

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA A PARTIR DE CLAVES TAXONÓMICAS Y TÉCNICAS QUÍMICAS DE UN AISLAMIENTO AMBIENTAL DE LA SECCIÓN *NIGRI* CON PRODUCCIÓN DE PIGMENTO CON POSIBLE USO INDUSTRIAL.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION BASED ON TAXONOMIC KEYS AND CHEMICAL TECHNIQUES OF AN ENVIRONMENTAL ISOLATED OF THE NIGRI SECTION WITH PIGMENT PRODUCTION WITH POSSIBLE INDUSTRIAL USE

Eder Andrés Vélez Restrepo^{1,3}, Diana Carolina Restrepo^{2,3}, Ángela María López García^{3,4}, Álvaro León Rúa Giraldo^{3,4}

¹ Estudiante Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.

² Docente Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia.

³ Unidad de Biología celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas.

⁴ Docente, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.

RESUMEN

Dentro del género *Aspergillus* se destaca la sección *Nigri*, ampliamente distribuido a nivel mundial, el cual presenta colonias oscuras de color negro característico. Su taxonomía es de las más complejas dentro del género, lo que ha derivado en la existencia de errores en la clasificación de especies, debido a que las diferencias que se describen entre distintos taxones son muy sutiles, en consecuencia, se sugiere una clave de identificación de las especies más comunes haciendo uso de criterios morfológicos. Así como las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* pueden encontrarse en muchos hábitats naturales también pueden aislarse en ambientes interiores, siendo causante del deterioro de alimentos y enfermedad pulmonar humana. Los hongos naturalmente producen extractos pigmentados característicos específicos de su especie, lo que en cierta medida ayuda a su identificación, de acuerdo con esto, las conidias de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* pueden aparecer de color marrón oscuro u oliva dando como resultado una mezcla de coloración negruzca.

Acorde a lo descrito, para este trabajo se hizo una caracterización morfológica y química para varios aislamientos ambientales perteneciente a la colección de aislamientos del grupo de Biología Celular y Molecular Cib-Universidad de Antioquia, obteniendo resultados específicos para el aislamiento ambiental perteneciente a *Aspergillus* sección *Nigri* M2ARO2.3, tras la caracterización morfológica fue posible analizar las características de crecimiento macros y microscópicas con el propósito corroborar las características descritas en la literatura para la taxonomía de la sección *Nigri*, posteriormente se realizó un ensayo *in house* donde se evaluaron las condiciones de cultivo y medios BHI y CYA que favorecieron la producción de pigmentos secretados al medio, logrando determinar condiciones óptimas que permitieran estandarizar un método de obtención. Al no poder establecer las condiciones de crecimiento que favorecieran la liberación del pigmento en los medios descritos anteriormente, se procedió a realizar lavados de conidias con agua purificada directamente en las placas de Petri, lo cual permitió una liberación instantánea de pigmentación directa (observable a la vista) para soluciones en PBS y agua para los aislamientos: MAA-1, MAA-5 y M2ARO2.3. Adicionalmente, una vez obtenidos los extractos fúngicos pigmentados, por medio de tamizaje químico y análisis espectral fue posible reconocer un metabolito secundario soluble en etanol y de coloración amarilla, similar a pigmentos amarillos reportados en la literatura para especies de *Aspergillus* como *niger* y *flavus*, el cual puede tener utilidad como posible colorante de uso industrial en futuros estudios.

Palabras Claves: *Aspergillus niger*, sección *Nigri*, criterios morfológicos; metabolitos secundarios; pigmentos fúngicos.

ABSTRACT

Within the *Aspergillus* genus, *Nigri* section stands out, which is widely distributed worldwide, for presenting dark colonies of a characteristic black color. Its taxonomy is one of the most complex within the genus, which has led to the existence of errors in the classification of species, because the differences described between different taxa are very subtle, consequently, an identification key is suggested. of the most common species using morphological criteria. Just as *Aspergillus* section *Nigri*

species can be found in many natural habitats, they can also be isolated indoors, causing food spoilage and human lung disease. Fungi naturally produce characteristic pigmented extracts specific to their species, which to some extent aids their identification, accordingly conidia of *Aspergillus* section *Nigri* species may appear dark brown or olive in color resulting in mixed coloration blackish.

According to that described, for this work a morphological and chemical characterization was made for several environmental isolates belonging to the collection of isolates of the Cellular and Molecular Biology Group Cib-Universidad de Antioquia, obtaining specific results for the environmental isolate belonging to *Aspergillus* section *Nigri* M2ARO2.3, after the morphological characterization it was possible to analyze the macroscopic and microscopic growth characteristics with the purpose of corroborating the characteristics described in the literature for the taxonomy of the *Nigri* section, later an *in-house* test was carried out where the conditions were evaluated of culture and BHI and CYA media, which favored the production of pigments secreted into the medium, managing to determine optimal conditions that would allow standardizing a method of obtaining. Since it was not possible to establish the growth conditions that favored the release of the pigment in the media described above, it was decided to wash the conidia with purified water directly in the Petri dishes, which allowed an instantaneous release of direct pigmentation (observable by eye) for solutions in PBS and water for the isolates: MAA-1, MAA-5 and M2ARO2.3. Additionally, once the pigmented fungal extracts were obtained, by means of chemical screening and spectral analysis it was possible to recognize a secondary metabolite soluble in ethanol and yellow in color, similar to yellow pigments reported in the literature for *Aspergillus* species such as *niger* and *flavus*, the which may be useful as a possible dye for industrial use in future studies.

Keywords: *Aspergillus niger*, *Nigri* section, morphological criteria, secondary metabolites; fungal pigments.

INTRODUCCIÓN

En 1729 el género *Aspergillus* fue descrito por Micheli, dentro del cual destaca la sección *Nigri* por presentar colonias de color negro con conidióforos uniseriados o biseriados, encontrándose ampliamente distribuido a nivel mundial, especialmente en suelos tropicales y subtropicales (1,2). La sección *Nigri* pertenece al subgénero *Circumdati* (2,3). Su taxonomía es de las más complejas dentro del género, lo cual ha dado lugar a diferentes propuestas de clasificación (2,4). En consecuencia, se han presentado errores en la clasificación de especies ya que las diferencias que se describen entre distintos taxones son muy sutiles, por lo que ante esta problemática se sugirió una sencilla clave de identificación de las especies más comunes, haciendo uso de criterios morfológicos (2).

