

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
CELULOLÍTICAS TERMÓFILAS DE LAS FUENTES TERMALES
DE CALIENTES, CANDARAVE - TACNA**

TESIS

Presentada por:

Bach. Helena Beatriz Zapata Málaga

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA

Acta de sustentación de tesis N° 212

En la ciudad de Tacna, en el auditorio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 11:20 horas del día lunes 07 de abril del 2014. El jurado calificador fue designado mediante Resolución de Facultad N° 7674-2014-FACI-UN/JBG y está conformado por:

M. Sc. César Efraín Rivasplata Cabanillas

M. Sc. Daladier Miguel Castillo Cotrina

Dr. César Julio Cáceda Quiroz

Acto seguido se dio lectura a la Resolución de Facultad antes mencionado y al Art. 22 del capítulo VI del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación el Presidente del Jurado Calificador invitó a la Bachiller HELENA BEATRIZ ZAPATA MÁLAGA, a sustentar la tesis titulada: "Aislamiento e identificación molecular de bacterias celulolíticas termófilas de las fuentes termales de Calientes, Candarave - Tacna".

Siendo las 12:10 horas la Srta. Bachiller en mención concluyó la presentación de su tesis. A continuación el Presidente del Jurado Calificador invitó a los miembros del Jurado a realizar las preguntas y observaciones a que diera lugar; absueltas las preguntas se dio por concluida la sustentación de la tesis. Seguidamente el Jurado Calificador de modo individual y secreto emitieron sus calificaciones con los siguientes resultados: Aprobado por unanimidad con el calificativo de 18 (dieciocho), sobresaliente, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias de la UNJBG.

Siendo las 12:40 horas se dio por concluido el acto de sustentación de tesis, firmando los miembros del Jurado Calificador en señal de conformidad.



M. Sc. César E. Rivasplata Cabanillas
Presidente



M. Sc. Daladier M. Castillo Cotrina
Secretario



Dr. César Julio Cáceda Quiroz
Vocal

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida, protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar los obstáculos a lo largo de mi vida, por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres Victoria y Jorge, que con su demostración y consejos me han enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar. A mi hermana Roxana, por su apoyo incondicional y por demostrarme la gran fe que tiene en mí.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial a la Ph. D. Gretty Villena, Ph. D. Yvette Ludeña y Ph. D. Marcel Gutiérrez por su valiosa guía, por haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo este trabajo de investigación en las instalaciones del laboratorio de Micología y Biotecnología. Asimismo quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al M. Sc. Roberto Castellanos, por su importante aporte, por sus consejos tanto a nivel científico como personal.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional, algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles, por hacer que este trabajo saliera adelante de la mejor manera posible, por su aporte invaluable, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

CONTENIDO

Abreviaciones

Glosario de términos

Resumen

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Hipótesis.....	4
1.3 Justificación.....	5
1.4 Objetivos.....	6
1.4.1 Objetivo general.....	6
1.4.2 Objetivos específicos.....	6
1.5 Marco Teórico.....	7
1.5.1 Celulosa.....	7
1.5.2 Degradación de la celulosa.....	12
1.5.3 Sistemas celulolíticos.....	15
a. Endoglucanasas.....	18
b. Exoglucanasas.....	19
c. β -glucosidasas.....	19
d. Celulasas totales.....	20
1.5.4 Factores ambientales que determinan la degradación microbiana de la celulosa.....	20
a. Concentración de nitrógeno en el suelo.....	21
b. Temperatura.....	22
c. Aireación.....	22

d. pH.....	23
1.5.5 Aplicaciones industriales de las celulasas.....	24
1.5.6 Determinación de la actividad celulolítica.....	25
a. Prueba cualitativa con Rojo Congo.....	26
b. Prueba cuantitativa por la técnica del Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	27
1.5.7 Identificación bacteriana mediante secuenciación del gen ARNr 16S.....	28
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.1 Ubicación y delimitación del área de estudio.....	31
2.2 Población y muestra.....	31
2.2.1 Población.....	31
2.2.2 Muestra.....	32
2.3 Diseño de investigación.....	33
2.4 Métodos.....	34
2.4.1 Colección de muestra.....	35
2.4.2 Aislamiento.....	35
2.4.3 Actividad cualitativa de celulasas.....	37
2.4.4 Actividad cuantitativa de celulasas.....	38
a. Inóculo.....	38
b. Cultivo.....	38
c. Determinación de actividad enzimática.....	39
2.4.5 Determinación de biomasa celular.....	42
2.4.6 Cuantificación de proteínas solubles.....	42
2.4.7 Análisis molecular.....	44

a. Extracción de ADN.....	44
b. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	45
c. Purificación de producto de PCR.....	47
2.4.8 Procesamiento y análisis de la información.....	47
III. RESULTADOS.....	50
3.1 Aislamiento.....	50
3.2 Actividad cualitativa de celulasas.....	54
3.3 Actividad cuantitativa de celulasas.....	61
3.3.1 Optimización de actividad de endoglucanasas de cepa B12N.....	63
3.3.2 Optimización de actividad de endoglucanasas de cepa B20A.....	66
3.4 Determinación de biomasa celular y cuantificación de proteínas solubles.....	69
3.5 Análisis molecular.....	69
3.5.1 Extracción de ADN.....	69
3.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	71
3.5.3 Análisis del secuenciamiento del ARNr 16S.....	73
IV. DISCUSIÓN.....	77
V. CONCLUSIONES.....	86
VI. RECOMENDACIONES.....	88
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
VIII. ANEXOS.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Ubicación y características físico-químicas de las fuentes termales muestreadas de Calientes.....	32
Tabla 2.	Análisis de varianza de unidades formadoras de colonias de las fuentes termales de Calientes.....	52
Tabla 3.	Promedios de significancia de Duncan para los promedios del recuento de UFC de las fuentes termales de Calientes....	53
Tabla 4.	Análisis de varianza de diámetro de zona de hidrólisis de celulasas de los cultivos bacterianos aislados.....	56
Tabla 5.	Promedios de significancia de Duncan para los promedios del diámetro de la zona de hidrólisis de celulasas de los cultivos bacterianos aislados.....	57
Tabla 6.	Análisis de varianza para la actividad enzimática de endoglucanasas de la cepa B12N.....	63
Tabla 7.	Análisis de varianza para la actividad enzimática de endoglucanasas de la cepa B20A.....	66
Tabla 8.	Parámetros de productividad de endoglucanasas de las cepas B12N y B20A.....	69
Tabla 9.	Concentración y pureza del ADN extraído de las cepas B12N, B20A y de <i>Escherichia coli</i> como cepa control.....	70
Tabla 10.	Similitud de secuencias de ARNr 16S para las cepas B12N y B20A en BLASTN.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura representativa de las cadenas de celulosa.....	8
Figura 2.	Modelo estructural de la microfibrilla de celulosa	10
Figura 3.	Hidrólisis de la celulosa amorfa y microcristalina por sistemas de celulasas no complejos (A) y complejos (B).....	17
Figura 4.	Reacción del ácido 3,5 - dinitrosalicílico.....	27
Figura 5.	Cultivos de bacterias termófilas de las fuentes termales de Calientes.....	51
Figura 6.	Recuento de UFC de las fuentes termales de Calientes.....	54
Figura 7.	Incidencia de actividad cualitativa de celulasas a diferentes valores de pH.....	55
Figura 8.	Diámetro de zona de hidrólisis de celulasas de los cultivos bacterianos aislados.....	60
Figura 9.	Biomasa generada en el medio de producción para celulasas y actividad de endoglucanasas de los cultivos bacterianos pre-seleccionados.....	61
Figura 10.	Superficie respuesta estimada de la optimización de la actividad enzimática de endoglucanasas de la cepa B12N.....	65
Figura 11.	Superficie respuesta estimada de la optimización de la actividad enzimática de endoglucanasas de la cepa B20A.....	68
Figura 12.	Árbol filogenético de la cepa B12N con el método de Neighbor - joining.....	75
Figura 13.	Árbol filogenético de la cepa B20A con el método de Neighbor - joining.....	76

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1.	Electroforesis del ADN de las cepas B12N y B20A.....	71
Fotografía 2.	Electroforesis de PCR de las cepas B12N y B20A.....	72

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Fuentes termales muestreadas de Calientes.....	107
Anexo 2.	Ubicación geográfica de las fuentes termales muestreadas de Calientes.....	108
Anexo 3.	Características macroscópicas de los cultivos bacterianos aislados de Calientes.....	109
Anexo 4.	Características microscópicas de los cultivos bacterianos aislados de Calientes.....	110
Anexo 5.	Actividad cualitativa de celulasas de los cultivos bacterianos aislados de Calientes.....	112
Anexo 6.	Zonas de hidrólisis de celulasas a pH 4,8.....	114
Anexo 7.	Zonas de hidrólisis de celulasas a pH 7,4.....	115
Anexo 8.	Actividad cuantitativa enzimática de endoglucanasas de cepa B12N.....	116
Anexo 9.	Actividad cuantitativa enzimática de endoglucanasas de cepa B20A.....	117
Anexo 10.	Fotografía microscópica de los cultivos bacterianos B1R y B12N.....	119
Anexo 11.	Fotografía microscópica de los cultivos bacterianos B15N y B17N.....	119
Anexo 12.	Fotografía microscópica de los cultivos bacterianos B20A y B24A.....	120
Anexo 13.	Fotografía macroscópica de los cultivos bacterianos B1R	

	y B12N.....	120
Anexo 14.	Fotografía macroscópica de los cultivos bacterianos B15N y B17N.....	121
Anexo 15.	Fotografía macroscópica de los cultivos bacterianos B20A y B24A.....	121
Anexo 16.	Fermentación sumergida en agitador orbital para producción de celulasas.....	122
Anexo 17.	Actividad de endoglucanasas medida por el método de DNS.....	122
Anexo 18.	Cuantificación de proteínas solubles de cepas B12N y B20A por método de Lowry.....	123

ABREVIATURAS

AE	:	Actividad enzimática
ARNr	:	Ácido ribonucleico ribosomal
BLAST	:	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTN	:	Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide
°C	:	Grado centígrado
CMC	:	Carboximetilcelulosa
Depc	:	Dietilpirocarbonato
DNS	:	Ácido 3,5 - dinitrosalicílico
dNTPs	:	2' deoxinucleotido 5' - trifosfato
D.O.	:	Densidad óptica
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
g	:	Gramo
h	:	Hora
L	:	Litro
M	:	Molar
mg	:	Miligramo
min	:	Minuto
mM	:	Milimolar
mm	:	Milímetro
ml	:	Mililitro
msnm	:	Metros sobre el nivel del mar
ng	:	Nanogramo

nm	:	Nanómetro
pb	:	Pares de bases
pH	:	Potencial de hidrógeno
p/v	:	Peso por volumen
rpm	:	Revoluciones por minuto
SDS	:	Dodecilsulfato sódico
SSU	:	Small subunit
TAE	:	Tampón tris acetato
TCA	:	Ácido tricloroacético
u	:	Unidades
UFC	:	Unidades formadoras de colonias
UI	:	Unidad internacional
μl	:	Microlitros
μmol	:	Micromol
V	:	Voltio
v/v	:	Volumen por volumen

GLOSARIO DE TÉRMINOS

1. **Ácido desoxirribonucleico (ADN):** Un ácido nucleico de doble cadena, compuesto de adenina, guanina, citosina, timina, desoxirribosa y fosfato.
2. **Ácido ribonucleico (ARN):** Un ácido nucleico de una sola cadena, compuesto de adenina, guanina, citosina, uracilo, ribosa y fosfato.
3. **Ácido ribonucleico mensajero (ARNm):** Un ácido ribonucleico que se transcribe a partir de la matriz de ADN.
4. **Ácido ribonucleico ribosomal (ARNr):** Un ácido ribonucleico que participa en la formación de los ribosomas.
5. **Bacterias termófilas:** Las bacterias termófilas son aquellas que se desarrollan a temperaturas superiores a 45°C, pudiendo superar incluso los 100°C (hipertermófilos).
6. **Biomasa:** Cantidad de materia producida o existente en un ser vivo y que se encuentra en forma de proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos orgánicos. Normalmente se mide en peso seco (una vez que se ha sometido a desecación a temperaturas moderadas). La biomasa se puede utilizar como materia prima renovable y como energía material.

