

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

# Consideraciones de atención de la Cromogénesis en *Bacillus spp* Care considerations of Chromogenesis in *Bacillus spp*

J. J. Hernández-Ruíz,<sup>a</sup> L. Sandoval-Flores<sup>a,\*</sup>

Recibido: 08 de marzo de 2016

Aceptado: 08 de agosto de 2017

### PALABRAS CLAVE:

Melanina;  
Resistencia;  
*Bacillus*; Pigmento;  
Espora bacteriana;  
Metabolismo;  
Esporulación.

### KEY WORDS:

Melanin;  
Resistance;  
*Bacillus*, Pigment;  
Bacterial spore;  
Metabolism;  
Sporulation.

### RESUMEN

La melanina es uno de los pigmentos más comunes y de mayor distribución en la naturaleza, incluida en algunos géneros de bacterias producidas en determinados medios y condiciones ambientales, cuyas aplicaciones son potenciales. Se hace una recopilación de las publicaciones sobre la pigmentación *Bacillus spp*, resaltando su contribución a la supervivencia en el ambiente y las condiciones necesarias para que este microorganismo produzca pigmento.

### ABSTRACT

Melanin is one of the most common pigments and most widely distributed in nature, including some bacterium genus, without known biological functions, produced in some mediums and with a specific environment conditions with many different potential applications. This review aims to make a compendium of publications on pigmentation of *Bacillus spp*, its important contribution to survival in the environment and the necessary conditions for the microorganism to produce the pigment.

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, México.

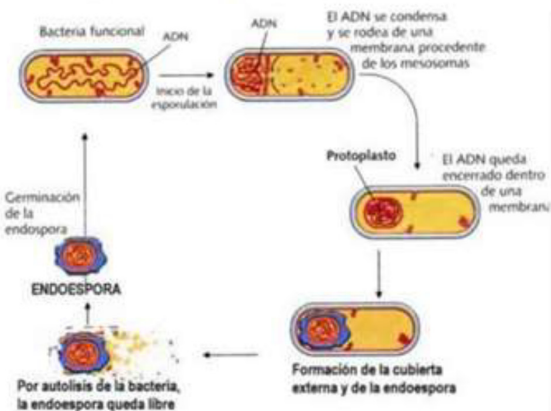
\* Autor para correspondencia: lilisf@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

El género *Bacillus* es prototipo de la familia *Bacillaceae*, son bacterias Gram positivas cuyo tamaño va de 4 a 10  $\mu\text{m}$ , son esporulados, no exigentes y en general móviles. Tiene bacterias aerobias estrictas (*B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, etc.) y bacterias anaerobias facultativas (*B. cereus*, *B. infernus*, entre otros); está distribuido en la naturaleza debido a su versatilidad metabólica y presencia de una estructura de resistencia (endospora). Algunos forman parte de la flora normal y suelen ser un contaminante común.

Este género cuenta con una diversidad de tipos fisiológicos, algunas de sus características son: degradación de la mayoría de los sustratos derivados de plantas y animales (celulosa, almidón, pectina, proteínas, agar, hidrocarburos y otros); capacidad para el proceso de nitrificación-desnitrificación, el cual tiene como objetivo la eliminación de nitrógeno residual; litotrofia facultativa; crecimiento a temperaturas frías o elevadas; acidofilia (preferencia por un medio ácido); alcalofilia (preferencia por un medio básico) y parasitismo, las cuales ejemplifican su capacidad de sobrevivir en diversos ambientes.

**Figura 1. Formación de la endospora bacteriana**



Fuente: Tejera B, et al. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. CENIC. 2011; 42 (3): 131-138. Consultado el 17 de diciembre de 2015. <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>

Su ciclo de vida se divide en dos fases: crecimiento vegetativo y esporulación. Durante el primer estado, la bacteria crece de forma exponencial cuando se encuentra en un medio favorable; cuando hay pocos nutrientes, la bacteria esporula (Figura 1) forma una endospora, que puede permanecer viable en el ambiente durante largos períodos de tiempo hasta que las condiciones se tornen propicias para retomar su forma vegetativa.<sup>1</sup>

La espora es una capa proteica externa que rodea al ácido desoxirribonucleico ADN bacteriano, proporcionándole resistencia física, química y enzimática; debajo de