Recientemente Samson et. al (5), describieron nuevas especies dentro de la sección, aceptando hasta 15 taxones, basando en la diferenciación entre especies por los perfiles de metabolitos secundarios y características morfológicas tales como: presencia y coloración de esclerocios, tamaño de conidias, coloración y diámetro de las conidias. Estas características han permitido a los hongos de

este género la capacidad de poder encontrarse en muchos hábitats naturales, incluso también en ambientes interiores (5), razón por la cual son causantes del deterioro de alimentos y enfermedades pulmonares en seres humanos, pero también siendo reconocidos como grandes productores de enzimas y ácidos orgánicos.

La diversidad de pigmentos que son sintetizados y secretados por los hongos ascomicetos como metabolitos secundarios en el citoplasma celular son una respuesta a condiciones ambientales adversas (6,7). Tienen un papel fundamental en la supervivencia del hongo, por ejemplo, las melaninas le brindan protección contra la fotooxidación que puede ser letal, y las flavinas actúan como cofactores en la catálisis enzimática (8).

La demanda de pigmentos de origen natural a nivel industrial a partir de hongos filamentosos viene en aumento como una alternativa de sustitución a los pigmentos sintéticos y sus limitaciones (9). Los hongos naturalmente producen extractos pigmentados característicos, que son específicos de su especie lo que en cierta medida ayuda a su identificación, las conidias de las especies de la sección *Nigri* pueden aparecer de color

marrón oscuro y de oliva a negro (5), dando como resultado una mezcla de coloración negruzca (10). Estos pigmentos oscuros característicos de la especie *A. niger* son pertenecientes a la familia de las melaninas que consisten en estructuras producidas a partir de diferentes precursores como L -3,-4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA), L-tirosina, etc. (11,12).

De acuerdo con lo expuesto y considerando la disponibilidad limitada de aislamientos ambientales locales caracterizados a nivel morfológico, en este trabajo se planteó como objetivo realizar la caracterización morfológica y química de aislamientos locales de *Aspergillus* sección *Nigri*, provenientes de la colección de aislamientos del Grupo de Biología Celular y Molecular CIB-UdeA, mediante el uso de claves taxonómicas para confirmar su identidad y aplicando técnicas de cromatografía de capa fina (CCF) para el estudio de los pigmentos seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos y caracterización morfológica

De los aislamientos disponibles de la sección *Nigri* se emplearon las cepas con código: MAA1, MAA5 y M2ARO2.3, las cuales se recuperaron del banco de conidias del grupo que se encontraban almacenadas a -80°C en agua purificada, estas se repicaron en los medios de Agar papa dextrosa (PDA), extracto de malta (MEA) y medio Czapek extracto de levadura (CYA) para lograr su identificación según características morfológicas macro y microscópicas considerando las claves taxonómicas para el género *Aspergillus* disponibles (13,14).

Se establecieron las condiciones óptimas para el crecimiento en estos tres medios de cultivo, empleando el sistema de clasificación Klich & Pitt (15,16) que establece incubar a dos temperaturas diferentes (37 °C y 25 °C) por 7 días y sembrando 2 uL a una concentración de conidias óptima, en 3 puntos diferentes a igual distancia dentro de la misma placa de Petri. Se realizó el respectivo seguimiento para el registro de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas para el aislamiento M2AR02.3 a los 7 días de crecimiento.

Ensayo de condiciones de cultivo para producción de pigmentos

Para establecer condiciones *in vitro* adecuadas que favorecieran una mayor producción de pigmentos para los aislamientos seleccionados (MAA-1, MAA-5 Y M2AR02.3), se tomó inicialmente un preinóculo de 10 uL sin considerar la concentración, a partir del banco de conidias almacenado en agua purificada a -80 °C y se cultivó en medio PDA sólido. Los medios se incubaron a 25 °C por 5 a 7 días según el tiempo estimado para lograr crecimiento óptimo para hongos filamentosos; este procedimiento se realizó por duplicado. Estas colonias fueron utilizadas para determinar el número de conidias en cámara Neubauer, para obtener una concentración óptima del hongo en 250 uL para inocular en 150 mL de caldo BHI (Medio infusión cerebro-corazón, usado para favorecer el crecimiento de hongos filamentosos) y CYA, con agitación a 200 rpm para ambos medios a 25 °C por 72 horas. Este procedimiento se repitió disminuyendo el volumen de los medios de cultivo a 100 mL de caldo CYA y BHI, esta vez se realizó un lavado de conidias con 1 mL de agua purificada directamente en la caja, recuperando el volumen total de 1 mL y llevándolo a cada erlenmeyer con los caldos CYA y BHI descritos para cada ensayo, e incubando a 200 rpm a 25 °C por 72 horas. Se realizó un nuevo ensayo cambiando los cultivos a crecimiento en columna utilizando 2 tubos falcon estándar de 50 mL, a los cuales se les adicionó 15 mL de medio BHI líquido, inoculando 200 uL del hongo (obtenidos por lavado de conidias con agua purificada directamente de la caja) y se incubó en agitación constante a temperatura ambiente por 72 horas.

Obtención del pigmento

Los aislamientos de la sección *Nigri* con código MAA1, MAA5 y M2ARO2.3 que claramente produjeron pigmentos fueron lavados con 1 mL de agua purificada, este lavado fue transferido a dos tubos cónicos estériles y mezclados con 15 mL de PBS 1X o 15 mL de agua tipo III. Finalmente, las conidias presentes en los lavados fueron aisladas mediante la filtración

haciendo uso de un filtro de 0,45 µm. (Ver anexos). Este procedimiento se realizó por triplicado en 25 mL de solvente (PBS y AGUA TIPO III) para el aislamiento denominado M2ARO2.3, ya que se observó una mejor pigmentación en solución de las conidias. Los extractos fueron sellados, almacenados a -80 °C y liofilizados.

