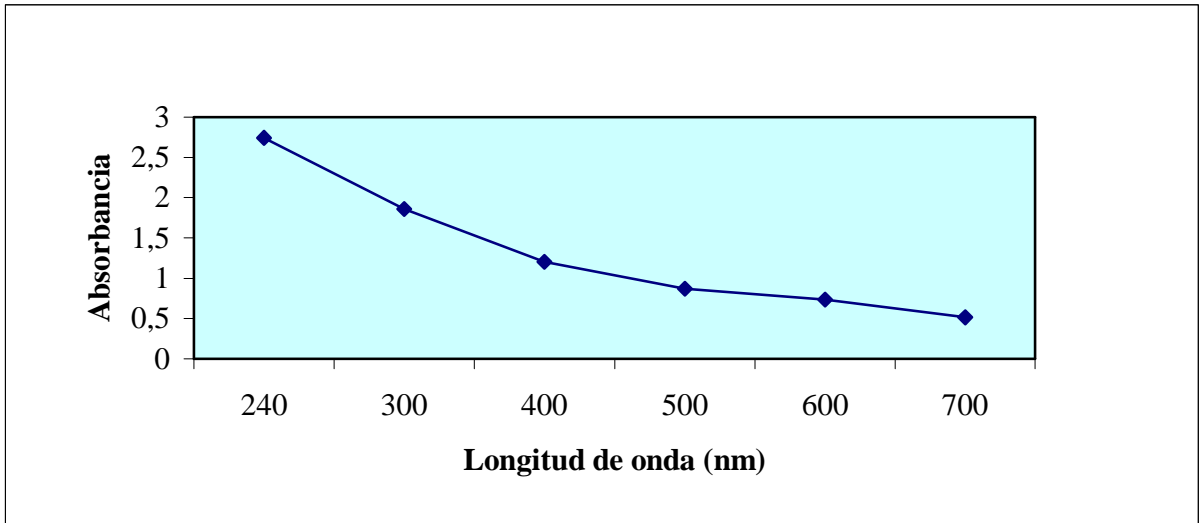
| <b>Absorbancia</b> | <b>Temperatura (°C)</b> |
|--------------------|-------------------------|
| 0,3427             | 0                       |
| 0,2932             | 10                      |
| 0,2536             | 20                      |
| 0,2254             | 30                      |
| 0,1473             | 40                      |
| 0,1531             | 50                      |
| 0,1266             | 60                      |
| 0,1215             | 70                      |
| 0,0986             | 80                      |
| 0,0589             | 90                      |
| 0,0523             | 100                     |

**ANEXO 3**

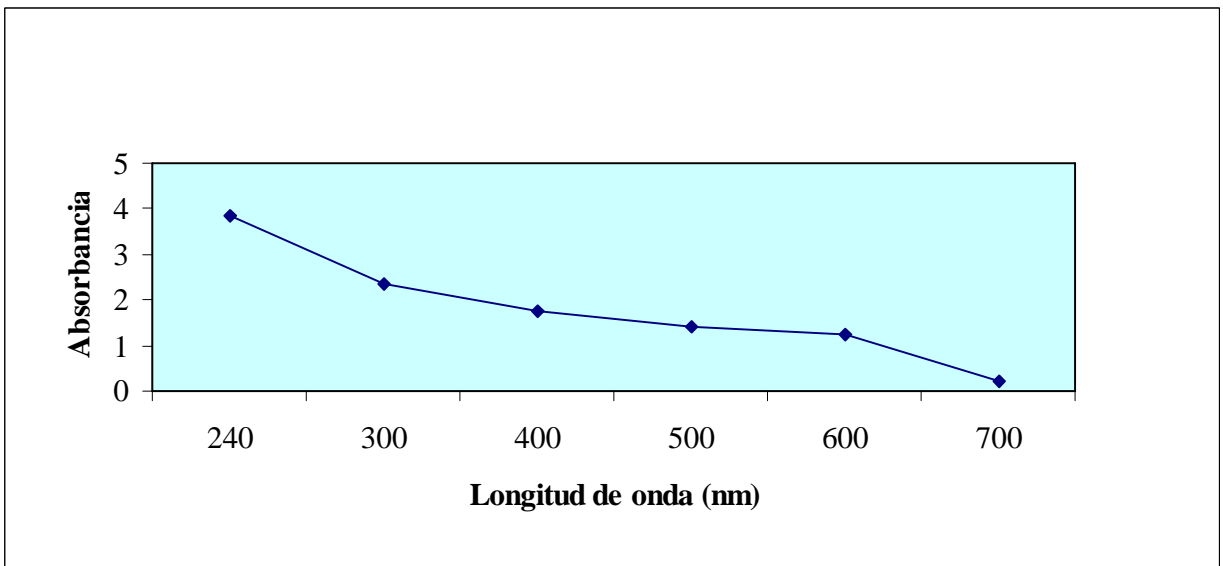
Gráficos de espectros de UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* desde PH 1 al pH 11.