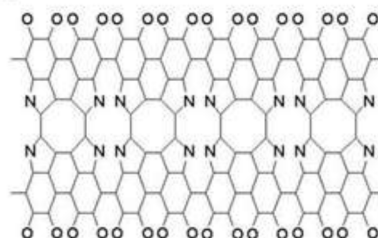
ésta existe una capa gruesa de peptidoglicano especializada, la corteza, la cual está en estado deshidratado y contiene ADN de la célula, ribosomas y grandes cantidades de ácido dipicolínico. La pared celular del microorganismo está debajo de la corteza y la membrana interna debajo de la pared celular, que es una barrera importante de permeabilidad contra productos químicos perjudiciales.<sup>2</sup>

Ciertos miembros del género tienen implicaciones médicas debido a la producción de antibióticos, como la bacitracina producida por *B. subtilis* o por enfermedades que provocan, como el caso de *B. anthracis*, agente causal del carbunco. Asimismo, este género tiene uso industrial en la producción de enzimas, como la lipasa producida por la cepa *B. pumilus* GMA1,<sup>3</sup> en la producción de vitaminas, por ejemplo la B12 por acción de *B. megaterium* y como bioindicador (organismo vivo que se utiliza para determinar y evaluar el índice de contaminación de un lugar), la *B. stearothermophilus*, que se usa como control biológico en el autoclave y la *B. subtilis* empleada como control en el horno Pasteur.

Otra característica importante en los cultivos de algunas especies de este género es su proceso de Cromogénesis o pigmentación de colonias bacterianas. En ciertos organismos el pigmento producido es retenido dentro de las células y su masa celular se colorea (como la clorofila presente en algunas células eucariotas), en otras especies, por el contrario, el pigmento es expulsado al medio de cultivo, como en el caso del pigmento cinnabarina naranja producido por hongos, uno de ellos el *Pycnoporus sanguineus*;<sup>4</sup> éstos pigmentos pueden ser solubles o insolubles en agua, pero no son producidos en todos los medios de cultivo ni bajo todas las condiciones ambientales.<sup>5</sup>

Algunas cepas del género *Bacillus*, como *B. subtilis*, presentan pigmentación marrón; roja para la *B. megaterium*<sup>6</sup> y rosa en algunos aislamientos de *B. firmus*.<sup>7</sup> La cepa de *Bacillus subtilis* que produce pigmento naranja se le conoce como *Bacillus subtilis* var. *niger* (*Bacillus globigii* DSM 2277). Recientemente, con base en estudios en reasociación de ADN, a este organismo se le reclasificó como *Bacillus atrophaeus*.<sup>8</sup>

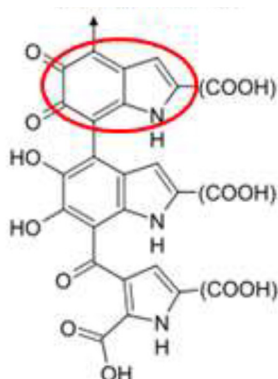
**Figura 2. Estructura teórica de la melanina**



Fuente: A. Solís-Herrera. Melanina, la clorofila humana, su papel en el origen de la vida y la posibilidad de que sea la tan buscada materia oscura (dark matter) en el universo. 2009. P. 21.

La producción del pigmento bacteriano se relaciona con el tipo de cultivo y la composición del mismo; por lo tanto, se ve afectado por la presencia o ausencia de fuentes de carbono y/o nitrógeno orgánico e inorgánico,<sup>9</sup> además la existencia de componentes como sales, aminoácidos (tirosina e histidina), entre otros, contribuyen a la inhibición o estimulación de la síntesis.<sup>10</sup>

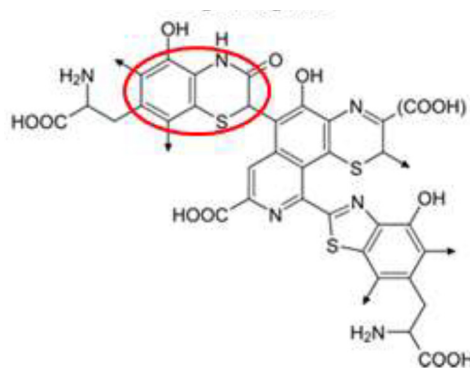
**Figura 3. Estructura química de la eumelanina se destaca la estructura indólica**



Fuente: Quimitube.com (<http://www.quimitube.com/rayos-ultravioleta-melanina-quimica-ponerse-moreno>).