Tamizaje químico de los extractos de pigmentos

Se realizó un tamizaje químico para la identificación de metabolitos secundarios en cada uno de los extractos de pigmentos. Dentro de las sustancias evaluadas se consideró principalmente la presencia de alcaloides, esteroides y/o terpenoides, aminoácidos, lactonas sesquiterpénicas y cumarinas (17). Para los análisis se pesó aproximadamente 1 g de cada extracto liofilizado, los cuales posteriormente fueron solubilizados en viales con 1 mL de etanol al 70%. Las soluciones de los extractos fueron sembradas en 7 placas cromatográficas de sílica gel F254 de 5 x 5 cm. Cada una de estas fue revelada con diferentes reactivos que incluyen Anisaldehído/H₂SO₄, Vainillina/ H₂SO₄, KOH etanólico, NP/Polietilenglicol (PEG), Ninhidrina, Liebermann-Burchard, Dragendorff, Kedde; además, antes de aplicar cada uno de los reveladores las placas fueron observadas bajo la luz UV a 254 nm y 365 nm. La fase móvil usada tenía un carácter polar y estaba compuesta de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua en una proporción de 100:11:11:26. Para cada banda se determinó el R_f o factor de retardo, siendo este la razón entre la distancia recorrida por la muestra y la recorrida por el solvente.

Aislamiento de pigmentos por cromatografía en capa fina (CCF) y análisis espectrofotométrico UV-Vis.

Las bandas que en el tamizaje químico mostraron algún tipo de coloración en el visible, fueron posteriormente aisladas mediante el uso de cromatoplasmas de 10 x 10 cm sembrando en banda y con las mismas condiciones cromatográficas. Las sustancias fueron aisladas de la sílica mediante solubilización con etanol y analizadas por espectrofotometría

ultravioleta-visible para la adquisición de su espectro de absorción (18,19, 20).

RESULTADOS

Identificación y caracterización según criterios morfológicos macro y microscópicos

Las características registradas para el aislamiento M2ARO2.3 son acordes a las establecidas como criterios morfológicos de clasificación para especies de *Aspergillus* sección *Nigri* tales como: presencia y dimensión de esporulación, el color de (micelio, conidias y reverso), presencia o no de exudado y pigmento, textura (parte anterior y reverso), forma, elevación, tipo y diámetro de margen (Figura 1), ver anexos.

Se puede observar en medio PDA y BHI el micelio ligeramente amarillo con borde blanco, conidias de color negro característico de la sección *Nigri*, textura granular, con borde filamentososo, sin elevación ni presencia de exudados, se observa un reverso de color blanco opaco con centro estriado, radial y concéntrico, sin pigmentación, con forma circular y sin presencia de exudados. Los tres aislamientos analizados poseen características similares entre sí y compatibles con las claves taxonómicas descritas para morfologías de *Aspergillus* sección *Nigri* (Ver Tabla 1, 2 y 3 en anexos).

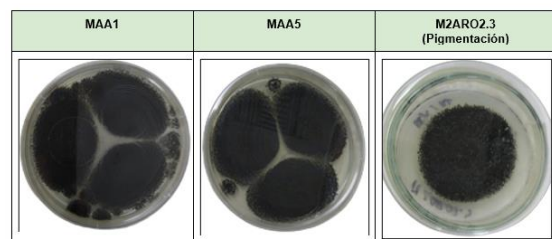


Figura 1. Aislamientos de *Aspergillus* sección *Nigri* productores de pigmentos solubles en agua y PBS.

Ensayo de condiciones de cultivo para producción de pigmentos

Inicialmente, se cultivó el aislamiento M2ARO2.3 en medios de cultivo líquido con el fin de favorecer la liberación al medio de los metabolitos secundarios. Bajo las condiciones establecidas en medio líquido BHI y CYA se

observó crecimiento micelial para ambos medios, pero no hubo producción de pigmento, este resultado fue igual para el ensayo empleando el método de montaje en columna (Figura 2).

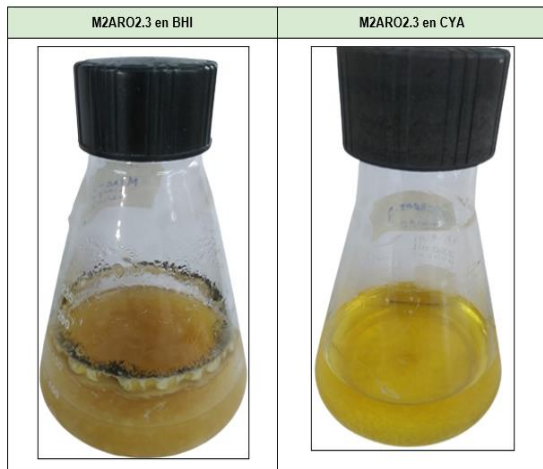


Figura 2. Condiciones de cultivo evaluadas, para el cultivo en BHI, se presenta pigmentación solo en las paredes, la esporulación fue en botones de biomasa grandes. Para el cultivo en CYA no se presenta pigmentación en el medio, la esporulación fue en pellets de biomasa pequeños.

Obtención del pigmento

No fue posible establecer las condiciones óptimas que favorecieran la liberación del pigmento en los medios descritos anteriormente, por lo tanto, se realizaron lavados de conidias con agua purificada directamente en las placas de Petri conteniendo colonias de 5 a 7 días de crecimiento, tiempo adecuado para que los hongos estén en una etapa adecuada de maduración y esporulación. Este lavado fue llevado a tubos cónicos con PBS y agua tipo III, lo cual permitió observar una pigmentación instantánea para ambas soluciones (PBS y agua tipo III) del aislamiento M2ARO2.3. Se determinó que hay mayor solubilidad en agua, es decir que el o los componentes del pigmento presentan un carácter hidrosoluble (Figura 3 y 3.1 en anexos). Por el contrario, los aislamientos MAA1 y MAA5 no presentaron el mismo resultado, sugiriendo que el pigmento no está presente en igual intensidad para los tres aislamientos de *Aspergillus* sección *Nigri* analizados.

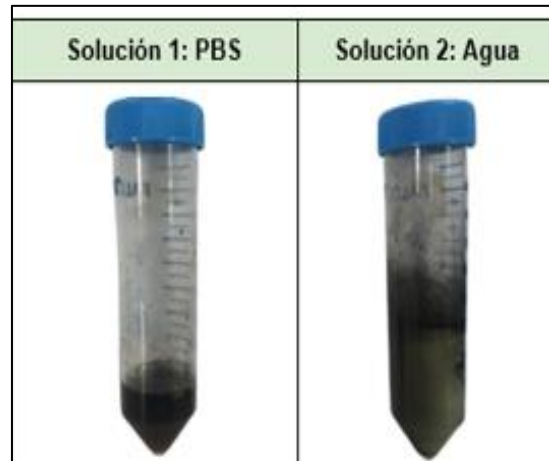


Figura 3. Lavados en PBS y agua para obtención del pigmento para el aislamiento M2ARO2.3.