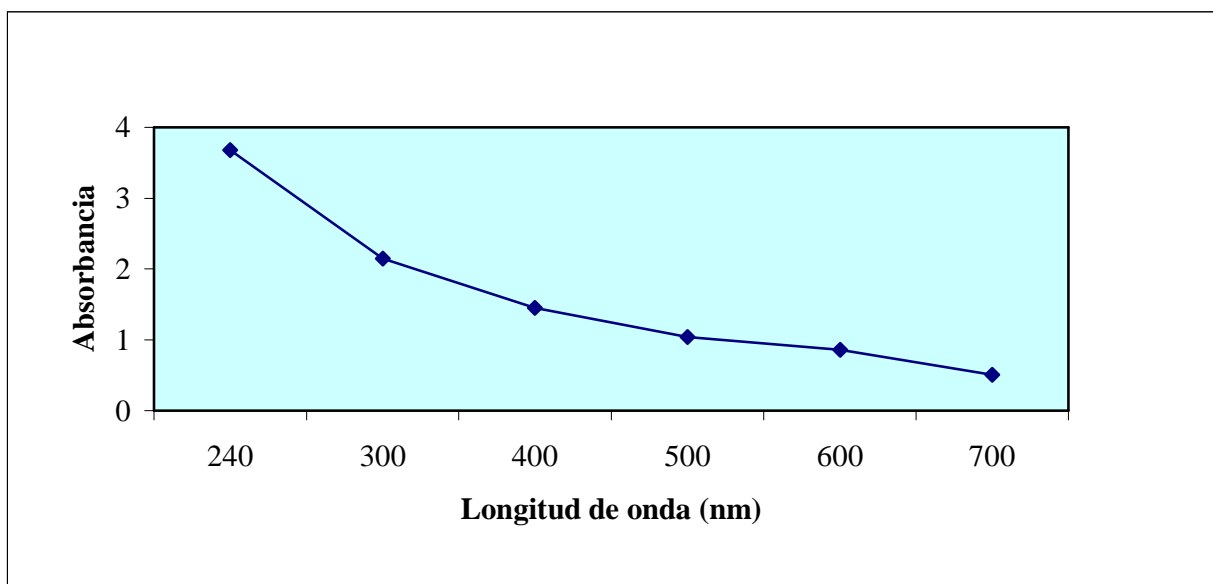
**Figura 1.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 1



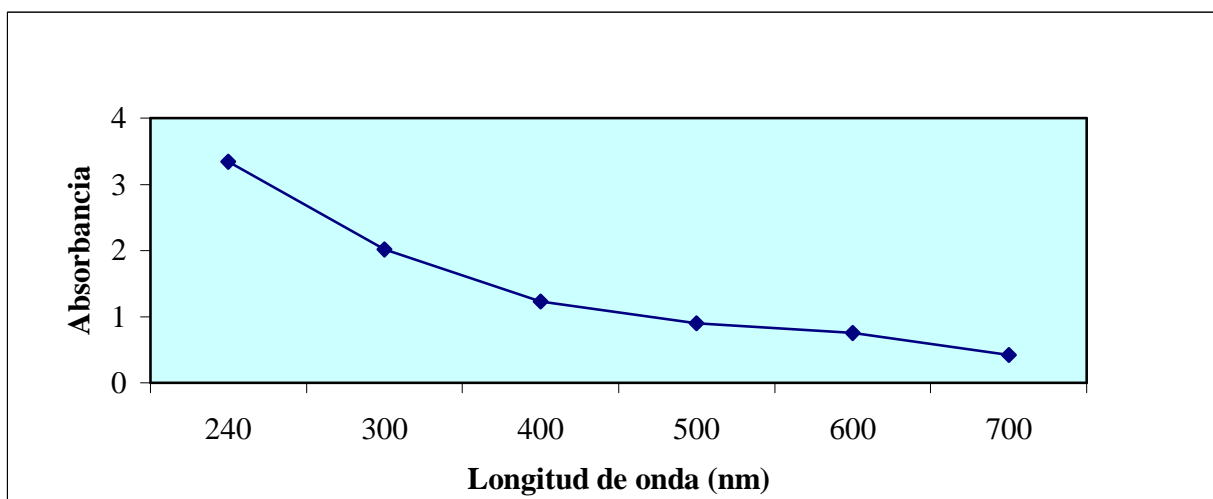
**Figura 2.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 2