Estudios sobre los pigmentos cafés de estas cepas revelan que dichos compuestos son melanina,<sup>11</sup> que se encuentra entre los materiales bioquímicos resistentes y estables, mismos que se les considera como un grupo amplio de sustancias (colorantes) que tienen propiedades similares y que se encuentra distribuido en todos los reinos biológicos.<sup>12</sup> Por lo general, se describe como un pigmento oscuro porque la estructura de la melanina (Figura 2) absorbe las longitudes de onda del espectro visible<sup>13</sup> y por ello se percibe oscura, sin embargo existen otros tipos de melanina que una variedad de colores debido a que estos compuestos se encuentran unidos a cromóforos, responsables de absorber de manera selectiva una longitud de onda; por ejemplo, la eumelanina (Figura 3) que se caracteriza por su coloración café o negra debido a sus estructuras indólicas; mientras que las feomelaninas son rojas o amarillas gracias a las unidades de benzotiazina presentes en su estructura<sup>14</sup> (Figura 4).

**Figura 4. estructura química de la feomelanina se destaca la estructura benzotiazina**



Fuente: pelirrojos.org (<http://www.pelirrojos.org/porque-el-pelo-es-pelirrojos.php>).

Es importante mencionar la existencia de otros tipos de melanina, como la alomelanina, DH-melanina y DOPA-melanina, producidas por ciertas clases de hongos implicados en la virulencia del microorganismo.<sup>15</sup>

#### Biosíntesis de la melanina

La eumelanina y la feomelanina son compuestos hidrofóbicos de alto peso molecular, se forman a través de la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos a partir del mismo precursor, la dopaquinona, que a su vez proviene de la tirosina.<sup>14,16</sup>

El primer paso en la formación de eumelanina es la ortodioxilación de la monofenol L-tirosina a o-difenol (actividad de creolasa o monofenolasa) por la enzima tirosinasa para dar lugar a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), usando oxígeno molecular; el segundo es la oxidación del o-difenol (actividad difenolasa o catecolasa) a dopaquinona en presencia de oxígeno molecular. La dopaquinona es un compuesto reactivo que espontáneamente sufre ciclización intramolecular para formar leucodopacromo, el cual se convierte en dopacromo. Reacciones de oxidación espontáneas subsecuentes dan lugar a los compuestos 5,6-dihidroxiindol (DHI) y ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA). La polimerización, también espontánea, de dopacromo, (DHI), (DHICA) y sus correspondientes quinonas causa la formación de la eumelanina.<sup>17</sup>

La síntesis de feomelanina inicia, del mismo modo, con la acción de la tirosinasa sobre la L-tirosina, sin embargo, la presencia de L-cisteína en el medio de reacción da lugar a la formación de derivados tioles, entre los cuales predomina la 5-S cisteinildOPA (5-S-CD). La oxidación de los derivados tioles vía la formación de intermediarios de benzotiazina y da lugar a la formación de feomelanina.<sup>18</sup>

La síntesis de otros tipos de melaninas sigue una ruta similar, pero utilizando diferentes sustratos; la presencia de mezclas de sustratos (aminoácidos, péptidos u otros) durante el proceso da lugar a la síntesis de melaninas con una composición química heterogénea.<sup>19</sup>

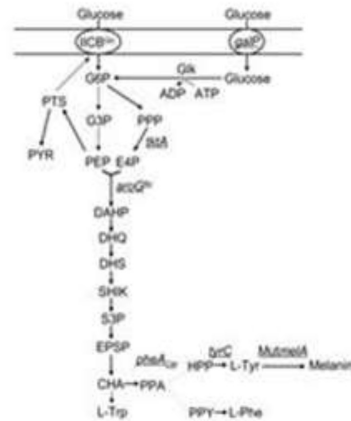
### Los microorganismos y la melanina

Entre los microorganismos que se han reportado como productores de melanina se encuentran: *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium leprae*, *Bacillus thuringiensis*, *Schistosoma mansoni*, *Fasciola gigantita*, *Trichuris suis*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Cladosporium carionii*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*, *Fonsecaea pedrosoi*, esto tomar en cuenta los hongos dematiáceos.