Tamizaje químico de los extractos de pigmentos

Las muestras suspendidas en agua y PBS fueron evaluadas a través CCF en placas de sílica gel 5x5 cm. Según los resultados del tamizaje químico realizado a los extractos fúngicos obtenidos de la cepa M2ARO2.3 sección *Nigri*, los tipos de metabolitos presentes incluyen esteroides y/o terpenoides, alcaloides y flavonoides o núcleos similares a estos. Ver en anexos los perfiles cromatográficos.

Aislamiento de pigmentos por cromatografía en capa fina (CCF) y análisis espectrofotométrico UV-Vis.

Transcurrida la separación cromatográfica y al hacer el revelado bajo la lámpara UV, se obtuvieron 3 franjas con pigmentación denominadas A, B y C, las cuales presentaron los siguientes factores de retardo y coloración:

- A: Franja superior, amarilla. Rf: 8,1.
- B: Franja intermedia, verde. Rf: 7,4.
- C: franja inferior zona de siembra, café. Rf: 0.

Cada franja con coloración observada fue separada de la placa por medio de un raspado y aislada de la sílica mediante solubilización con etanol y filtración. Cada solución etanólica fue analizada por espectrofotometría UV-Vis en un rango λ de 200 a 500 nm. La fracción A fue

soluble en etanol, sin embargo, las fracciones B y C fueron menos solubles por lo que no se obtuvo una medición óptima de los espectros de absorción para estos pigmentos, de esta manera se hace necesario emplear otras técnicas confirmatorias como HPLC para determinar de manera más eficaz los espectros obtenidos para las fracciones A, B y C.

El espectro de absorción evidencia la presencia de diferentes máximos de absorción tanto en la región del espectro visible como la del ultravioleta; esto sugiere que la sustancia aislada sí posee un grupo cromóforo fluorescente, características que se evidencian en la franja de color amarillo cuando esta es observada bajo la luz visible y ultravioleta a 365 nm.

El espectro de absorción obtenido para la banda denominada como "A" posee máximos de absorción cercanos a los reportados para el pigmento de color amarillo presente en especies de *Aspergillus* como *niger* y *flavus* (27).

No fue posible caracterizar los compuestos fúngicos extraídos de M2AR02.3 denominados "B" y "C".

Figura 4. CCF para los extractos obtenidos a partir de M2AR02.3; se observan tres placas reveladas en la luz visible, a 364 nm y a 254 nm.

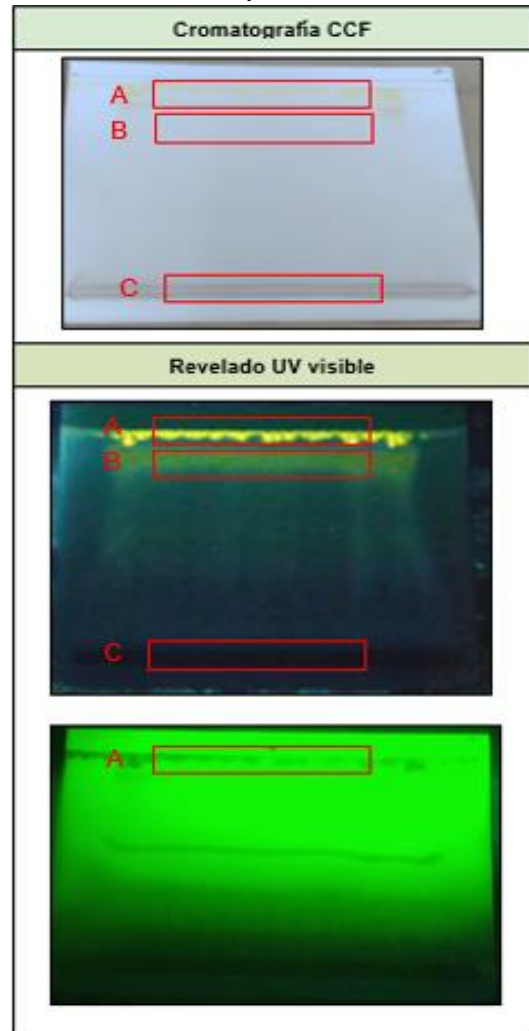


Figura 5. Espectro de absorción de la Fracción (A) obtenida de *A. sección Nigri* M2AR02.

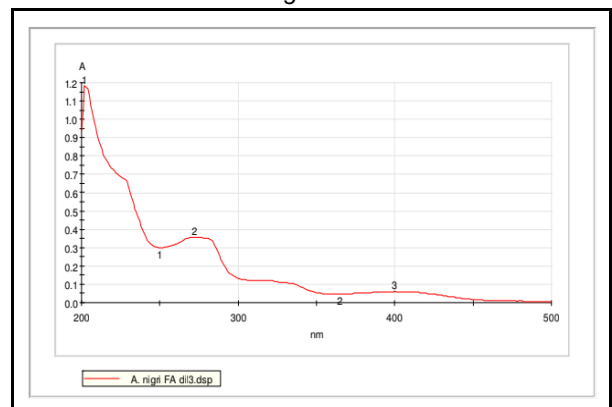


Figura 6. Espectro de absorción reportado para el pigmento amarillo de *A. niger*.

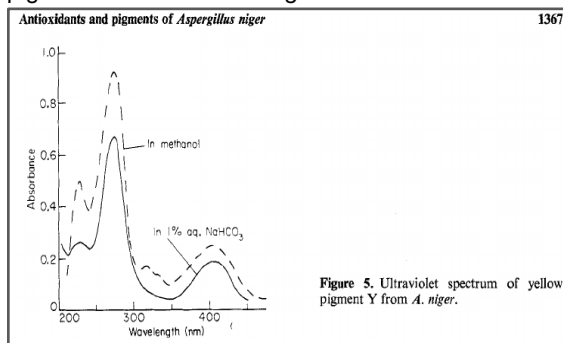


Figure 5. Ultraviolet spectrum of yellow pigment Y from *A. niger*. Zaika, L. L., & Smith, J. L. (1975). Antioxidants and pigments of *Aspergillus niger*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(9), 1357-1369.