7. **Celobiosa:** Un disacárido formado por dos glucosas unidas por el grupo hidroxilo del carbono 1 en posición beta de una glucosa y del grupo hidroxilo del carbono 4 de la otra glucosa. Por ello este compuesto también se llama beta - D -glucopiranosil (1 - 4) beta - D - glucopiranososa. La celobiosa aparece en la hidrólisis de la celulosa.
8. **Celodextrina:** Polímeros de glucosa de diversos tamaños (dos o más monómeros de glucosa), producto de la hidrólisis incompleta de la celulosa insoluble.
9. **E – value:** Representa el número de hits con el mismo o similar score que se puede esperar de encontrar al azar.
10. **Enzima termoestable:** Proteína capaz de resistir altas temperaturas que podrían rápidamente desnaturalizar la mayoría de proteínas de mesófilos. Por lo general, estas enzimas tienen que ser extraídas de bacterias que viven en condiciones de calor extremo.
11. **Hit:** Secuencia de nucleótidos de ADN, ARN o proteínas, previamente caracterizada, presente en una determinada base de datos de un programa informático.

12. **Match:** Homología de la secuencia problema de nucleótidos (query) con la secuencia previamente caracterizada en la base de datos (hit), siendo los nucleótidos que coinciden en el alineamiento.

13. **Query:** Secuencia problema de nucleótidos de ADN, ARN o proteínas, la cual va a ser alineada con otras secuencias en una base de datos determinada como por ejemplo BLAST.

14. **Sustrato:** En química, un sustrato es una especie química que se considera, de forma explícita, objeto de la acción de otros reactivos. Por ejemplo, un compuesto cuya transformación está afectada por un catalizador.

15. **Tapetes microbianos:** También llamados mats, son capas de células microbianas asociadas a la superficie, impregnadas de sustancia polimérica extracelular, se encuentran cubriendo sedimentos. A diferencia de las biopelículas, que van desde unas pocas capas de células a un máximo de unos pocos milímetros de espesor, los mats microbianos varían desde más de 1 mm a varios centímetros de espesor.

RESUMEN

Se realizó el aislamiento de 31 cultivos bacterianos a partir de las aguas termales de Calientes, seleccionándose los cultivos que presentaron diámetros significativos de las zonas de hidrólisis y la mayor actividad de endoglucanasas en cultivo sumergido, inducidas con CMC 1 %. Las cepas seleccionadas B12N y B20A tienen una actividad máxima de endoglucanasas termoestables, con interés industrial, de 0,56 UI ml⁻¹ a 67,5 °C y un pH 5,9 y 0,27 UI ml⁻¹ a 59,5 °C y un pH 6,4 respectivamente; la cepa B12N presenta la mayor pureza enzimática con 18,66 UI mg⁻¹ de proteína. Además se presentó una similitud con el gen ARNr 16S de *Geobacillus* sp. al 99 % y con el de *Bacillus licheniformis* al 97 % para la cepa B12N y B20A respectivamente tras el secuenciamiento.

I. INTRODUCCIÓN

La importancia del estudio de la diversidad microbiana radica en la participación activa sobre ciclos biogeoquímicos, gracias a la cual se recuperan y reciclan materia y energía por medio de enzimas y complejos enzimáticos específicos que poseen dichos microorganismos, entre ellos se encuentran los microorganismos celulolíticos en el reciclaje de la celulosa (Hongpattarakere, 2002), la cual es una de las moléculas poliméricas más abundantes en la biósfera (Martínez et al., 2005; Pérez et al., 2002; Hernández et al., 1999).

Las celulasas han atraído mucho interés debido a la diversidad de su aplicación en las distintas industrias, como en la industria textil, en la industria de los detergentes, en la industria alimenticia y en la industria energética con la elaboración de biocombustibles de segunda generación a partir de materiales lignocelulósicos, los cuales tienen ventajas en su uso, según Lynd et al. (2002), en la elevada disponibilidad, por ser la fuente de energía renovable más abundante de la tierra, bajo costo y su uso acorde con el cuidado ambiental.

Por otro lado, la demanda energética ha potenciado las investigaciones para obtener biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos, proceso en el cual es necesaria la liberación y

conversión de la celulosa a glucosa, la cual finalmente por procesos biológicos se transformará en etanol. Esta conversión puede ser mediada por celulasas de diversas fuentes, entre ellas, las de origen bacteriano (Viviano et al., 2011; Maki et al., 2011; Limayem et al., 2012).

Se tiene una amplia lista de reportes sobre bacterias celulolíticas termófilas en la literatura, pero la utilización de la celulosa requiere que los microorganismos tengan celulasas extracelulares que sean fácilmente recuperables del sobrenadante del cultivo (Lynd et al., 2002).

1.1 Planteamiento del problema

Las celulasas se pueden obtener de una gran variedad de microorganismos, pero a pesar de contar con una amplia gama de microorganismos celulolíticos, sus actividades hidrolíticas son afectadas por una serie de factores físicos y químicos que limitan su aplicación a nivel industrial. Por ello, existe la necesidad de aislar y caracterizar cepas con mejores rendimientos en la cantidad de enzimas liberadas al medio extracelular y que mantengan la calidad intrínseca de dichas enzimas, además que expresen una elevada estabilidad de su actividad a pH extremos, solventes orgánicos, detergentes iónicos y principalmente la de mantener sus actividades enzimáticas a elevadas temperaturas de reacción. Por esta razón, los microorganismos termófilos han sido sugeridos como fuentes alternativas de celulasas por la termoestabilidad de sus enzimas, propiedad ventajosa en aplicaciones industriales (Zeikus et al., 1981).

Generar información básica sobre los microorganismos celulolíticos termófilos es de importancia para posteriores investigaciones como la obtención de factorías celulares para la producción de etanol, ya que el proceso de conversión de biomasa lignocelulolítica en biocombustible es bastante promisorio.

Una de las fuentes de diversidad microbiana termófila son los manantiales termales, donde se observa una cierta relación entre algunos microorganismos y las aguas con características fisicoquímicas

más extremas de pH, temperatura, salinidad y radiactividad (De la Rosa & Mosso, 2000). El Perú posee una diversidad de hábitats, dentro de las cuales están las fuentes termales que aún no han sido suficientemente exploradas en cuanto a microflora celulolítica. Por lo tanto es necesario explorar la microflora celulolítica de algunas fuentes termales de Calientes, de la provincia de Candarave, departamento de Tacna; entonces se plantea la siguiente interrogante: **¿Existen bacterias termófilas con actividad de celulasas en las fuentes termales de Calientes, Candarave - Tacna?**

1.2 Hipótesis

De acuerdo al problema planteado, se presentó a continuación la siguiente hipótesis:

Existen bacterias termófilas aerobias con actividad celulolítica en las fuentes termales de Calientes, las cuales pueden pertenecer a los géneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Brevibacillus*, *Thermobifida*, *Acidothermus*, *Rhodothermus* y *Caldibacillus*.

1.3 Justificación

Siendo consideradas las bacterias celulolíticas termófilas prometedoras en la degradación de celulosa, es de gran importancia la selección de estos microorganismos con una eficiente actividad celulolítica para obtener sustancias biológicamente activas con interés biotecnológico e industrial; ya que aunque se han aislado una gran variedad de bacterias y hongos capaces de utilizar la celulosa, no todos pueden producir altos niveles de enzimas extracelulares que permitan degradar "in vitro" la celulosa insoluble.

La búsqueda de microorganismos extremófilos con capacidades enzimáticas específicas permitirá, tal como indican Rees et al. (2003) encontrar genes con potencial industrial, los cuales son usualmente clonados a un hospedero convencional con el fin de maximizar la producción enzimática bajo condiciones de crecimiento menos costosas.

Actualmente en estudios de identificación taxonómica de bacterias se recomienda para una identificación precisa, utilizar criterios genotípicos así como los resultados de los análisis de comparación de la secuencia del gen ARNr 16S. De esta manera con la identificación de microorganismos con utilidad económica, se proveerá a las fuentes termales de Calientes, de la provincia de Candarave, departamento de Tacna, un valor económico en términos de riqueza genética.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Aislar e identificar molecularmente las bacterias celulolíticas termófilas de las fuentes termales de Calientes, Candarave - Tacna.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la actividad de celulasas de las bacterias termófilas aisladas y seleccionar las que presenten mayor actividad celulolítica.
- Determinar y optimizar la actividad enzimática termófila de la enzima celulasa de las bacterias seleccionadas.
- Identificar molecularmente las bacterias celulolíticas termófilas seleccionadas para su identificación taxonómica.

1.5 Marco Teórico

La lignocelulosa compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina; es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200 000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas et al., 2006). En las plantas el contenido de celulosa depende del grupo taxonómico al que pertenezcan y oscila entre 35 y 50 % y la hemicelulosa y la lignina comprenden del 20 al 35 % y del 5 al 30 % en peso seco, respectivamente (Peters, 2006).

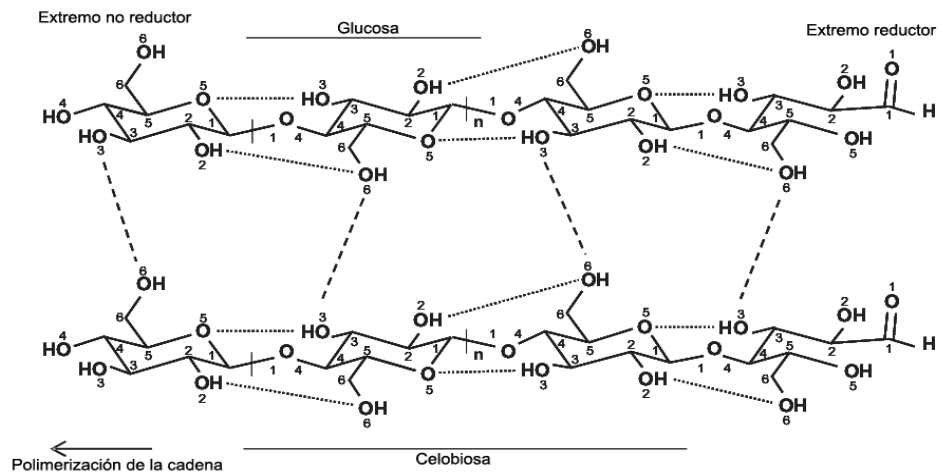
1.5.1 Celulosa

La celulosa representa el principal componente de polisacáridos de la pared celular donde su función principal es proporcionar rigidez. Consta de un polímero lineal formado por la unión de moléculas de β - glucosa mediante enlaces β -1,4 - O - glucosídico (Wilkie & Woo, 1977).

Las cadenas de celulosa presentan una estructura plana, estabilizada por enlaces de hidrógeno internos. Todos los residuos de glucosa giran 180° con respecto al residuo de al lado en la misma cadena de celulosa. Un residuo de glucosa es la unidad monomérica de la celulosa y el dímero, celobiosa, es la unidad estructural repetitiva de la cadena la cual presenta

aproximadamente de 1 000 a 14 000 unidades monoméricas (Brown et al., 1996; Lynd et al., 2002).

La cadena de celulosa es polarizada, posee un grupo no reductor en uno de sus extremos y en el extremo opuesto un grupo reductor (Figura 1). Los nuevos residuos de glucosa, se añaden al extremo no reductor durante la síntesis del polímero (Koyama et al., 1997)



× Las líneas discontinuas: puentes de hidrógenos entre cadenas. Las líneas punteadas: enlaces de hidrógeno intracadena.

Figura 1. Estructura representativa de las cadenas de celulosa.

Fuente: Festucci et al., 2007.