La producción de melanina en estos microorganismos es inducida en respuesta al estrés, particularmente al cambio hiperosmótico y a elevadas temperaturas; se asocia a su capacidad de sobrevivir en estuarios durante el verano.<sup>12</sup>

Actualmente, se han encontrado otras formas de inducir la producción de melanina en ciertas bacterias que no la producen, una de ellas es mediante la extracción de un gen que codifique para la tirosinasa de un microorganismo donante; posteriormente se añade este gen a la cepa no productora. Se tienen registros de experimentos de formación de cepas mutantes de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* mediante la agregación de un gen procedente de *Rhizobium etli*, el cual codifica para la tirosinasa, logrando que las cepas de *E. coli* y *B. subtilis* produzcan melanina.<sup>20, 21</sup> Otra forma es mediante la mutación de cepas por acción de agentes mutagénicos, como la cepa 407-P de *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407 que después de ser tratado con etil-metano-sulfonato comienza a producir melanina.<sup>22</sup> Algunas especies del género *Bacillus*, como se mostró anteriormente, pueden producir melanina después de tratamientos genéticos o mediante mutagénesis química; sin embargo, existen especies que la producen sin intervención humana, por ejemplo, por las cepas de *Bacillus subtilis* que tienen un gen que codifica para una enzima llamada lacasa, la cual que se deposita y acumula en la capa externa de la espora, responsable de oxidar compuestos fenólicos como la tirosina para convertirla en L-DOPA, después de una serie de reacciones (de las que se existe poca referencia) se sintetiza la melanina.<sup>23</sup>

**Figura 5. Vías metabólicas relacionadas con la tirosina en biosíntesis de la melanina en *Escherichia coli* recombinante<sup>20</sup>**



Flechas discontinuas indican dos o más reacciones. Plásmidos se encuentran subrayados. Abreviaturas: PTS, enzima I y proteína transportadora de fosfohistidina; iICBGlc, permeasa de glucosa integral de membrana; galP, galactosa permeasa; Gik, glucoquinasa; tktA, transketolasa; ATP, adenosin trifosfato; ADP, adenosin difosfato; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; G6P, glucosa-6-fosfato; E4P, D-eritrosa 4-fosfato; PEP, fosfoenilpiruvato; PYR, piruvato; DAHP, 3-desoxi-D-arabino-7-heptulosonato-6-fosfato; DHQ, ácido 3-dehidroquinico; DHS, deshidrosiquimato; SHK, siquimato; S3P, siquimato 3-fosfato; EPSP, 5-enolpiruvilsiquimato 3-fosfato; CHA, corismato; PPA, prefenato; HPP, 4-hidroifenilpiruvato; PPY, fenilpiruvato; L-Tyr, L-tirosina; L-Phe, L-fenilalanina; L-Trp, L-triptófano; aroG<sup>trc</sup>, resistente a la inhibición por retroalimentación DAHP sintasa; tyrC, ciclohexadienilo deshidrogenasa; pheACM, dominio corismato mutasa.

Fuente: Martínez A, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to optimize melanin synthesis from glucose. *BioMed Central*. 2013; 108: 1-12

El sustrato inicial de la síntesis de la melanina es la tirosina, se piensa que estas bacterias las obtienen del medio o ruta metabólica alterna similar a la establecida por un grupo de investigadores de la UNAM, quienes trabajaron con una cepa mutante de *E. coli*; éstos demostraron que la tirosina proviene de la glucosa después de una serie de reacciones<sup>20</sup> (ver figura 5).

También se ha confirmado que *B. weihenstephanensis* es productor de la enzima lacasa, pero a su vez sintetiza otras enzimas implicadas en la síntesis de la melanina como fenil-alanina 4-monooxigenasa, deshidratasa pterina-4-alfa-carbinolamina, aminotransferasa de aminoácidos aromáticos y 4-hidroifenilpiruvato dioxigenasa.<sup>24</sup>

### Funciones de la melanina

Algunas propiedades fisicoquímicas de las melaninas son:

- Electrónicamente estables.
- Tienen amplia banda de absorción en la región visible y ultravioleta.

- Fotoconductoras y semiconductoras, lo que las convierte en una nueva clase de biomateriales tecnológicos que podrían ser utilizadas en el desarrollo de actuadores, tejidos artificiales, aparatos fotovoltaicos, optoelectrónicos y fotónicos. También se usan en el diseño de sensores químicos y de humedad.
- Presentan varias funciones biológicas, incluyendo fotoprotección, termorregulación, supresión de la acción de radicales libres, quelantes de cationes y antibióticos.<sup>11, 25</sup>
- Pueden proteger a los microorganismos contra agresiones del ambiente porque poseen efecto mosquitocidas y larvicidas, por ello, se puede utilizar en la creación de plaguicidas y/o fertilizantes.<sup>26, 27</sup>
- Actúan como un componente antigénico del microorganismo, ya que la melanina bloquea mecanismos inmunes del hospedero, los cuales le ayudan a superar la agresión al microorganismo.