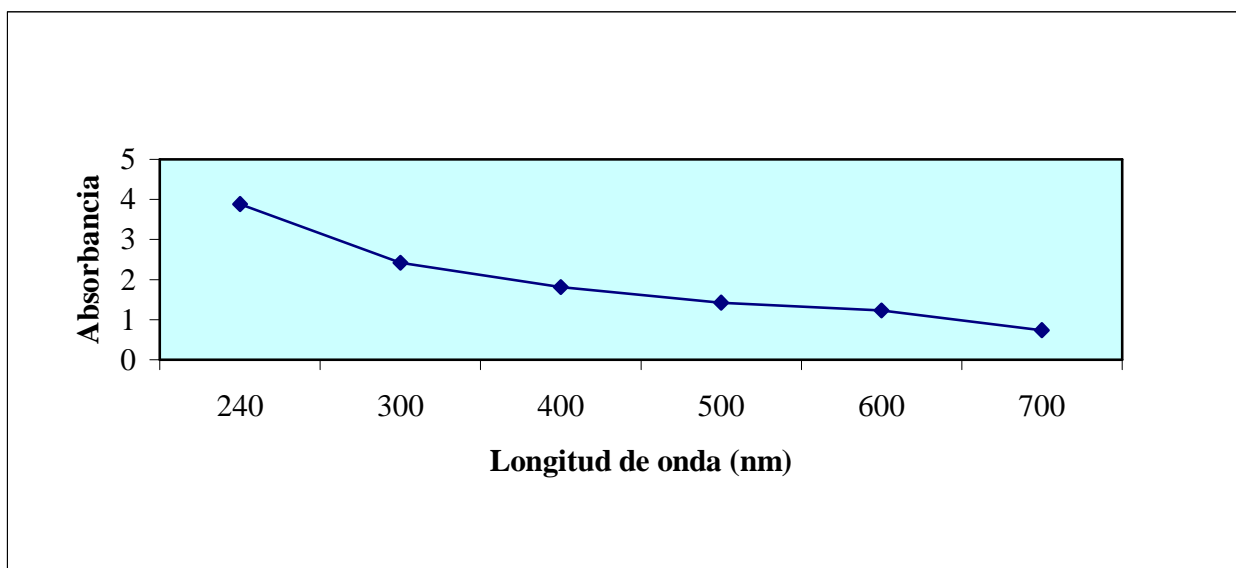
**Figura 3.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 3



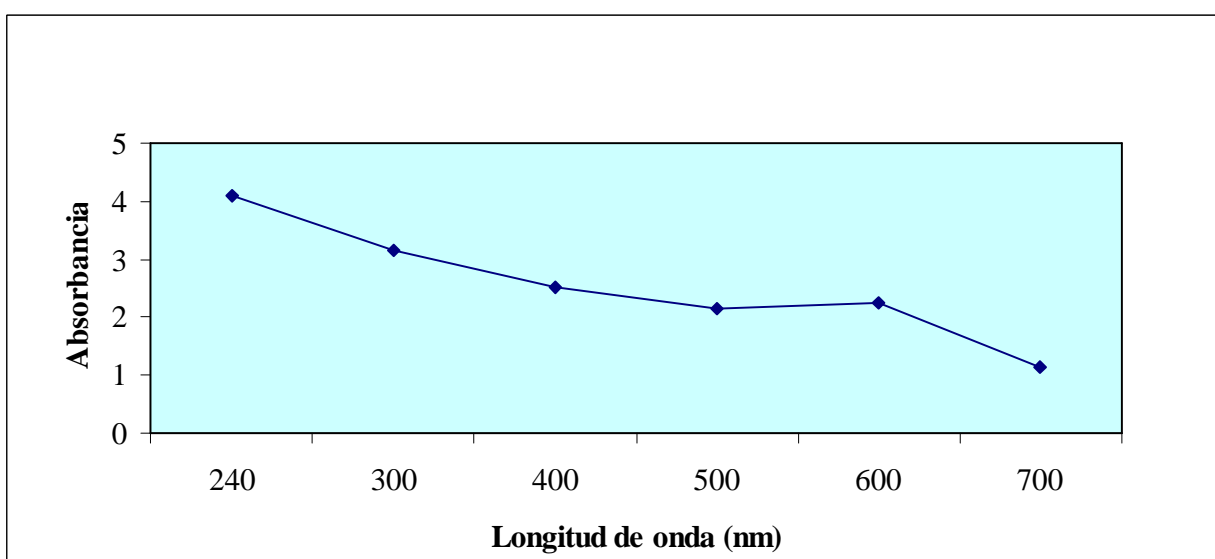
**Figura 4.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 4