Una de las características de la celulosa, es que cada unidad de glucosa forma enlaces intramoleculares e intermoleculares, que produce un efecto importante en la reactividad de las cadenas celulósicas. Los enlaces de hidrógeno intermoleculares, permiten una estructura fibrilar terciaria de alta cristalinidad, formando regiones altamente ordenadas, que se conocen como zonas cristalinas. Los enlaces intramoleculares forman zonas amorfas o desordenadas, que son más accesibles y susceptibles a las reacciones químicas, por poseer torceduras y espacios, en los que se forman microporos y capilares lo suficientemente espaciosos para permitir la hidratación y el ataque enzimático, por lo que el arreglo asimétrico que caracteriza las regiones amorfas es crucial para la biodegradación de la celulosa (Malherbe & Cloete, 2002).

En la pared celular de las plantas, la celulosa se encuentra como unidades submicroscópicas de forma alargada conocidas como micelas. A su vez, estas micelas se arreglan en estructuras más grandes, las microfibrillas, las cuales están suficientemente empaquetadas para prevenir la penetración no sólo de enzimas sino de pequeñas moléculas semejantes al agua. Estas microfibrillas de celulosa están estabilizadas por enlaces de hidrógeno y rodeadas por polisacáridos hemicelulósicos (manano y xilano) que se unen a la celulosa por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes, los cuales la hacen extremadamente resistente a la hidrólisis química y biológica (Lynd et al., 2002).

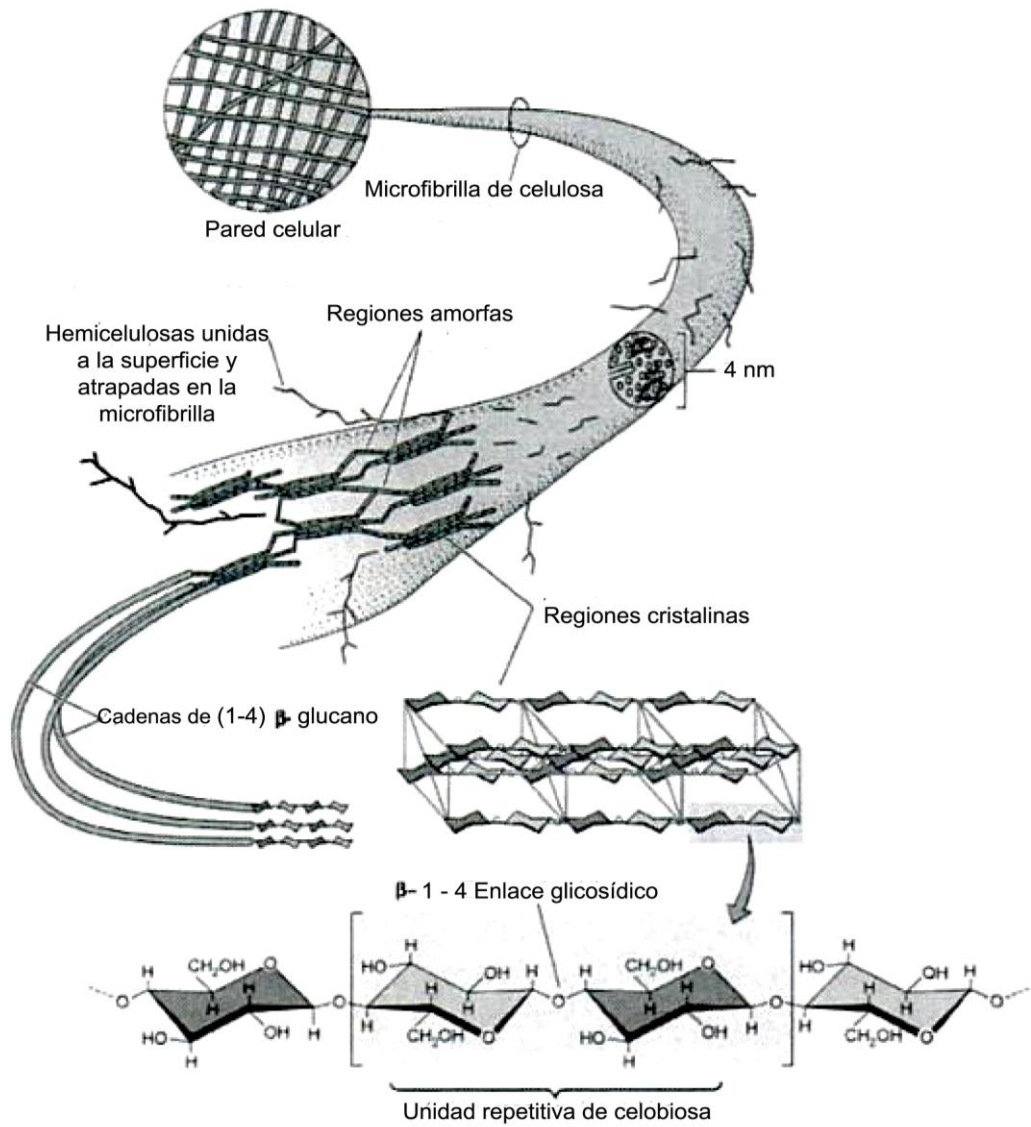


Figura 2. Modelo estructural de la microfibrilla de celulosa.

Fuente: Lincoln & Zeiger, 2006.

La celulosa además de existir en las plantas superiores también está presente en algas, en los quistes de algunos protozoarios, en algunos animales (por ejemplo, tunicados) y algunas bacterias como las del género *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Sarcina*; sin embargo la celulosa se encuentra en la naturaleza casi exclusivamente en las paredes celulares de los vegetales (Lynd et al., 1999; Lynd et al., 2002; Czaja et al., 2007; Ross et al., 1991).

Debido a que gran parte de la vegetación que pasa a formar parte del suelo es celulósica, su descomposición tiene una importancia muy especial en el ciclo biológico del carbono, consecuentemente los microorganismos del suelo que catabolizan la hidrólisis del material vegetal (40 - 60 % de residuos de plantas) influyen el flujo de energía desde éste hasta la formación de CO₂ y su liberación a la atmósfera. Como las bacterias y hongos del suelo son los microorganismos mayormente involucrados en el ciclaje del material vegetal, cambios en el número de éstos pueden indicar modificaciones en el contenido de materia orgánica del suelo. Cuando esto se corrobora con otros indicadores ecológicos (biomasa y diversidad de especies encontradas) se obtiene información acerca del estado del suelo y su productividad (Hendricks et al., 1995). Como resultado, se ha prestado gran atención a los organismos que participan en la descomposición de esta sustancia (Alexander, 1980).

1.5.2 Degradación de la celulosa

El material celulósico es particularmente atractivo como fuente de carbono y energía debido a su bajo costo y su gran abundancia. Sin embargo, debido a su carácter recalcitrante, solamente ciertos organismos producen las enzimas necesarias para utilizarlo (Beguin & Aubert, 1994). Entre ellos se incluyen hongos y bacterias, aerobios y anaerobios, mesofílicos y termofílicos que ocupan una variedad de hábitats (Aubert, 1988), considerándose entre otras: suelo y agua (Zaldívar et al., 1987; Ceroni & Gutiérrez, 1988), despojos vegetales u hojarascas (Magnelli et al., 1997), efluentes de industrias (Mullings & Parish, 1984; Prasertsan & Oi, 1992), residuos municipales (Stutzenberger et al., 1970), estiércol (Lee & Blackburn, 1975), compost (Ramírez, 1993).

Entre los hongos celulolíticos destacan: *Trichoderma reesei*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma reesei*, *Sporotrix* sp., *Alternaria* sp., *Geotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp., *Trametes* sp., *Paecilomyces* sp., *Mucor* sp., *Cladosporium* sp., *Bulgaria* sp., *Chaetomium* sp., *Helotium* sp., *Aspergillus* sp. Las bacterias celulolíticas más abundantes y conocidas son las aerobias entre las cuales se pueden citar: *Cellulomonas* sp., *Microbispora bispora*, *Thermomonospora* sp., *Cytophaga* sp., *Corynebacterium* sp., *Vibrio* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Thermobifida* sp.

Además se encuentran algunos anaerobios como: *Acetivibrio cellulolyticus*, *Butirivibrio* sp., *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* (Lynd et al., 2002). Entre los actinomicetos se destacan *Streptomyces drozdowiczii*, *Streptomyces cellulolyticus* (Semedo et al., 2004; Grigorevski et al., 2005; Li, 1997), *Thermomonospora curvata*, *Thermomonospora chromogena*, *Thermomonospora alba* y *Thermomobifida fusca* (Ramírez & Cocha, 2003).

La utilización de la celulosa requiere que los microorganismos tengan celulasas libres de células o tener tales enzimas situadas en el exterior de las células, además una enzima que se encuentra en un cultivo en crecimiento podría ser ya sea secretada o liberada pasivamente como resultado de la lisis celular, haciendo un estudio de las enzimas celulolíticas bastante complicado (Berg & Petterson, 1977; Carpenter & Barnett, 1967). Por esta razón hay una clara diferencia en estrategia celulolítica entre los grupos aerobios y anaerobios. Con pocas excepciones, a diferencia de las bacterias anaerobias celulolíticas, las cuales distribuyen sus celulasas normalmente tanto en la fase líquida y en la superficie de las células, las bacterias aerobias celulolíticas producen cantidades sustanciales de celulasa extracelular que son recuperables del sobrenadante del cultivo; además producen altos rendimientos

celulares que han llevado a un considerable interés tecnológico en la producción de proteína de la célula microbiana a partir de biomasa celulósica de residuos (Lynd et al., 2002).

Se ha puesto énfasis en el uso de hongos debido a su capacidad de producir cantidades significativas de celulasas y hemicelulasas que se secretan al medio para la extracción y la fácil purificación; además sus enzimas son a menudo menos complejas que las celulasas bacterianas y por lo tanto pueden ser clonadas y producidas más fácilmente a través de la recombinación en un huésped bacteriano de rápido crecimiento, tal como *Escherichia coli*. Sin embargo, el aislamiento y la caracterización de nuevas glucósido hidrolasas de las eubacterias está siendo ampliamente explotado. Hay varias razones para estos cambios, por ejemplo, las bacterias suelen tener una tasa de crecimiento mayor que los hongos que permiten una mayor producción recombinante de las enzimas. En segundo lugar, las glucósido hidrolasas bacterianas suelen ser más complejas y, a menudo se expresan en varios complejos de enzimas que proporcionan mayor funcionalidad y sinergia. Lo más importante, las bacterias habitan en una amplia variedad de nichos ambientales e industriales, que producen cepas celulolíticas que son extremadamente resistentes a las tensiones ambientales. Estos incluyen cepas que son termófilas o psicrófilas, alcalófilas o acidófilas, y la existencia de cepas halófilas. Estas cepas pueden sobrevivir a las duras condiciones

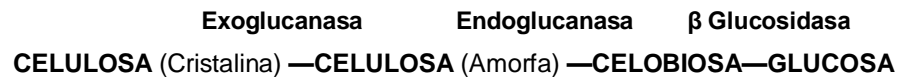
que se encuentran en el proceso de bioconversión, producir enzimas que son estables bajo condiciones extremas (así como temperaturas de hasta 90 °C, niveles de pH altamente ácidos o alcalinos) y pueden aumentar las tasas de hidrólisis enzimática, fermentación, y la recuperación del producto (Maki et al., 2009; Lamed & Bayer, 1988; Sugden & Bhat, 1994).

1.5.3 Sistemas celulolíticos

La hidrólisis eficiente de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de al menos tres enzimas. De acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se clasifican en tres grandes grupos: endo β -1,4 glucanasas (β -1,4 glucano glucanohidrolasa), exo β -1,4 celobiohidrolasas y las β -1,4 glucosidasas (Lyman et al., 1995; Zhang et al., 2006).