Asimismo, se demostró en 168 esporas de *B. subtilis* una pigmentación marrón, especialmente producida en la presencia de cobre, resultado de un aumento en la resistencia a los rayos UV-B y UV-A de radiación de uno a dos órdenes de magnitud en comparación con las esporas no pigmentadas.<sup>28</sup>

## PERSPECTIVAS

Autores han establecido que la melanina aumenta la resistencia de las esporas para el género *Bacillus*, pero también hay quienes afirman que los pigmentos no restan o adicionan resistencia a la spora; lo cierto es que faltan estudios y experimentos que esclarezcan las rutas metabólicas de síntesis. A lo largo de la investigación se hizo hincapié en el potencial de las melaninas como un nuevo biomaterial con múltiples aplicaciones; por lo tanto, es importante establecer un medio de cultivo y condiciones ambientales necesarias para obtener dicha sustancia y un buen rendimiento.

Otro factor relevante es saber qué más aportan los pigmentos a estas bacterias. Además de lo citado se encontró que la síntesis de la melanina es costosa para la bacteria, energéticamente hablando. Resultó irónico que la bacteria en situaciones adversas realice un procedimiento que le reste energía, entonces ¿qué más hace la melanina en favor de la bacteria para que ésta justifique su síntesis si le conlleva un mayor gasto energético?

En el libro *Melanina, la clorofila humana, su papel en el origen de la vida y la posibilidad de que sea la tan buscada materia oscura (dark matter) en el universo*, del científico mexicano Solís Herrera, quien se ha dedicado a investigar sobre la melanina, principalmente sus propiedades fotoelectroquímicas y la generación de energía eléctrica, formula la siguiente analogía: “La melanina es al reino animal lo que la clorofila es al reino vegetal,”<sup>13</sup> afirmación sorprendente y a primera vista difícil de creer;

sin embargo el autor propone que la melanina es capaz de disociar la molécula del agua utilizando toda la energía que absorbe del espectro electromagnético al hacerlo genera gases de hidrógeno y oxígeno (H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, respectivamente). Cuando una molécula se disocia se consume energía, pero si se combinan los productos para llegar a un estado de menor energía el proceso será exotérmico; por lo tanto, la disociación de la molécula de agua es un proceso autosustentable y, según el autor, esta reacción suministra la fuerza primordial o inicial a un organismo para que metabolice otros nutrientes, como los obtenidos por el alimento.

Finalmente, las bacterias del género *Bacillus* optan por producir melaninas cuando escasean los nutrientes y el agua del medio, ya que estos pigmentos serían una especie de detonador que le permitirá al microorganismo, una vez que tenga nuevamente nutrientes y agua, generar energía por medio de una reacción autosustentable y desencadenar sus demás reacciones metabólicas que le posibiliten usar estos nuevos nutrientes y por consiguiente desarrollarse. Sin embargo, estas ideas son conjeturas basadas en información reportada; hacen falta modelos experimentales para comprobar o refutar lo anterior.

Financiamiento

No se recibió ningún patrocinio para llevar a cabo este artículo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## REFERENCIAS:

1. Tejera B, Rojas Badia MM, Heydrich Pérez M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. CENIC. 2011; 42 (3): 131-138.
2. Cornell Cals Collage of Agriculture and Life Sciences. Endospora de bacterias, [en línea]. s.f. [consultado el 17 de diciembre de 2015]. Disponible en <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/espanol/endospora-de-bacterias>
3. Wong P, Ferres A. Lipasa termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: Producción fermentativa y algunas propiedades [en línea]. [consultado el 18 de enero de 2016]. Disponible en [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA\\_XIV/CXIV-9.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XIV/CXIV-9.pdf)
4. Cruz Muñoz R, Piña Guzmán B, Yáñez Fernández J, et al. Producción de pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido. Agrociencia. 2015; 49 (4): 347-359.
5. Grimont P, Grimont F. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: Bergey DH. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore; 1984; p. 1104-1207.