DISCUSIÓN

La coloración negra característica observada en las conidias de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, está influenciada por muchos factores, además de los medios y las condiciones en que se cultiva, pues parece que genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios son silenciosos o solo se expresan en condiciones de cultivo a nivel industrial o laboratorio estándar (25). Por esta razón se buscó establecer un protocolo *in house* a nivel de laboratorio que facilitara la extracción de pigmentos extracelulares secretados por las conidias en solución de la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* M2ARO2.3, sin embargo, esta no fue óptima para todas las cepas evaluadas, debido probablemente a que los medios (BHI y CYA) utilizados para cultivar los aislamientos brindaban los nutrientes necesarios para el crecimiento micelial de los hongos evitando condiciones de estrés ambiental que permitieran su esporulación al medio. Ante esto, se optó por realizar lavados de conidias con agua purificada directamente en las placas de Petri con los aislamientos, lo que permitió obtener una pigmentación para las soluciones (PBS y agua tipo III) del aislamiento M2ARO2.3. El resultado para el aislamiento M2ARO2.3 fue mejor que para los aislamientos MAA-1 y MAA-5, por lo que los ensayos de caracterización química solo se usaron los extractos obtenidos para el aislamiento M2ARO2.3.

Los extractos fúngicos obtenidos de M2ARO2.3 en agua y PBS fueron sometidos a tamizaje químico y análisis espectral mediante

espectrofotometría UV-Vis. Así, se pudieron reconocer moléculas coloreadas que poseen propiedades de absorción a longitudes de onda del ultravioleta cercanas a 365 nm y en el visible alrededor de 400 nm. Adicionalmente, estas bandas poseen coloración, la fracción denominada como "A" por ejemplo posee color amarillo, presentando según lo reportado para la literatura transiciones ópticas calculadas a 264 nm y 386 nm, similares a los diferentes máximos de absorción para flavoglucina y asperflavina, las cuales sugieren coloración amarilla reportada para el tipo estructural de sustancias del tipo hidroquinona, lo que de cierta forma confirma el resultado positivo para la prueba de quinonas realizada con el revelador de KOH etanólico (21, 22). Por otro lado, el fragmento "A" aislado al parecer posee un grupo cromóforo fluorescente similar al pigmento amarillo reportado en la literatura para especies de *Aspergillus* como *niger* y *flavus*. (18, 27).

Cabe resaltar que los espectros de absorción reportados en la literatura científica no indican de manera específica la presencia de pigmentos puros, si no de mezclas de pigmentos que efectivamente absorben luz en el espectro del visible entre (400 a 700 nm); por lo que es factible determinar de manera hipotética por similitud en los resultados obtenidos que compuestos como la funalenona aislada en otros estudios a partir de *Aspergillus niger* (23, 24), esté probablemente presente en el extracto fúngico obtenido en este estudio. Dentro de las quinonas se incluye la flavoglucina, que es un pigmento amarillo encontrado dentro del grupo de las hidroquinonas más simples (21, 22, 26).

Se conoce por la literatura científica que los espectros de metabolitos secundarios que puede llegar a producir *Aspergillus* está relativamente caracterizado y revisado en medio YES (extracto de levadura), después de 8 días de incubación a 25°C, para cepas con mutaciones de color en *Aspergillus niger*, con identificación de genes involucrados en pigmentación y formación de metabolitos secundarios, en especial policétidos como las nafotpironas cíclicas, que al dimerizarse con otros monómeros como fonsecina tienen

relación con la producción de pigmentos en las conidias de *Aspergillus*. Conociendo lo anterior para este trabajo se reportan en los extractos evaluados por tamizaje químico, presencia de compuestos esteroidales y/o terpenoides, además de flavonoides y posibles compuestos nitrogenados como aminoácidos producidos por el aislamiento M2ARO2.3, pero aún se necesita un mayor enfoque molecular para poder establecer si los metabolitos encontrados en la cepa de estudio son intermediarios en vías sintéticas para genes involucrados en la pigmentación de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri*, tal y como otros metabolitos detectados reportados en la literatura (10).

En una introducción a la composición bioquímica de *Aspergillus*, se propuso que la aspergilina se forma a partir de precursores. Uno es un componente quinoidepentacíclico de pigmento verde, con máximo de absorción a 575 nm, el otro es un pigmento de melanina marrón con un máximo de absorción a 425 nm (18, 23), ambos componentes similares en color de pigmento a los obtenidos en la CCF para la mezcla fúngica extraída de M2ARO2.3, en las bandas B y C, pero que difieren en los espectros de absorción revelados ya que mostraron picos de absorción máximos de menos de 200 nm (Ver figura 4 y 5 en anexos).

Es importante la inclusión de caracterizaciones morfológicas como la realizada en este trabajo, que permitan mediante el reconocimiento de claves taxonómicas descritas en la literatura, obtener una clasificación más precisa para aislamientos locales catalogados dentro de *Aspergillus* sección *Nigri*, apoyándose en herramientas como la secuenciación genómica.

CONCLUSIONES

Las variables de ensayo utilizadas para incentivar la producción de pigmentación en las cepas del género *Aspergillus* sección *Nigri* no pudieron ser estandarizadas. No obstante, el procedimiento de extracción usado permitió extraer del aislamiento M2ARO2.3 sustancias con coloración o pigmentos de carácter

hidrosoluble, aunque estas al parecer se encuentran a muy baja concentración. De acuerdo con los resultados, si se pretende lograr una competitividad a nivel industrial, es pertinente mejorar las condiciones de cultivo y análisis para garantizar la obtención de pigmentos del extracto empleando condiciones de producción diferentes con aislamientos fúngicos ambientales locales, a través del uso de solventes específicos más afines, técnicas instrumentales más robustas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), entre otras.

Aunque las condiciones no fueron las más óptimas, la obtención de pigmentos derivados de cepas ambientales locales clasificadas dentro de *Aspergillus* sección *Nigri*, pertenecientes a la colección de aislamientos del grupo de biología celular y molecular CIB-UdeA, podría ser una alternativa simple para la búsqueda y caracterización de pigmentos con potencial para reemplazar los de origen sintético, y mediante el análisis de las condiciones de producción, optimizar los niveles de síntesis para su posterior escalamiento. Este protocolo podría ser utilizado para una amplia diversidad de especies fúngicas y una gran variedad de metabolitos.

PERSPECTIVAS

Se puede proyectar a futuro un estudio para determinar si este tipo de pigmentos obtenidos son comunes en los aislamientos locales catalogados dentro de *Aspergillus* sección *Nigri* o por el contrario son específicos de las cepas de análisis evaluadas en este trabajo.