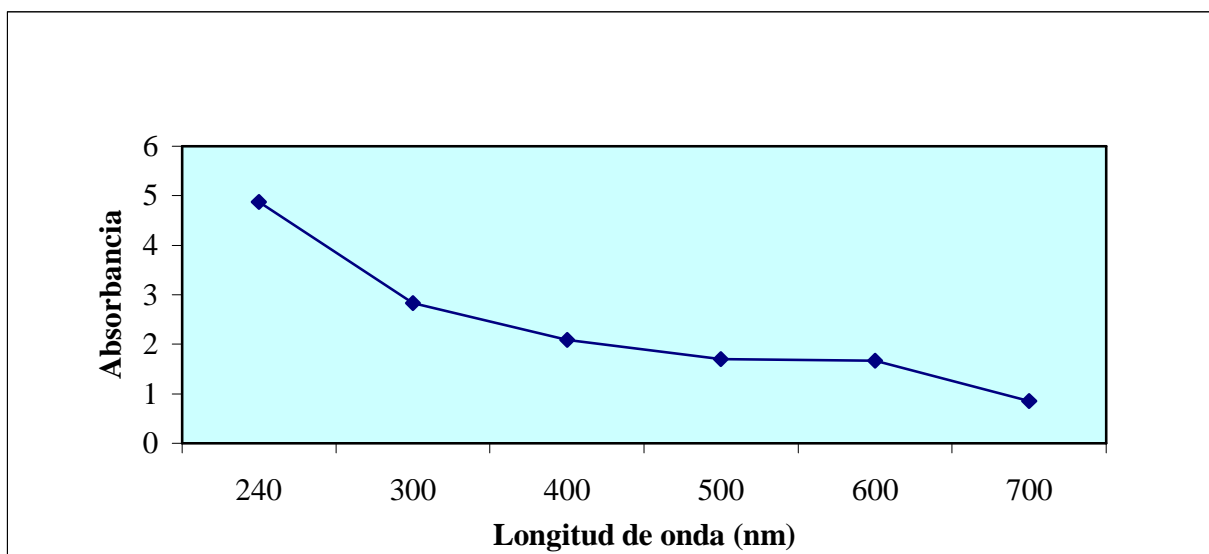
**Figura 5.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 5



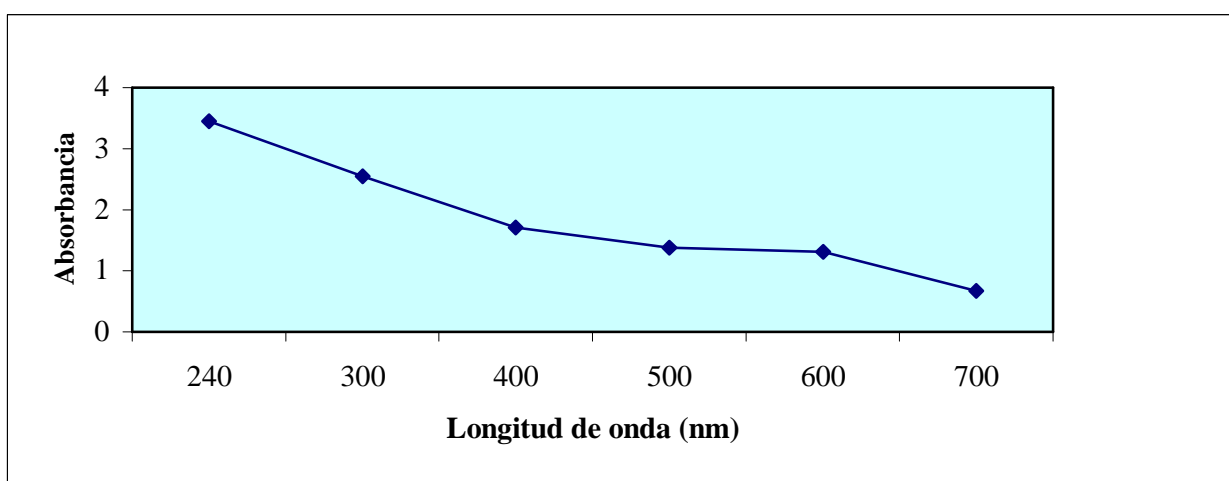
**Figura 6.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 6