La endo β - 1,4 glucanasa hidroliza aleatoriamente los enlaces β -1,4 glucosídicos intramoleculares accesibles de cadenas de celulosa para producir oligosacáridos de varias longitudes. La exo β - 1,4 celobiohidrolasa cliva los extremos no reductores del sustrato generando unidades de celobiosa o glucosa y por último la β -1,4 glucosidasa, completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa o removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacáridos. (Lyman et al., 1995; Zhang et al., 2006) La β - 1,4 glucosidasa no actúa sobre la celulosa

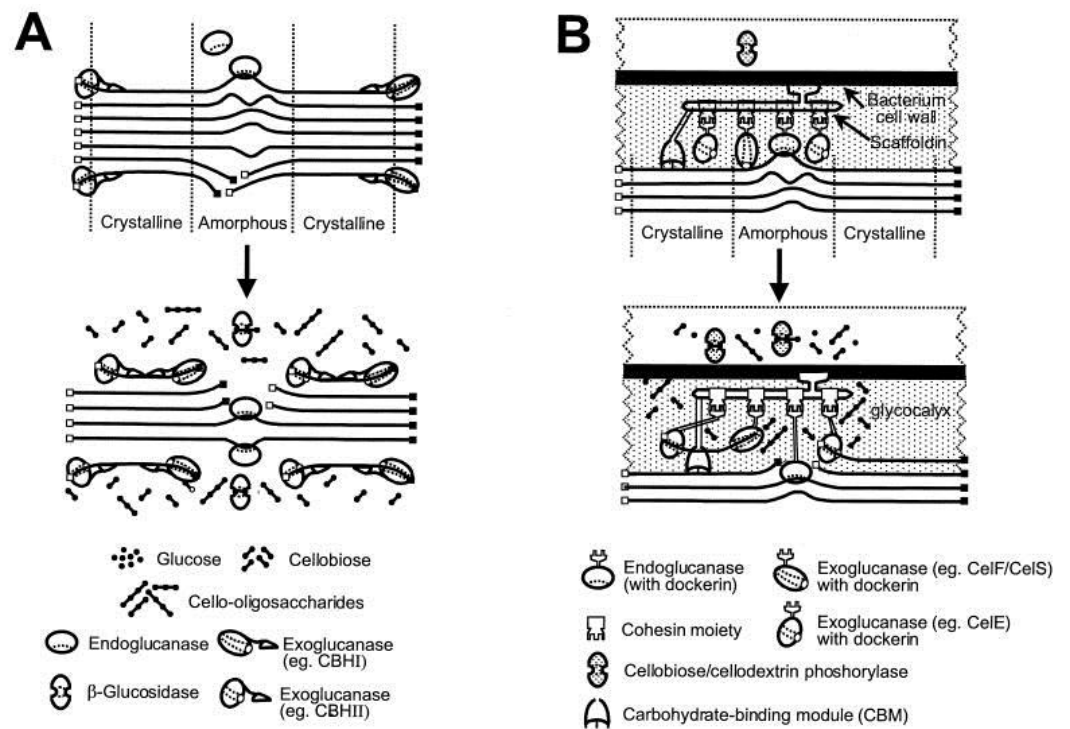
directamente; sin embargo, es importante porque la celobiosa es un inhibidor competitivo de las celulasas y la β - 1,4 glucosidasa reduce esta inhibición por hidrólisis de la celobiosa a glucosa (Sternberg et al., 1977). Por lo tanto las celulasas con los niveles bajos de β - 1,4 glucosidasa hidrolizan lentamente la celulosa, y en tales casos la adición de β - 1,4 glucosidasa promueve la hidrólisis de celulosa (Johnson et al., 1982; Stockton et al., 1991). El proceso de degradación de la celulosa se resume a continuación:



Asimismo la susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática está afectada significativamente por los rasgos estructurales de los materiales celulósicos, que incluyen: grado de acumulación de agua, orden molecular, contenido de material asociado como la lignina, estructura capilar de las fibras de celulosa, área superficial, además del rasgo sugerido como el más importante: cristalinidad (Fan et al., 1980; Ooshima et al., 1983).

Para la medición de la actividad de las celulasas se presentan dos formas: (1) la medición de la actividad individual de la celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas, y β -

glucosidasas) y (2) la medición de la actividad total de celulasas.
(Sheehan & Himmel, 1999).



× El cuadrado sólido representa extremos reducidos, y los cuadrados abiertos representan extremos no reducidos.

Figura 3. Hidrólisis de la celulosa amorfa y microcristalina por sistemas no complejos (A) y complejos (B) de celulasas.

Fuente: Lynd et al., 2002.

a. Endoglucanasas

Las endoglucanasas actúan al azar sobre los enlaces β - 1,4 glucosídicos y su actividad es con frecuencia medida sobre celulosa soluble con alto grado de polimerización, como es el caso de la carboximetilcelulosa. La acción de las endoglucanasas sobre este sustrato celulósico se caracteriza por la disminución de la viscosidad realizando cortes intramoleculares (Zhang et al., 2006). Además la tasa de hidrólisis está condicionada a la habilidad de las endoglucanasas para actuar en las regiones amorfas de la matriz cristalina de la celulosa y crear nuevos extremos reductores en los cuales las exoglucanasas puedan actuar (Malherbe & Cloete, 2002).

La medición de la actividad de endoglucanasa puede ser basada en la reducción de la viscosidad del sustrato y/o en el incremento de extremos reductores que se determinan por técnicas que permitan medir azúcares reductores. Sin embargo, la actividad de las exoglucanasas también incrementa el número de extremos reductores por lo cual, es recomendable que la actividad de las endoglucanasas sea medida por ambos métodos (viscosidad y extremos reductores) (Lynd et al., 2005).

Por otro lado, dicha actividad puede ser fácilmente detectada en medios con CMC o celulosa y adición de varios colorantes como el Rojo Congo, debido a que estos son adsorbidos sólo por largas cadenas de polisacáridos. Este método es semi-cuantitativo y muy adecuado cuando se requiere procesar un gran número de muestras (Ten et al., 2004).

b. Exoglucanasas

Las exoglucanasas clivan los extremos accesibles de la molécula de celulosa para liberar glucosa y celobiosa. La celulosa microcristalina es un sustrato adecuado para la medición de la actividad por tener un bajo grado de polimerización y una baja accesibilidad (Lynd et al., 2005; Zhang et al., 2006).

c. β - glucosidasas

La β - glucosidasa hidroliza la celobiosa soluble y otras celodextrinas con un grado de polimerización superior a seis y la posterior producción de glucosa. La tasa de hidrólisis disminuye con el incremento en el grado de polimerización del sustrato. La actividad de esta enzima también puede ser medida usando celobiosa, la cual no es hidrolizada por las endoglucanasas ni exoglucanasas (Lynd et al., 2005).

d. Celulasas totales

El sistema de celulasas está conformado por endoglucanasas, exoglucanasas y β - glucosidasas, las cuales hidrolizan sinérgicamente la celulosa cristalina. La evaluación de la actividad de las enzimas celulolíticas es con frecuencia evaluada usando sustratos insolubles los cuales incluyen: filtros de celulosa Whatman y celulosa microcristalina. La heterogeneidad de la celulosa insoluble y la complejidad del sistema de celulasas causan problemas en la medición de la actividad total. Resultados experimentales muestran que la estructura heterogénea de la celulosa insoluble induce la disminución en la tasa de hidrólisis en corto tiempo (menos de una hora) provocando la desactivación de las celulasas (Zhang et al., 2006).

1.5.4 Factores ambientales que determinan la degradación microbiana de la celulosa

La degradación de la celulosa por los microorganismos depende de la naturaleza de los organismos colonizadores y de las condiciones de descomposición. Entre los factores ambientales que influyen en la naturaleza de los microorganismos involucrados, los más importantes son humedad, temperatura, aireación, y suficiente suministro de nitrógeno y otros nutrientes (Iglesias et al., 1999), también afecta

la presencia de otros carbohidratos y la proporción relativa de lignina en los restos vegetales (Alexander, 1980).

a. Concentración de nitrógeno en el suelo

La aplicación de nitrógeno inorgánico aumenta la descomposición de la celulosa en el suelo y tanto las sales de amonio como las de nitrato son buenas fuentes de este elemento. La respuesta a éste indica que el nivel de nitrógeno en el suelo es un factor limitante (Alexander, 1980).

Las sustancias con las que está asociada la celulosa en los desechos vegetales influyen sobre la velocidad de la descomposición. La degradación de 30 g de celulosa, de los cuales el 20 a 30 % sirven para la síntesis microbiana, exige la provisión de 1 g de nitrógeno. Cuando la presencia de lignina hace más lenta la descomposición de la celulosa se requiere menos cantidad de nitrógeno, porque éste es poco a poco reciclado. Para los hongos que hidrolizan lignina y celulosa la relación C/N es mayor que 300. Los nitratos favorecen la actividad de las bacterias mientras que el amonio y los aminoácidos son mejor utilizados por las mixobacterias y los hongos. *Azotobacter* y otros organismos que fijan nitrógeno atmosférico junto a las bacterias solubilizadoras de fosfatos, favorecen la descomposición de la celulosa. La aplicación de

nitratos, amonio, urea y estiércol elevan la velocidad de la descomposición (Carrillo, 2003).

b. Temperatura

La hidrólisis biológica de la celulosa puede llevarse a cabo desde temperaturas cercanas a la congelación hasta alrededor de los 65 °C. Cada una de las variedades de organismos celulolíticos es afectada en forma diferente por la temperatura. Los mesófilos dominan en temperaturas moderadas mientras que la microflora termofílica puede degradar la celulosa por arriba de los 45 °C. Debido a los cambios en la composición de la flora inducidos por la temperatura, el calor aumenta la velocidad de transformación del sustrato a causa del efecto directo de ésta sobre la acción enzimática (Alexander, 1980). Entre los microorganismos termófilos se encuentran *Clostridium*, *Streptomyces*, *Chaetomium*, *Humicola*, presentes en el estiércol y los vegetales en descomposición. Los microorganismos celulolíticos del suelo son principalmente mesófilos (Carrillo, 2003).

c. Aireación

La aireación también rige la composición de la flora activa. A causa del proceso anaeróbico, el metabolismo de la

celulosa es reducido significativamente en medios deficientes de oxígeno en comparación con hábitats aireados (Alexander, 1980).

d. pH

En medios con pH entre neutro y alcalino, muchos microorganismos son capaces de crecer y liberar las enzimas apropiadas para la hidrólisis del polisacárido; bajo condiciones ácidas la desaparición de la celulosa se debe principalmente a los hongos filamentosos. Aunque el proceso es rápido a pH menor de 5 y ocasionalmente por debajo de 4, los suelos con bajas concentraciones del ion hidrógeno degradan la celulosa más fácilmente (Alexander, 1980). En suelos con pH 6,5 - 7,5 se encuentra *Cellulomonas*, a pH 5,7 - 6,2 aún desarrolla *Cytophaga* y si la acidez desciende predominan los hongos. Se pueden encontrar bacterias celulolíticas anaerobias también en suelos ácidos con pH 4,3. Las mixobacterias son las más sensibles a la acidez por lo que se las encuentra en el mantillo de huertos, en suelos abonados y en los ricos en calcio. Los actinomicetos se hallan en suelos muy diversos, entre pH 4,6 y 9,5. Al tratar el suelo con cal cambia la composición de la microbiota activa (Carrillo, 2003).

1.5.5 Aplicaciones industriales de las celulasas

Las celulasas han atraído mucho interés debido a la diversidad de su aplicación en las distintas industrias. Las principales aplicaciones industriales de las celulasas se encuentran en la industria textil de “biopulido” de tejidos y en la producción del aspecto de “lavado a la piedra de vaquero”, así como en los detergentes domésticos para ropa en la mejora de la tela dándole suavidad y brillo (Cavaco, 1998). También son utilizadas en la industria de los alimentos como en el procesamiento de jugos de frutas incrementando el porcentaje de extracción de los jugos y mejorando el sabor; en la elaboración de piensos, mejorando la calidad nutricional y digestibilidad (Ovando & Wahszewski, 2005; Lon Wo et al., 2002).

Por otro lado, la demanda energética ha potenciado las investigaciones para obtener biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos, proceso en el cual es necesaria la liberación y conversión de la celulosa a glucosa, la cual finalmente por procesos biológicos se transformará en etanol. Esta conversión puede ser mediada por celulasas de diversas fuentes, entre ellas, las de origen bacteriano (Viviano et al., 2011; Maki et al., 2011; Limayem et al., 2012).