Se obtuvo un espectro cromatográfico con banda de color amarillo para un extracto fúngico derivado de una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri*, el cual es soluble en agua y fácil de recuperar, se plantea entonces poder realizar ensayos de tinción en papel ecológico u otras matrices de interés industrial, además de posibles ensayos de actividad antimicrobiana del extracto obtenido a partir del aislamiento M2ARO2.3.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a todos los integrantes del Grupo de Biología Celular y Molecular perteneciente a la CIB por todo el apoyo, conocimiento y

soporte económico brindado durante el tiempo de ejecución del proyecto, a la profesora Diana Carolina Restrepo, de la facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias de la Universidad de Antioquia por sus aportes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Domsch, Klaus Heinz; GAMS, Walter; ANDERSON, Traute Heidi. Compendium of soil fungi. Academic Press, 1980. p. 19-390.
2. Accensi Alemany, F. Aportación al conocimiento de *Aspergillus* sección *Nigri*. Universitat Autònoma de Barcelona, 2008. p. 6-16,25.
3. Gams, Walter, et al. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Springer, Boston, MA, 1986. p. 55-62.
4. Abarca, M. Lourdes, et al. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, vol. 86, no 1, p. 33-49.
5. Samson, Robert A., et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 2005, vol. 53, no 1, p. 1-27.
6. Ferreira, Jorge A., et al. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: present status and future prospects. *Bioresource Technology*, 2016, vol. 215, p. 334-345.
7. Pagano, Marcela C.; DHAR, Partha P. Fungal pigments: an overview. *Fungal biomolecules: sources, applications and recent developments*, 2015, vol. 13, p. 173-179.
8. Mapari, Sameer AS, et al. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, vol. 16, no 2, p. 231-238.
9. Dufosse, Laurent, et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, vol. 26, p. 56-61.
10. Jorgensen, Thomas R., et al. The molecular and genetic basis of conidial pigmentation in *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, 2011, vol. 48, no 5, p. 544-553.
11. Butler, M. J.; Day, A. W. Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, vol. 44, no 12, p. 1115-1136.
12. Fernandez, Christopher W.; Koide, Roger T. The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecology*, 2013, vol. 6, no 6, p. 479-486.
13. Samson, Robert A.; Gams, Walter. Typification of the species of *Aspergillus* and associated teleomorphs. En *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Springer, Boston, MA, 1986. p. 31-54.
14. Visagie, Cobus Meyer, et al. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. *Studies in Mycology*, 2014, vol. 78, p. 63-139.
15. Klich MA, Pitt JI. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, CSIRO Division of Food Processing, 1988.
16. Abarca, M^a Lourdes. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 2000, vol. 17, no 3, p. S79-S84.
17. Sanabria-Galindo, Antonio; Lopez, Sandra Isabel; Gualdrón, Roberto. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 1997, vol. 26, no 1.

18. Narendrababu, B. N.; Shishupala, S. Spectrophotometric detection of Pigments from *Aspergillus* and *Penicillium* isolates. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 2017, vol. 5, no 1, p. 0-5.
19. Seco, M. S. G., Casamitjana i Badia, N., Angurell Purroy, I., Caubet Marín, A., Dinarès Milà, M. I., Llor Brunés, N., & Velasco Castrillo, D. Operaciones básicas en el laboratorio químico. 2009.
20. Zamora Amores F.T. Estandarización de la metodología de cromatografía de columna para el aislamiento de metabolitos activos a partir de extractos vegetales. 2017.
21. Wolf, F. A. Synthesis of various products, especially pigments, by fungi. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*, 1973, p. 184-205.
22. Quilico, A., Panizzi, L., & Mugnaini, E. Structure of flavoglaucin and auroglaucin. *Nature*, 1949, vol. 164, no 4157, p. 26-27.
23. Nielsen, K. F., Mogensen, J. M., Johansen, M., Larsen, T. O., & Frisvad, J. C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2009, vol. 395, no 5, p. 1225-1242.
24. Inokoshi, J., Shiomi, K., Masuma, R., Tanaka, H., Yamada, H., & Omura, S. a novel collagenase inhibitor produced by *Aspergillus niger*. *The Journal of antibiotics*, 1999, vol. 52, no 12, p. 1095-1100.
25. Chiang, Y. M., Meyer, K. M., Praseuth, M., Baker, S. E., Bruno, K. S., & Wang, C. C Characterization of a polyketide synthase in *Aspergillus niger* whose product is a precursor for both dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and naphtho- γ -pyrone. *Fungal Genetics and Biology*, 2011, vol. 48, no 4, p. 430-437.
26. VOLKOV, Victor V.; PERRY, Carole C. Fungal pigments on paper: Raman and quantum chemistry studies of *Alternaria* Sp. *Dyes and Pigments*, 2021, vol. 195, p. 109719.
27. Zaika, L. L., & Smith, J. L. (1975). Antioxidants and pigments of *Aspergillus niger*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(9), 1357-1369.