6. Mitchell C, Iyer S, Skomurski JF, et al. Red pigment in *Bacillus megaterium* spores. Appl. Environ. Microbiol. 1986; 52 (1): 64-67.
7. Pane L, Radin L, Franconi G, et al. The carotenoid pigments of a marine *Bacillus firmus* strain. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1996; 72 (11-12): 303-308.
8. Fritze D, Pukall R. Reclassification of bioindicator stains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001; 51 (Pt1): 35-37.
9. Torres A, Bonilla G. Estudio de la relación carbono/nitrógeno y su influencia en la síntesis de prodigiosín a partir de *Serratia spp.* [tesis doctoral]. Medellín: Universidad de Antioquia; 1999.
10. Kerr J. Phenazine pigments: antibiotics and virulence factors. Infect. Dis. Rev. 2000; 2: 184-194.
11. Gómez Marín AM, Naranjo Fernández D, Montoya OI, et al. Efecto de Algunos Componentes del Medio de Cultivo en la Producción de Melanina Bacteriana. Biotecnología. 2009; 13 (2): 11-23.
12. Urán ME, Cano LE. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. Infectio. 2008; 12 (2): 128-148.
13. Solís Herrera A. Melanina, la clorofila humana, su papel en el origen de la vida y la posibilidad de que sea la tan buscada materia oscura (dark matter) en el universo: Mundi Comunicaciones; 2009
14. González Orive A. Electrogeneración de películas ultradelgadas de melanina: nanoestructura, electrocatálisis, conductividad, magnetismo y fotorrespuesta [tesis doctoral]. España: Universidad de la Laguna; 2013. [consultado el 17 de diciembre de 2015]. Disponible en <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/64>
15. Urán J ME, Castañedo A LM, Restrepo MA, et al. Expresión de melanina en *Paracoccidioides brasiliensis*: inducción química con L-DOPA y L-epinefrina. Medicina U.P.B. 2008; 27 (1): 17-24.
16. Hamilton A, Gómez B. Melanins in fungal pathogens. J Med Microbiol. 2002; 51 (3):189-191.
17. Lagunas Muñoz VH. Estudio paramétrico para la producción de melanina en *Escherichia coli* recombinante [tesis]. México: Instituto Tecnológico De Celaya; 2004.
18. Ozeki H, Ito S, Wakamatsu K, et al. Chemical Characterization of pheomelanogenesis starting from dihydroxyphenylalanine or tyrosine and cysteine. Effects of tyrosinase and cysteine concentrations and reaction time. Biochem. Biophys. 1999; 1336 (3): 539-548.
19. Della Cioppa G, Garger SJ, Sverlow GG, et al. Melanin production in *Escherichia coli* from a cloned tyrosinase gene. Bio/Technology. 1990; 8(7): 634-638.
20. Chávez Béjar MI, Balderas Hernández VE, Gutiérrez Alejandro A, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to optimize melanin synthesis from glucose. BioMed Central. 2013; 108: 1-12.
21. Robledo Arratia L, Cabrera Valladares N, Martínez A, et al. EXPRESIÓN DEL GEN mela DE *Rhizobium etli*, QUE CODIFICA PARA UNA TIROSINASA, EN *Bacillus subtilis*, [en línea]; 2001. Disponible en [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area\\_VII/Orales/OVI-19.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_VII/Orales/OVI-19.pdf)
22. Vilas-Boas GT, Vilas-Boas LA, Braz VT, et al. Isolation and partial characterization of a mutant of *Bacillus thuringiensis* producing melanin. Microbiol. 2005; 36 (3): 271-274.
23. Hullo MF, Moszer I, Danchin A, et al. CotA of *Bacillus subtilis* is a Copper-Dependent Laccase. J Bacteriol. 2001; 183 (18): 5426-5430.
24. Drewnowska JM, Zambryzycka M, Kalska Szostka B, et al. Melanin-Like Pigment Synthesis by Soil *Bacillus weihenstephanensis* Isolates from Northeastern Poland. PLOS ONE. 2015; 10(4): 1-15.
25. Kiruthika P, Boominathan M. Isolation, purification and characterization of Biologically active melanin from marine *Streptomyces*. American Journal of Biological and Pharmaceutical Research. 2015; 2 (2): 75-80.
26. Jianping Z, Jun C, Yinyue D, et al. Characterization of melanin produced by a wild-type strain of *Bacillus cereus*. Front. Biol. 2007; 2(1): 26-29.
27. Ochoa G, Arrivillaga J. *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. Bol Mal Salud Amb. 2009; 49 (2):181-191.
28. Moeller R, Hornecke, Facius R, et al. Role of pigmentation in protecting *Bacillus sp.* endospores against environmental UV radiation. FEMS Microbiol Ecol. 2005; 51(1): 231-236.