1.5.6 Determinación de la actividad celulolítica

La determinación de la actividad enzimática de las celulasas es un proceso complicado y determinado básicamente por dos factores: la heterogeneidad física del sustrato y la complejidad de la celulasa (Ghose, 1987; Wood & Bhat, 1988). Por lo tanto, resulta imposible intentar comparar los diversos resultados que se obtienen a partir de estimaciones que usan diferentes metodologías (Vahjen et al., 1997). Según Wood y Bhat (1988) los problemas que se enfrentan los investigadores en la determinación de la actividad de la celulasa son de diferente naturaleza (por ejemplo temperatura, pH, tiempo de reacción, etc.) y existe un alto número de unidades arbitrarias para expresar la actividad que actualmente continúan siendo usadas por los diferentes productores de enzimas y laboratorios en todo el mundo (Beauchemin et al., 2003).

De todos los métodos disponibles, los más comunes son los métodos espectrofotométricos, los cuales se basan en la medición de la cantidad de azúcares reductores liberados durante las reacciones enzimáticas en un sustrato definido (Sabatier & Fish, 1996; Kung, 1996). Entre éstos, los métodos más referidos son el método alcalino del ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) y el método del cobre de Nelson - Somogyi (Nelson, 1944).

Se ha observado que el método del DNS es más rápido, menos tóxico y más conveniente de usar que el método de Nelson - Somogyi (Bailey et al., 1992), especialmente cuando se requiere comparar una cantidad muy grande de muestras (Vahjen et al., 1997). Sin embargo algunos autores indican que el método DNS es menos sensible que el de Nelson - Somogyi (Mc Cleary, 1992) y esta diversidad de criterios hace que se continúen empleando indistintamente.

a. Prueba cualitativa con Rojo Congo

La base de esta prueba está en la hidrólisis de los sustratos celulósicos, siendo los medios sólidos generalmente los más usados, pero en estos las colonias de microorganismos que utilizan el sustrato son con frecuencia difíciles de diferenciar de otros microorganismos que no lo hacen. Teather y Wood en 1982, observaron que el Rojo Congo podía ser usado en los ensayos para evidenciar la hidrólisis de polisacáridos debido a que el colorante forma complejos con las moléculas aún no hidrolizadas, facilitando así la diferenciación entre microorganismos celulolíticos y no celulolíticos por la formación de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias (Hendricks et al., 1995).

b. Prueba cuantitativa por la técnica del ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS)

La actividad del sistema enzimático en el complejo celulolítico puede medirse determinando la cantidad de glucosa liberada mediante DNS. Esta técnica demuestra la presencia del grupo carbonilo libre (C=O) de los azúcares reductores que implica la oxidación del grupo funcional aldehído de la glucosa (Miller, 1959).

En este método el ácido 3,5 - dinitrosalicílico es reducido a ácido 3 - amino - 5 - nitrosalicílico, mientras que los grupos aldehídos son oxidados a grupos carboxilos (Figura 4). La reducción del ácido genera un color amarillo el cual es proporcional a la concentración del azúcar reductor presente y se evidencia por medio de la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro lo que implica la aplicación de la ley de Beer Lambert (Miller, 1959).

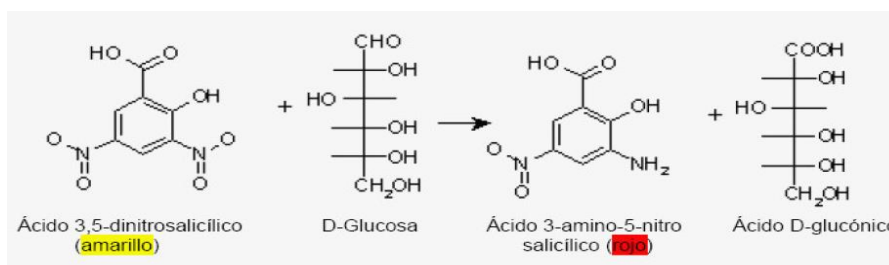


Figura 4. Reacción del ácido 3,5 – dinitrosalicílico.

Fuente: Ríos, 2008.

La lectura de la prueba de DNS es altamente influenciada por las mismas condiciones de la prueba, como la temperatura del agua de calentamiento, la transferencia de calor, el tiempo de reacción, la proporción de glucosa, celobiosa y celodextrinas presentes y el tiempo de preparación del reactivo, el cual con frecuencia es ignorado (Zhang et al., 2006).

1.5.7 Identificación bacteriana mediante secuenciación del gen ARNr 16S

Los ribosomas son orgánulos complejos, altamente especializados, que utilizan los organismos para el complicado proceso de síntesis de proteínas. El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S). Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico, constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes, mientras que la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S junto con unas 34 proteínas (Rodicio & Mendoza, 2004).

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1 500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de

cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica, representando una ventaja en la identificación bacteriana tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas (Rodicio & Mendoza, 2004).

Los ácidos nucleicos y las proteínas, macromoléculas comunes a todos los seres vivos, cambian con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. El ARNr 16S fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo por las siguientes características:

1) Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación. 2) Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios. 3) Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU (de la subunidad pequeña 30S) contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos. 4) El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S minimiza las fluctuaciones

estadísticas. 5) La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso. 6) Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento (Woese, 1987).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación y delimitación del área de estudio

El área de estudio comprende la zona geotermal de Calientes, ubicada en la provincia de Candarave, región Tacna, la cual se encuentra a 4 400 msnm, al occidente de la cordillera de los Andes en el sur de Perú, en las faldas del volcán Yucamane (Cruz et al., 2010).

En dicha zona se encuentran las ocho fuentes termales muestreadas con distintas características físico-químicas, las cuáles mostraron las más altas temperaturas y tenían presencia de tapetes microbianos y biopelículas (Tabla 1, Anexo 1).

2.2 Población y muestra

2.2.1 Población

La población estuvo compuesta por las bacterias termófilas aerobias cultivables presentes en las ocho fuentes termales seleccionadas de Calientes.

2.2.2 Muestra

La muestra fue las bacterias termófilas aisladas con actividad de celulasas de las ocho fuentes termales de Calientes.

Tabla 1. Ubicación y características físico-químicas de las fuentes termales muestreadas de Calientes

Fuente termal	Coordenadas (UTM)	Color de la fuente termal	Temperatura (°C)	pH	Muestra biológica
T1	0379444 E 8108728 N	Pardo	85	7,5	Fango
T2	0378550 E 8107592 N	Café	84	7,4	Biopelícula
T3	0378514 E 8107752 N	Verde	70	7,2	Tapete microbiano
T4	0378265 E 8107192 N	Café	88	7,1	Fango
T5	0378269 E 8107194 N	Verde	87	7,5	Biopelícula
T6	0378207 E 8107128 N	Blanco	70	7,5	Tapete microbiano
T7	0378289 E 8107169 N	Verde	60	7,5	Tapete microbiano
T8	0378314 E 8107176 N	Café	75	7,2	Fango

× UTM: Marcador transversal universal de la zona 19 K sobre la tierra.
E: este, N: norte.

Fuente: Elaboración propia.

2.3 Diseño de investigación

El tipo de investigación fue básica descriptiva, donde para el aislamiento de bacterias celulolíticas termófilas se utilizó un diseño experimental completamente al azar (D.C.A.), descrito por Palacios (2004) donde la asignación de los tratamientos fue el número de fuentes termales evaluadas (8), la variable respuesta fue el número de unidades formadoras de colonia de cada fuente termal crecidas sobre el medio de aislamiento salino para termófilos (MST) para bacterias celulolíticas termófilas.

En la etapa de determinación de actividad cualitativa celulolítica, para la pre-selección de bacterias productoras de celulasas, se aplicó como tratamientos a los 31 cultivos bacterianos aislados en las placas con el medio de aislamiento MST, la variable respuesta fue el diámetro de las zonas de hidrólisis de las celulasas a los distintos valores de pH de 4,8; 7,4; 8,4 y 9,4, los cuáles fueron previamente descritos por Vega et al. (2012) y Montoya (2012), para una actividad óptima de celulasas en hongos y bacterias.

Para la optimización de la actividad enzimática de celulasas de las cepas seleccionadas, se usó el diseño experimental factorial multinivel descrito por Palacios (2004), donde se planteó:

- Número de factores experimentales: 2 (pH y temperatura)

- Número de variables de respuestas: 1 (actividad enzimática de endoglucanasas expresada en UI ml⁻¹)
- Número de bloques: 2 repeticiones

El valor y tratamientos (niveles) de los factores experimentales fueron según el caso de la cepa evaluada, teniendo como precedente su actividad enzimática cualitativa. Se planteó las siguientes opciones:

Factores experimentales	Valor mínimo	Valor máximo	Tratamientos (niveles)	Unidades
pH	4,4	8,4	5	pH
Temperatura	60,0	80,0	5	°C
<ul style="list-style-type: none"> • Número de corridas: 50 • Grados de libertad para el error: 43 				

Factores experimentales	Valor mínimo	Valor máximo	Tratamientos (niveles)	Unidades
pH	4,4	9,4	6	pH
Temperatura	50,0	75,0	6	°C
<ul style="list-style-type: none"> • Número de corridas: 72 • Grados de libertad para el error: 65 				

2.4 Métodos

2.4.1 Colección de muestra

Se colectaron en total 1 L (de 2 puntos de muestreo por fuente termal) de las muestras de fango, biopelículas o tapetes microbianos, según la naturaleza de las 8 fuentes termales de Calientes muestreadas, con temperaturas de 60 a 88 °C (Anexo 1). Se tomó la muestra a una distancia alejada de la orilla de la fuente termal muestreada con un frasco estéril de 500 ml de boca ancha, el frasco fue sumergido completamente en posición invertida, una vez en contacto con la muestra se dio la vuelta en sentido contrario para su recolección. Las muestras fueron transportadas en termos estériles de 1 L para su procesamiento en el Laboratorio de Micología y Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina en la ciudad de Lima.

2.4.2 Aislamiento

Se realizó un enriquecimiento de la biodiversidad procariota termofílica con actividad de celulasas de las muestras tomadas de las fuentes termales con el método modificado de Kublanov et al. (2009). Para ello en matraces de Erlenmeyer de 250 ml se pesó 0,5 g de celulosa microcristalina y se autoclavó para su esterilización. Posteriormente fue agregado 50 ml de muestra de las fuentes termales y se incubó en baño María en agitación a 100 rpm en el agitador orbital Lab Line a 70 °C para las muestras

T1 - T5 y a 60 °C para las muestras T6 - T8, durante 14 días. Luego se procedió a la siembra por incorporación, agregándose 1 ml de muestra de forma directa y con diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} a las placas Petri de 100 x 20 mm y luego se añadió aproximadamente 20 ml del medio de aislamiento salino para termófilos (MST): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 11,7 g L⁻¹, KH_2PO_4 3,7 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,8 g L⁻¹, extracto de Levadura 0,5 g L⁻¹, peptona 0,5 g L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 mg L⁻¹, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 160 mg L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 140 mg L⁻¹, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 370 mg L⁻¹, agar 2 % , el medio se suplementó con CMC 1 %, se ajustó el pH a 7 con NaOH 1 N, se incubó a 60 °C durante 10 días. Se usó el agua de cada fuente termal para la preparación del medio de aislamiento.

El criterio para aislar las colonias crecidas en medio MST con CMC al 1 %, fue la diferenciación visual considerando, color, tamaño y aspecto. Las colonias crecidas fueron estriadas para luego ser almacenadas en agar nutritivo y conservadas a 4 °C. Para la identificación microscópica se realizó coloración Gram de cada microorganismo aislado de un cultivo sobre agar nutritivo a las 24 horas, observándose en el microscopio biológico Motic BA410, además se midió el largo de los microorganismos observados en todo el campo microscópico y fotografió con el software Motic Images Pus 2.0 ML.