ANEXOS

Tabla 1. Identificación y caracterización microscópica M2AR02.3

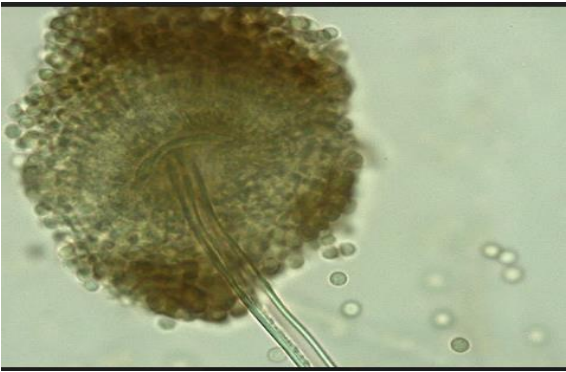

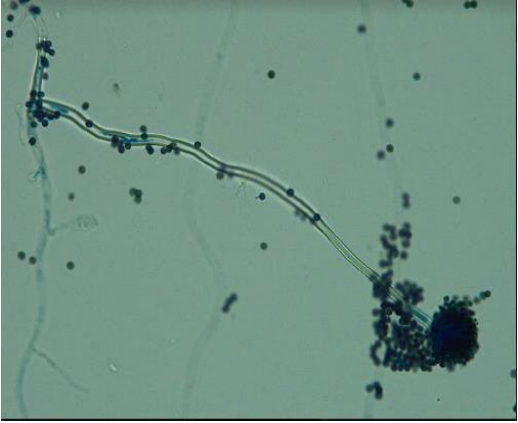
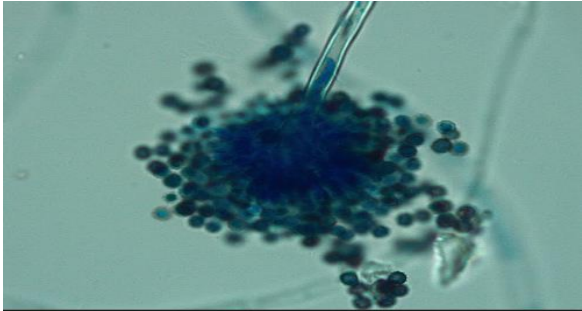
Registro fotográfico	Descripción
	<p>Se detalla la cabezuela radiada totalmente fértil y vesícula globosa, generalmente biseriadas o monoseriadas, que acompaña a la cabezuela.</p>
	<p>Se detalla la célula pie asimétrica parte basal del conidióforo, unida a una hifa generalmente septada y hialina.</p>
	<p>Se detalla el conidióforo, son lisos generalmente hialinos, aunque también pueden ser pigmentados.</p>
	<p>Se detalla las metulas o células soporte de los conidios</p>

Tabla 2. Identificación y caracterización según criterios morfológicos macroscópicos

Identificación	Medio de cultivo	Esporulación (cm)	Color			Textura		Pigmento reverso	Forma	Presencia exudado	Elevación	Margen	Diámetro (cm)
			Micelio	Conidia	Reverso	Frontal	Reverso						
M2ARO2.3	SB-1	0,1	Amarillo micelio y borde	Negro, borde blanco	Blanco opaco	Algodonosa, borde filamentosos	Centro estriado, radial y concéntrico	NO	N.A	NO	Plana	Filiforme	7,1
	SB-2	0,3						NO	N.A	NO	Plana	Filiforme	2,4
	MEA-1	0,3	Amarillo borde blanco	Negro	Blanco opaco	Granular borde filamentosos	Centro estriado, radial y concéntrico	NO	Circular	NO	Plana	Filiforme	4
	MEA-2	0,4						NO	Circular	NO	Plana	Filiforme	2,6
	CYA-1	NO	Blanco con borde hialino	Blanca inmaura sin crecimiento	Blanco	Sin conidias	NO	NO	Circular	NO	Plana	Filiforme	0,5
	CYA-2	NO						NO	Circular	NO	Plana	Filiforme	0,3
	PDA-1	0,1	Blanco tonos amarillos	Negro	Blanco con centro amarillo	Granular borde filamentosos	Lisa, radial y concéntrica	NO	Circular	NO	Plana	Filiforme	4,7
	PDA-2	0,2						NO	Circular	NO	Plana	Filiforme	3,2

Tabla 3. Identificación y caracterización según criterios morfológicos microscópicos.

Identificación	Grosor pared	Textura	Ramificación	Pigmento	Asimétrica	Yesícula	Métula	Fertilidad	Conidias				Penicilas	restricción a proliferación	Celulas de Hülle			
									Forma	Textura	Color	Organización			Color	Color	Forma	Presencia
M2ARO2.3	gruesa	rugosa	simple	pigmentado	X	globosa	biseriada	fertil	piriforme	rugosa	pigmentada	radiada	presencia	ausencia	X	X	asca	ausencia

Figura 3.1. Resultados del lavado de conidias para los aislamientos de estudio.

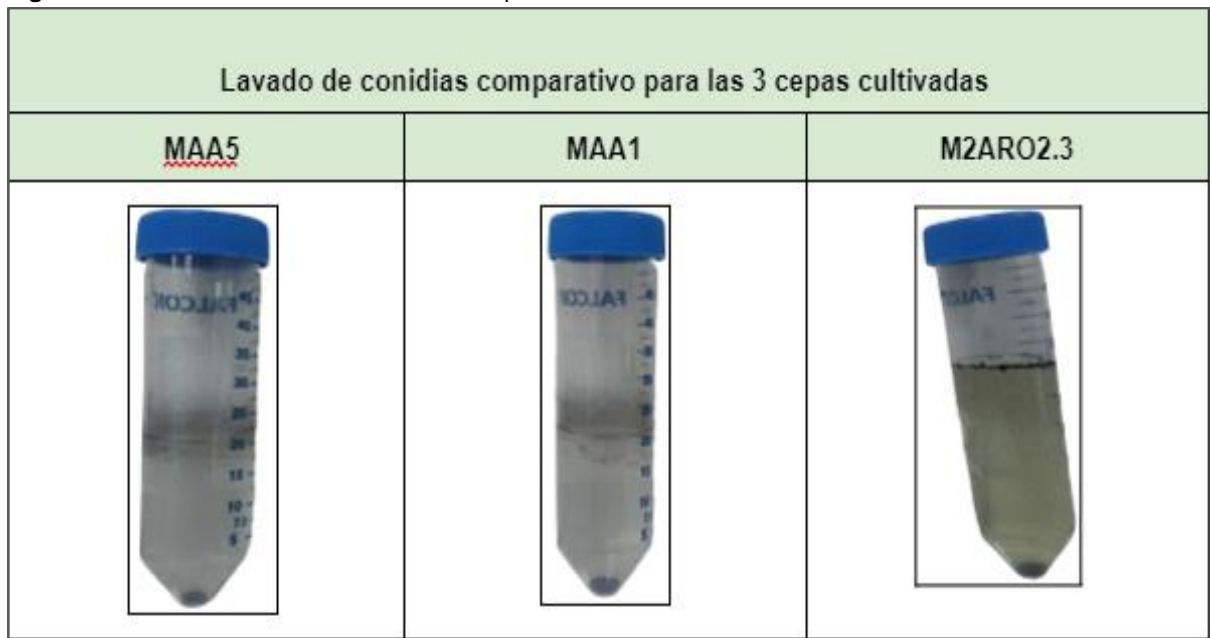


Figura 4. Espectro de absorción de la Fracción (B) obtenida del aislamiento M2ARO2.3