**Figura 7.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 7

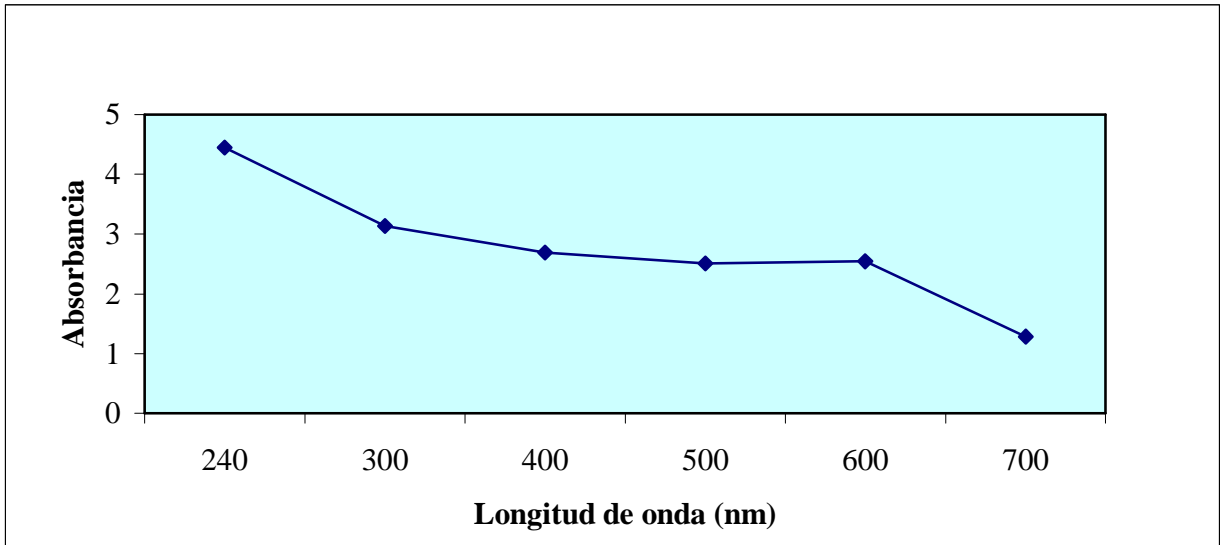


**Figura 8.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 8

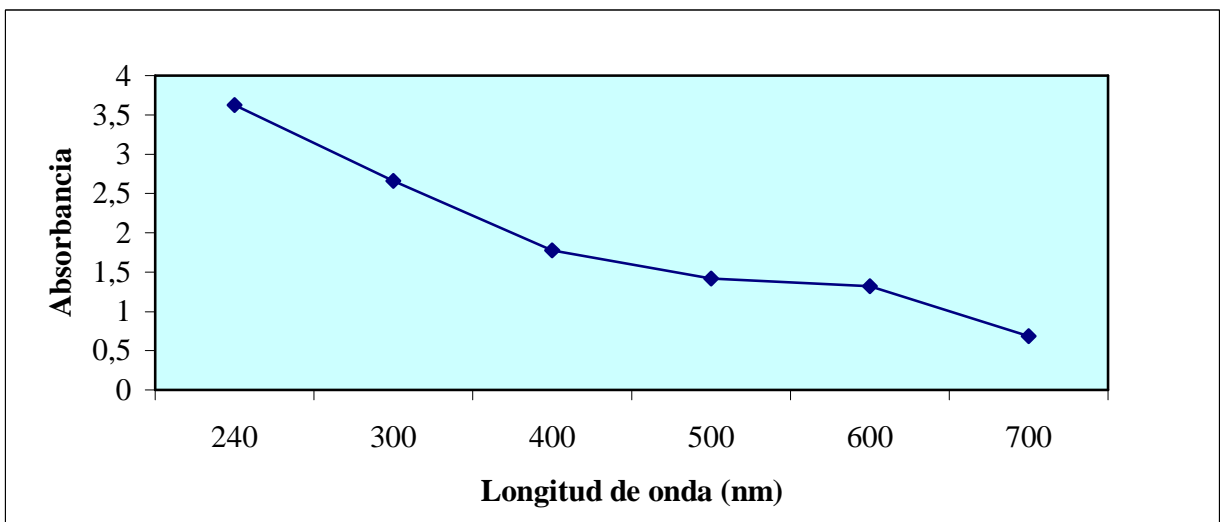


**Figura 9.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 9





**Figura 10.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 10



**Figura 11.** Gráfico de espectro UV/visible de la solución de la masa bacteriana de *Chromobacterium* a pH 11