2.4.3 Actividad cualitativa de celulasas

Fue desarrollada en base al método de Teather y Wood (1982). Para ello, se sembró por incorporación 20 μl de inóculo (de D.O. de 0,3 de cultivo bacteriano en caldo nutritivo a una longitud de onda de 600 nm) en 150 μl de medio de producción de celulasas descrito por Mandels y Reese (1957): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,14 %, KH_2PO_4 0,2 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03 %, CaCl_2 0,03 %, $\text{Co}(\text{NH}_2)_2$ 0,03 %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 mg L^{-1} , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 160 mg L^{-1} , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 140 mg L^{-1} , CoCl_2 200 mg L^{-1} , peptona 0,1 %, extracto de levadura 0,1 %, CMC 0,5 %, agar al 2 % (p/v), pH 7 ajustado con NaOH 1 N, en microplacas ELISA de fondo plano de 96 pozos (LabSource, Arbor, IL, USA) y se incubaron a 60 °C por 72 h. El contenido de cada pocillo (después de comprobar el crecimiento del microorganismo) se retiró con un sacabocado estéril y se colocó sobre placas rectangulares de vidrio especialmente diseñadas (300 cm^2) que contenían los medios sólidos con el sustrato de celulasas (Meza et al., 1995), incubándose a 70 °C en baño María por 4 h.

Los medios sólidos con el sustrato para celulasas contenían: CMC al 0,5 % (p/v) y agar al 2 % (p/v) disueltos en tampones a pH 4,8; 7,4; 8,4 y 9,4 a 0,05 M de acetato de sodio, fosfato de sodio, barbital - HCl y glicina NaOH respectivamente.

Para el revelado de las zonas de hidrólisis por las celulasas, se agregó una solución de Rojo Congo al 0,1 % (p/v) hasta cubrir toda la placa, se dejó a temperatura ambiente por 15 min y luego se retiró el exceso de colorante lavando con NaCl 1 M. Se evidenció la actividad enzimática por la difusión de la enzima, presente en el disco de agar sobre el medio de tamizado por la presencia de zonas transparentes no teñidas.

2.4.4 Actividad cuantitativa de celulasas

a. Inóculo

Se sembró una asada de cada cultivo bacteriano seleccionado en 3 ml de caldo nutritivo y se incubó a $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$, hasta obtener una D.O. de 0,3 en el espectrofotómetro Spectronic 20D⁺ a una longitud de onda de 600 nm.

b. Cultivo

Se inoculó 3 % (v/v) de caldo nutritivo con crecimiento bacteriano en matraces con deflectores de 250 ml con 40 ml de medio de producción con CMC 1 % (p/v) ajustado a pH 7 con NaOH 1 N. Se incubó en agitador orbital Lab Line a 150 rpm por 48 horas a $60 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. El cultivo obtenido se centrifugó a 6 000 rpm por 20 min, el sobrenadante fue utilizado para la

cuantificación de la actividad enzimática y para la medición de proteínas solubles; mientras que el sedimento fue utilizado para la medición de biomasa.

c. Determinación de actividad enzimática

Se midió la actividad de la enzima endoglucanasa por el método descrito por Ghose (1987).

Para ello previamente a la medición de la actividad de la enzima endoglucanasa, se realizó la curva estándar de una solución de glucosa (1 mg ml^{-1}) de la siguiente manera:

Reactivos	Blanco reactivo	1	2	3	4	5
Solución estándar de Glucosa (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Tampón acetato 50 mM pH 4,8 (ml)	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0
Concentración final de glucosa (mg ml^{-1})	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Reactivo DNS (ml)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Se colocaron los tubos en agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente se enfriaron en agua corriente.						
Agua destilada (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Se mezcló bien todos los tubos y se leyó las absorbancias en el espectrofotómetro Spectronic 20D⁺ a una longitud de onda de 540 nm contra el blanco de reactivo. Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron contra la concentración de glucosa, además resultó conveniente realizar una regresión lineal $y = a + bx$; donde y = absorbancia, x = concentración de glucosa.

La medición de la actividad enzimática de endoglucanasas se realizó de la siguiente manera:

Reactivos	Blanco del reactivo	Blanco del CMC	Blanco de la muestra	Muestra
Tampón acetato de sodio pH 4,8 ó fosfato de sodio pH 7,4 a 50 mM (ml)	1,5	0,5	1,0	0
Dilución de enzima (ml)	0	0	0,5	0,5
Incubar los tubos en baño maría a 70 °C por 5 minutos				
Carboximetil celulosa 1 % (ml)	0	1,0	0	1,0
Incubar los tubos en baño maría a 70 °C por 30 minutos				
Reactivo DNS (ml)	3,0	3,0	3,0	3,0
Colocar los tubos en baño de agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente enfriarlos en baño de agua corriente				
Agua destilada (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0

Se agitó bien los tubos y se leyó las absorbancias a 540 nm contra el blanco de reactivo (BR). Se calculó la concentración de glucosa en el blanco del CMC (BCMC), en el blanco de la muestra (BM) y en la muestra respectiva (M), utilizando la curva estándar de glucosa con la ecuación de regresión encontrada previamente. En el caso de los valores de la absorbancia de la muestra que escaparon del rango de la curva estándar, se realizaron diluciones de 1/2, 1/3 y 1/4 según correspondió.

La concentración de glucosa real de la muestra se determinó de la siguiente manera:

$$[\text{Glu}] = [M] - ([BM] + [\text{BCMC}])$$

La actividad enzimática de endoglucanasas se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\beta\text{-endoglucanasa (UI ml}^{-1}\text{)} = [\text{Glu}] \times 0,37 \times \text{dilución}$$

Donde: 0,37 es un factor para obtener el número de μmoles de glucosa formados en un minuto.

La actividad de endoglucanasas fue expresada en UI ml^{-1} , donde una unidad de enzima (UI) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto (Miller, 1959).

A partir de este ensayo se seleccionó los cultivos bacterianos con mayor actividad enzimática de endoglucanasas para ser optimizada, evaluándose en los diferentes tampones: acetato de sodio 50 mM pH 4,4 y 5,4; fosfato de sodio 50 mM pH 6,4; barbital - HCl 50 mM pH 8,4 y glicina NaOH 50 mM pH 9,4; y a diferentes temperaturas de 50 °C a 80 °C.

2.4.5 Determinación de biomasa celular

Se determinó la biomasa celular según el método descrito por Ramírez y Cocha, (2003), utilizando la diferencia de pesos entre los tubos con biomasa sedimentada y secada a 100 °C durante 24 horas y los tubos vacíos secados. La biomasa fue expresada en mg ml^{-1} .

2.4.6 Cuantificación de proteínas solubles

Las muestras fueron previamente tratadas por el método descrito por Wessel y Fluegge (1984), para ello fueron centrifugadas para remover los sólidos y usar el sobrenadante, el cual se precipitó con TCA al 10 % (p/v) en una relación de 2:1 respectivamente, se incubó toda la noche a 4 °C y luego se centrifugó por 20 min a 6 000 rpm descartándose el sobrenadante y se disolvió el sedimento en 1 ml de solución de Na_2CO_3 al 2 % en 0,1 M de NaOH.

La cuantificación de proteínas solubles fue realizada mediante el método de Lowry et al. (1951), para ello se realizó la curva estándar de una solución de seroalbúmina bovina (1 mg ml⁻¹) de la siguiente manera:

Reactivos	Blanco reactivo	1	2	3	4	5	6
Solución estándar de seroalbúmina bovina (ml)	0	0,0155	0,031	0,0625	0,125	0,2	0,25
Suero fisiológico (ml)	0,5	0,4845	0,469	0,4375	0,375	0,3	0,25
Concentración de proteína (mg ml ⁻¹)	0	0,031	0,062	0,125	0,25	0,4	0,5
Reactivo C (ml)	5	5	5	5	5	5	5
Mezclar e incubar a temperatura ambiente por 10 min							
Reactivo Folin Ciocalteu 1N (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mezclar e incubar a temperatura ambiente por 30 min							

El reactivo C fue una solución de la mezcla de 3 reactivos en una proporción de 100:1:1, los cuales fueron: reactivo A (solución de Na₂CO₃ al 2 % en 0,1 M de NaOH), reactivo B1 (solución CuSO₄.5H₂O al 5 %) y reactivo B2 (solución de tartrato de sodio y potasio al 1 %).

Se leyó las transmitancias, cuya escala es lineal, en el espectrofotómetro Spectronic 20D⁺ a una longitud de onda de 550 nm contra el blanco de reactivo. Los valores de transmitancias obtenidos fueron convertidos a absorbancias mediante la relación:

$$\text{Absorbancia} = \text{Log} (100/\text{Transmitancia})$$

Los valores de absorbancias obtenidos se graficaron contra la concentración de proteína, además resultó conveniente realizar una regresión lineal $y = bx$; donde y = absorbancia, x = concentración de proteína.

Los cálculos de concentración de proteína soluble en la muestra se realizaron con la ecuación de regresión obtenida de la curva estándar.

2.4.7 Análisis molecular

a. Extracción de ADN

Fue realizada en base al método descrito por Sambrook y Russell (1989), para ello se usó 10 ml de un cultivo joven de 18 horas el cual fue centrifugado a 14 000 rpm por 10 min, al pellet obtenido se añadió 100 μ l de TES (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH

8, sacarosa 25 %), 40 μl de lisozima (5 mg ml^{-1}) y 40 μl de EDTA 0,25 M, después de ser incubado a 37 °C por 10 min se agregó 175 μl de agua ultrapura, 50 μl de SDS al 10 % y 5 μl de RNAsa (10 mg ml^{-1}), se mezcló por vórtex e incubó a 37 °C por 20 min, luego se añadió 10 μl de proteinasa K (10 mg ml^{-1}) y tras incubarse a 37 °C por 30 min se agregó 85 μl de TE (tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), 120 μl de NaCl 5 M, se mezcló e incubó a 65 °C por 20 min. Seguidamente se añadió 75 μl de acetato de potasio 8 M y se homogenizó por inversión del tubo, luego se incubó a 4 °C por 15 min y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min. El material genético se encuentra en el sobrenadante obtenido, el cual fue transferido a un tubo nuevo, se agregó etanol absoluto al 95 % hasta llenar el tubo y se dejó precipitar el ADN durante toda la noche a -20 °C, transcurrido el tiempo se centrifugó a 14 000 rpm por 30 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento obtenido fue lavado con etanol al 70 %, se centrifugó a 14 000 rpm por 30 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento seco fue eluido en 50 μl de TE (Tris 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

b. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Fue realizado en el Laboratorio de Micología y Biotecnología de la Universidad Agraria La Molina. Para ello se siguió el protocolo descrito por el kit utilizado GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), donde las concentraciones de los

reactivos fueron para un volumen total de 20 μl : 4 μl de Buffer Green Flexi, 2 μl de MgCl_2 25 mM; 1,2 μl de dNTPs 10 mM; 0,2 μl de Taq DNA polimerasa ($5 \text{ u } \mu\text{l}^{-1}$); 0,4 μl de cebadores ARNr 16S 10 μM (27F y 1492R) , 3 μl de ADN 50 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ y 8,8 μl de agua Depc.

Las secuencias de los cebadores ARNr 16S utilizados para la reacción de PCR fueron:

- 27F - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
- 1492R - GGTTACCTTGTTACGACTT

Se programó en el Termociclador S1000 (BioRad) el siguiente programa de corrida:

- Ciclo 1: 95 °C por 4 min
- Ciclo 2: 95 °C por 1 min (desnaturalización)
55 °C por 1 min (hibridización)
72 °C por 1 min (polimerización) } Por 40 ciclos
- Ciclo 3: 72 °C por 5 min
- Ciclo 4: 4 °C por tiempo infinito

Para observar las secuencias amplificadas por PCR se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 %, con bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) y como tampón de corrida se

utilizó TAE y se corrió a 75 V. Como marcador se utilizó el fago lambda digerido con Hind III y como control positivo una cepa de *Escheria coli*.

c. Purificación de producto de PCR

La purificación del producto de PCR se realizó en base al método descrito por Grey et al. (1992), usando una jeringa para el squach de la agarosa para obtener el ADN, se enjuagó con tampón acetato de sodio 0,3 M y 1 mM EDTA pH 7, luego se agregó tampón acetato de sodio 3 M e isopropanol, se incubó por 30 min a -20 °C, posteriormente se centrifugó por 20 min a 14 000 rpm a 4 °C. Se lavó el sedimento con etanol al 70 %, se centrifugó por 10 minutos a 14 000 rpm a 4 °C, luego se secó el sedimento a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 20 µl de agua Depc.