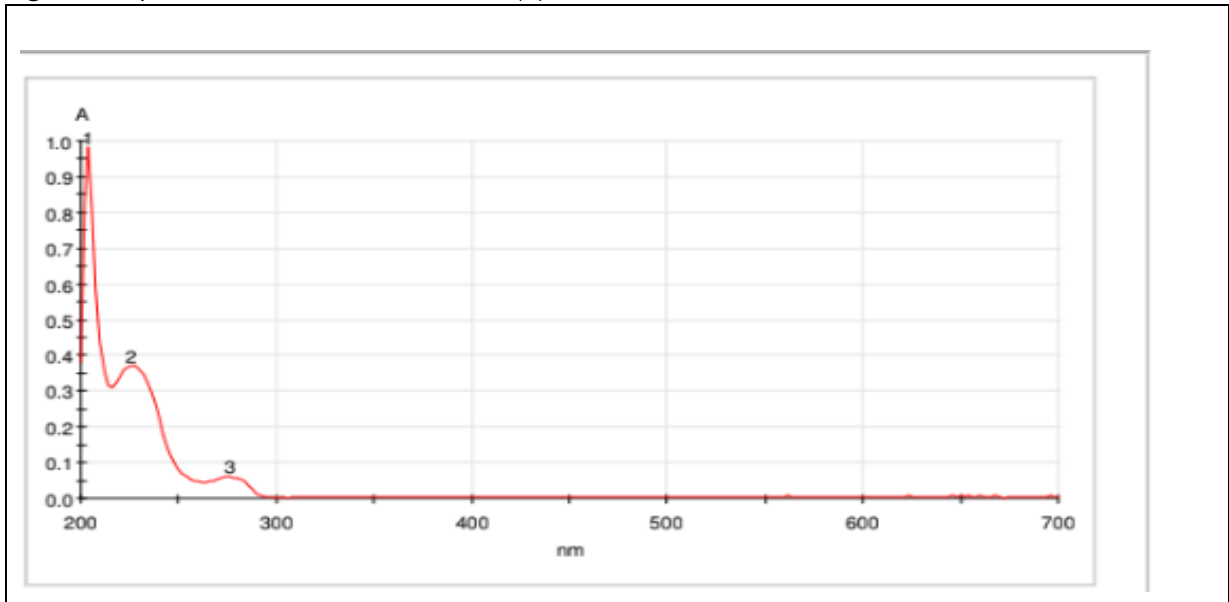
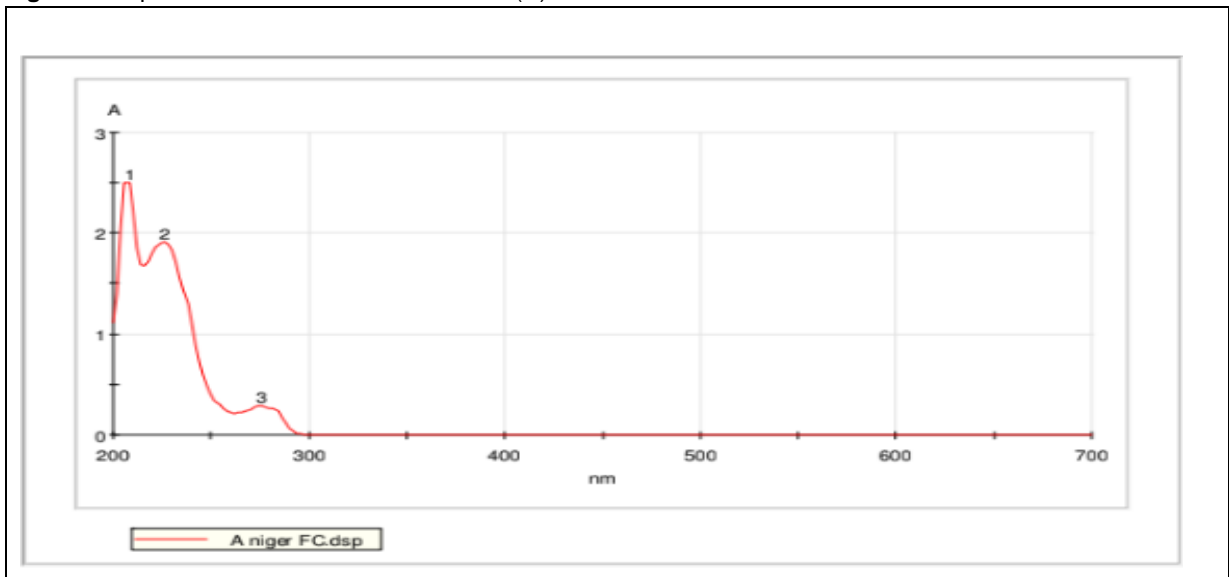
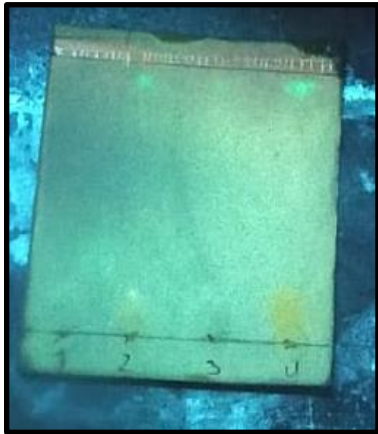


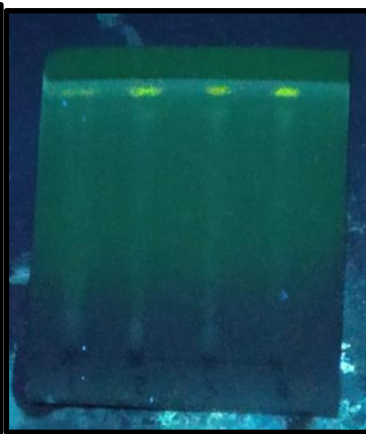
Figura 5. Espectro de absorción de la Fracción (C) obtenida del aislamiento M2ARO2.3



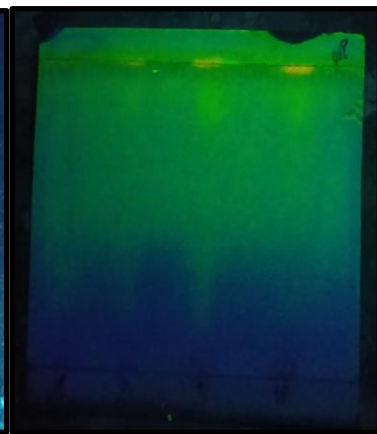
Resultados Tamizaje Químico de los extractos de los pigmentos para M2ARO2.3



Vanilina/H₂SO₄ (Positivo)



KOH en etanol (Positivo)



NP/Polietilenglicol (PEG) (Positivo)



Ninhidrina (Positivo)