2.4.8 Procesamiento y análisis de la información

Se realizó dos repeticiones para cada experimento realizado; asimismo para el análisis de los datos obtenidos se realizó el análisis de varianza (ANVA) empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad. La comparación de las medias entre los tratamientos se realizó con la prueba de significación de Duncan al 95 % de confiabilidad, para probar la existencia de diferencias

significativas entre los tratamientos y elegir el mejor (Palacios, 2004).

Para el análisis de la actividad celulolítica de las cepas seleccionadas y la optimización de la actividad celulolítica termófila se usó el software Statgraphics Centurion XVI. Se realizó el ANVA para los factores experimentales (pH, temperatura y la interacción de ambos) donde se observó la significancia de cada efecto estudiado. Para la optimización de los factores experimentales se utilizó el análisis de regresión que tuvo como meta maximizar la actividad enzimática termófila de las cepas seleccionadas, para ello se evaluó la significancia estadística de cada uno efecto de los factores experimentales en el análisis de regresión, comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental, excluyendo los factores que no presentan significancia para la obtención de la ecuación de regresión. Asimismo para el gráfico de superficie respuesta esperada optimizada se usó el software MATLAB.

Para el procesamiento del secuenciamiento del gen ARNr 16S, los productos de PCR purificados de aproximadamente 1 400 pb se secuenciaron mediante el uso de 2 cebadores (27F y 1492R). La secuenciación se realizó mediante el uso del Kit “BigDye Terminator cycle sequencing” (Applied Biosystems, EE.UU.). Los productos de secuenciación se resolvieron en un sistema de “Applied Biosystems modelo 3730XL automated DNA

sequencing” (Applied Biosystems, EE.UU.) en la empresa Macrogen Inc. En Seúl, Corea del Sur.

Para el análisis de la secuenciación del gen ARNr 16S se usó el programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible en internet a partir del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

III. RESULTADOS

3.1 Aislamiento

Ocho muestras de las fuentes termales de Calientes se utilizaron para aislar bacterias productoras de celulasas mediante el uso del medio de aislamiento salino para termófilos (MST) con CMC como inductor de celulasa. Las muestras de las fuentes termales mostraron variabilidad de cultivos bacterianos.

Con base a las diferencias en la morfología de colonia y características microscópicas, se aislaron un total de 31 cultivos bacterianos, de los cuales el que mayor población presentó el cultivo bacteriano B25A con 20×10^3 UFC ml⁻¹, seguido del cultivo bacteriano B12N con 17×10^3 UFC ml⁻¹ ambas aisladas de la fuente termal T₃ (Figura 5).

El 74,2 % de los 31 cultivos bacterianos aislados mostraron forma circular, aspecto cremoso; y todas presentaron color, café, beige o crema con centro café (Anexo 3). Asimismo el 61,29 % fueron Gram positivo y el 38,71 % Gram negativo (Anexo 4).

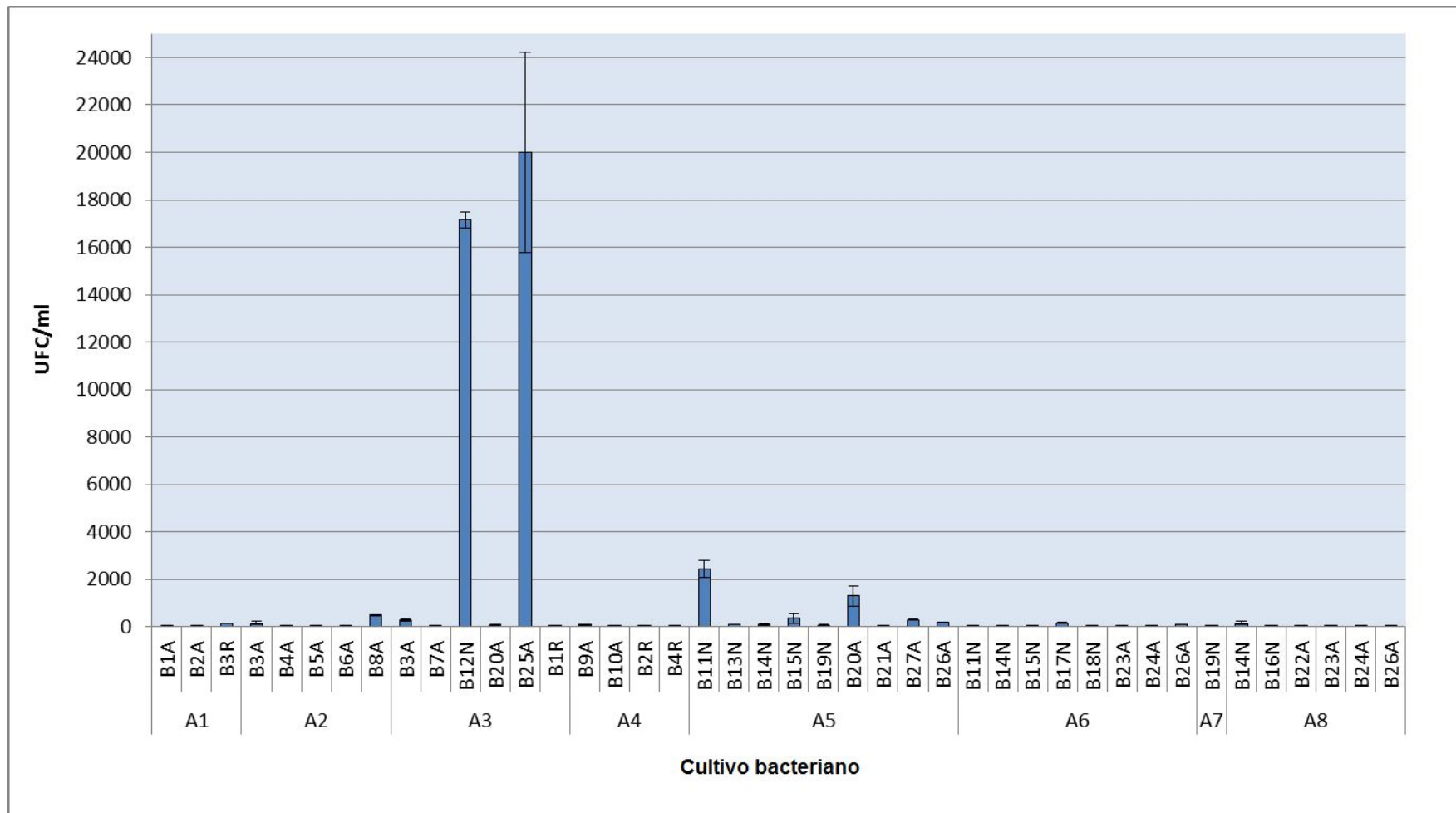


Figura 5. Cultivos de bacterias termófilas de las fuentes termales de Calientes.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2. Análisis de varianza de unidades formadoras de colonias de las fuentes termales de Calientes

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Tratamientos (Fuentes termales)	7	6,60247E7	9,4321E6	170,25	0,0000
Error	8	443 202,0	55 400,30		
Total	15	6,64679E7			

CV: 26,42 %

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

Del análisis de varianza (ANVA), empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad, para la variable unidades formadoras de colonias, se observa que el valor P de la prueba F es menor que 0,05; por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la variable unidades formadoras de colonias de las 8 fuentes termales muestreadas con un nivel de confianza del 95 %. El coeficiente de variabilidad fue 26,42 % indicando que existe heterogeneidad de población entre las 8 fuentes termales, que depende de las propiedades físico-químicas de cada muestra (temperatura, pH, composición). Para determinar cuál es la muestra más favorable para el aislamiento de

bacterias celulolíticas termófilas se procedió a realizar la prueba de significación de Duncan al 95 % de confiabilidad.

Tabla 3. Promedios de significancia de Duncan para los promedios del recuento de UFC de las fuentes termales de Calientes

Orden de mérito	Fuentes termales (tratamientos)	Casos	Promedio (UFC ml ⁻¹)	Grupos homogéneos*
1	T ₃	2	6,3 x 10 ³	a
2	T ₅	2	5,4 x 10 ²	b
3	T ₂	2	1,4 x 10 ²	b
4	T ₁	2	6,8 x 10	b
5	T ₆	2	4,5 x 10	b
6	T ₈	2	4,4 x 10	b
7	T ₄	2	2,8 x 10	b
8	T ₇	2	2 x 10	b

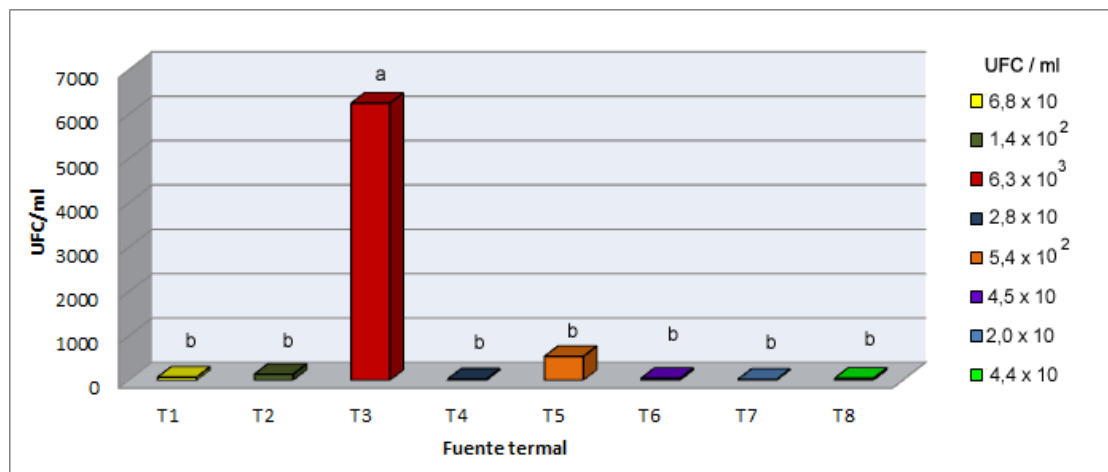
* Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En la tabla 3 se observa que la muestra tomada de la fuente termal T₃ permitió el crecimiento de un mayor número de colonias en las placas de aislamiento, superando estadísticamente al resto con un promedio de 6,3 x 10³ UFC ml⁻¹. La fuente termal T₃ difiere del resto de fuentes, las

cuales no presentan diferencias significativas entre sí, obteniéndose 2 grupos homogéneos (según la alineación de las letras designadas en columnas). El mayor número de UFC obtenidas a partir de la fuente termal T₃ nos indica algunas de las condiciones favorables de ésta para el aislamiento de microorganismos celulíticos, como su temperatura de 70 °C, pH neutro, naturaleza tipo tapetes bacterianos, los cuales presentan alta densidad poblacional. Mientras que las fuentes termales que presentaron menor número de colonias fueron T₄ y T₇.



× Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

Figura 6. Recuento de UFC de las fuentes termales de Calientes.

Fuente: Elaboración propia.

3.2 Actividad cualitativa de celulasas

La actividad cualitativa de las celulasas de los 31 cultivos aislados, usando CMC como sustrato a pH 4,8; 7,4; 8,4 y 9,4; se evidenció por las

zonas de hidrólisis representadas por áreas desteñidas que indican la acción del rompimiento de los enlaces β -1, 4 de la celulosa y presencia de endoglucanasas (Anexo 6, Anexo 7).

De los 31 cultivos evaluados el 19,35 % de los aislados bacterianos mostraron actividad celolítica incluso a pH 9,4; pero la mayoría, el 74,19 % y 77,42 %, presentó su actividad a pH 4,8 y 7,4 respectivamente y los cultivos B3R y B4R no muestran actividad a ningún pH evaluado indicando la ausencia de la enzima celulasa (Figura 7).

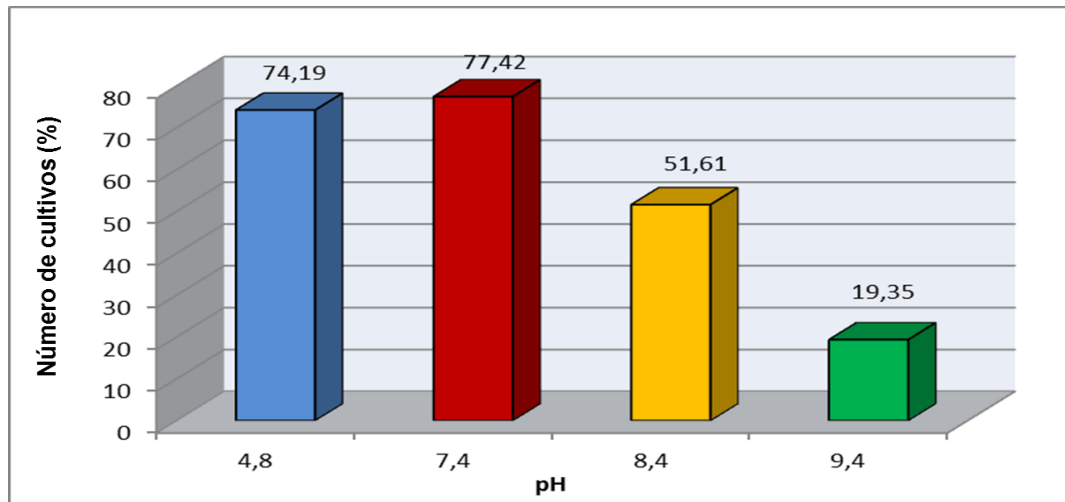


Figura 7. Incidencia de actividad cualitativa de celulasas a diferentes valores de pH.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Análisis de varianza de diámetro de zona de hidrólisis de celulasas de los cultivos bacterianos aislados

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Tratamientos (cultivos)	28	310,674	11,0955	1 350,880	0,0000
Error	29	0,2382	0,0082		
Total	57	310,912			

CV: 1,88 %

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

Del análisis de varianza (ANVA), empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad, para la variable de diámetro de zonas de hidrólisis de celulasas, se observa que el valor P de la prueba F es menor que 0,05; por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la variable de diámetro de las zonas de hidrólisis de celulasas entre un nivel de cultivo bacteriano y otro, con un nivel de confianza del 95 %. El coeficiente de variabilidad fue 1,88 % indicando que existe heterogeneidad de las medias de la actividad cualitativa, a diferentes valores de pH, entre los cultivos bacterianos evaluados. Para determinar cuáles son los mejores cultivos bacterianos productores de celulasas y su selección para su posterior análisis se

procedió a realizar la prueba de significación de Duncan al 95 % de confiabilidad.

Tabla 5. Promedios de significancia de Duncan para los promedios del diámetro de la zona de hidrólisis de celulasas de los cultivos bacterianos aislados

Orden de mérito	Cultivos (tratamientos)	Casos	Promedio (mm)	Grupos homogéneos*
1	B1R	2	9,88	a
2	B15N	2	9,02	b
3	B17N	2	8,94	b
4	B24A	2	8,44	c
5	B20A	2	8,28	c
6	B12N	2	7,25	d
7	B26A	2	6,00	e
8	B7A	2	6,00	e
9	B11N	2	5,81	e
10	B3A	2	5,50	f
11	B23A	2	5,38	f
12	B27A	2	4,81	g
13	B18N	2	4,50	h
14	B8A	2	4,31	i
15	B21A	2	4,25	i
16	B25A	2	3,88	j
17	B6A	2	3,88	j

18	B14N	2	3,69	j
19	B10A	2	3,69	jk
20	B13N	2	3,63	jk
21	B9A	2	3,56	k
22	B2A	2	3,50	k
23	B4A	2	3,50	k
24	B19N	2	3,06	l
25	B22A	2	2,25	ll
26	B2R	2	2,06	m
27	B1A	2	1,69	n
28	B5A	2	1,63	n
29	B16N	2	1,63	n

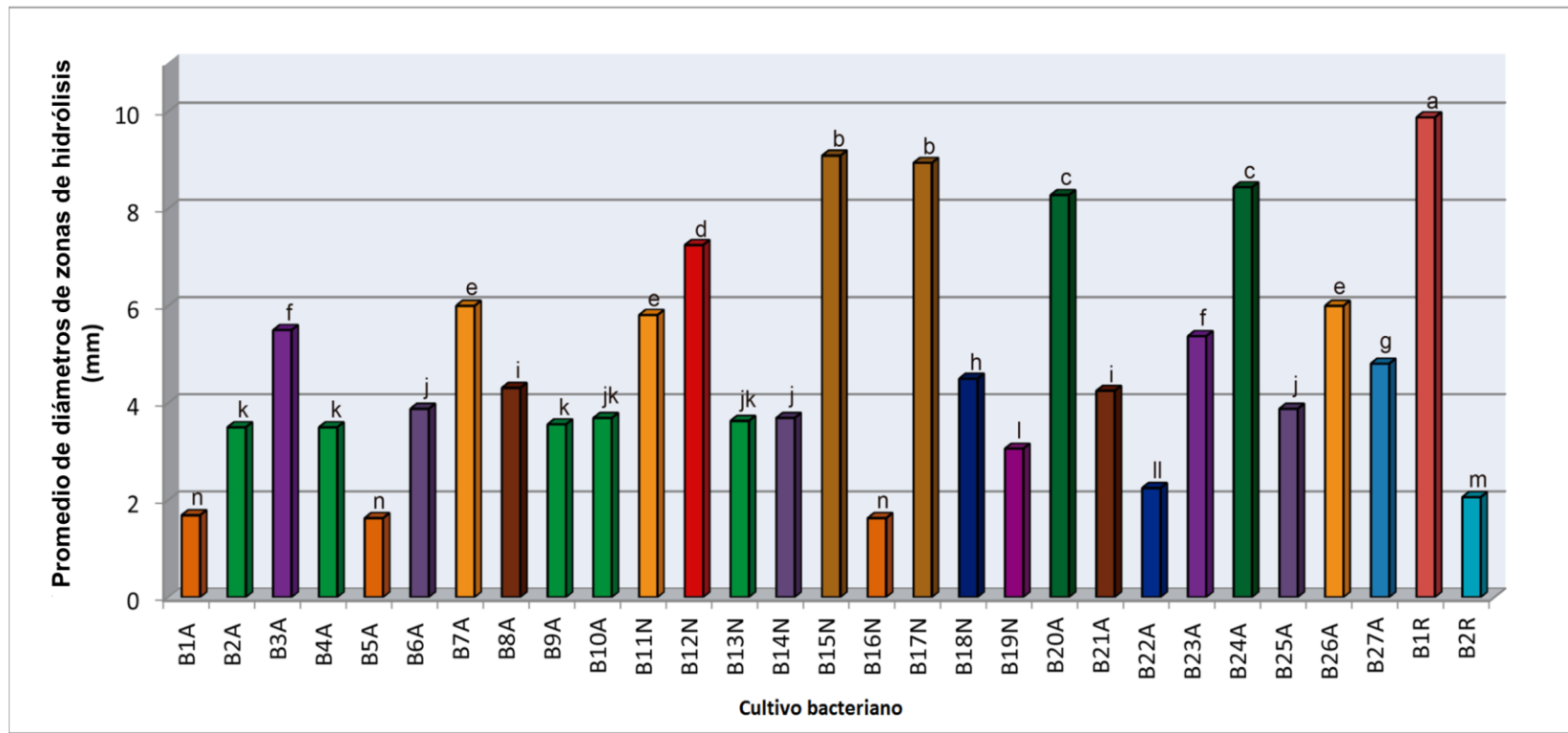
× Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En la tabla 5 se observa 15 grupos homogéneos (según la alineación de las letras designadas en columnas) los cuales difieren entre sí. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de letra designada. El cultivo bacteriano B1R superó estadísticamente en promedio al resto de cultivos bacterianos con 9,88 mm de diámetro de zona de hidrólisis de celulasas. Del total de los 31 cultivos bacterianos aislados se pre-seleccionaron 6

cultivos, para su posterior análisis, las cuales mostraron altos promedios superiores a 7 mm, debido a su actividad en casi todos los valores de pH evaluados, indicando estabilidad de la enzima, mientras las de menor promedio sólo mostraron actividad a un solo pH (óptimo), indicando su sensibilidad a los cambios de pH los cuales afectan drásticamente su actividad.



× Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

Figura 8. Diámetro de zona de hidrólisis de celulasas de los cultivos bacterianos aislados.

Fuente: Elaboración propia.

3.3 Actividad cuantitativa de celulasas

De los cultivos bacterianos pre-seleccionados anteriormente se determinó cuantitativamente la actividad celulolítica de endoglucanasas en una fermentación sumergida a un pH de 4,8 y 7,4 a 70 °C, para su selección y posterior optimización de la respuesta esperada.

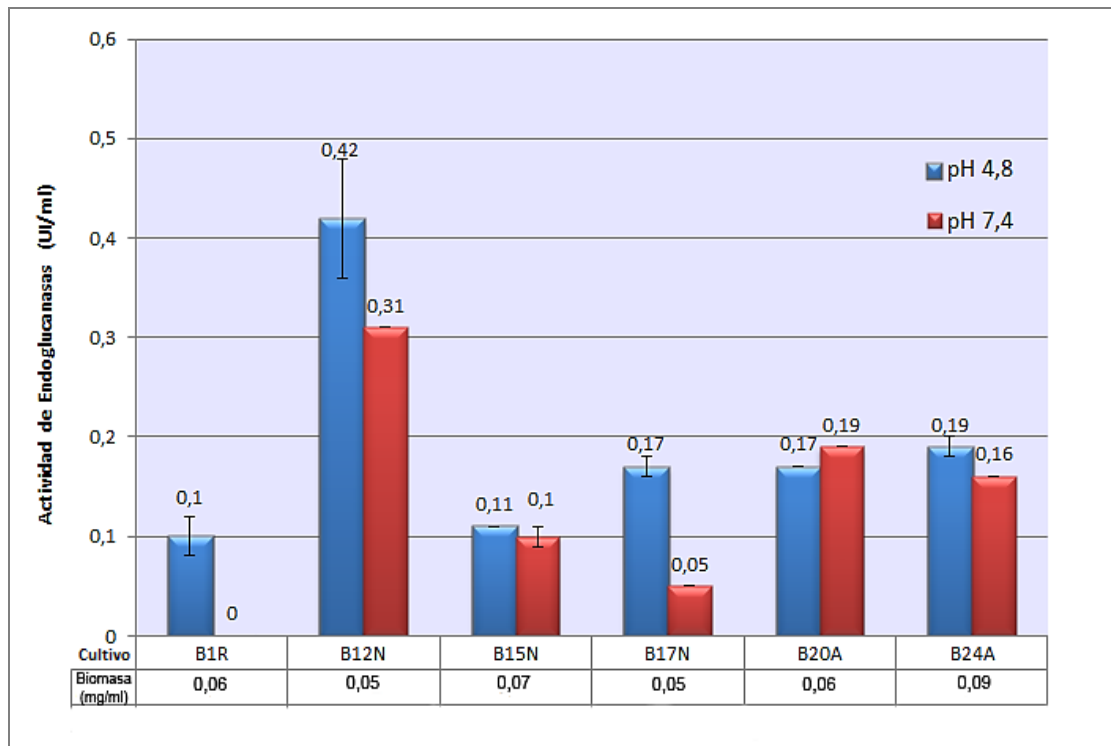


Figura 9. Biomasa generada en el medio de producción para celulasas y actividad de endoglucanasas de los cultivos bacterianos pre-seleccionados.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

La Figura 9 representa la biomasa generada de los cultivos bacterianos pre-seleccionados en un medio de producción con CMC donde el cultivo que mayor biomasa generó fue el cultivo bacteriano B24A con $0,09 \text{ mg ml}^{-1}$ y los de menor promedio fueron los cultivos bacterianos B12N y B17N con $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$. Asimismo se muestra su actividad enzimática de endoglucanasas a pH 4,8 y 7,4. Fueron seleccionadas para su optimización en la actividad enzimática a diferentes valores de pH y temperaturas las cepas B12N y B20A con actividad de endoglucanasas de $0,42 \text{ UI ml}^{-1}$ y $0,17 \text{ UI ml}^{-1}$ respectivamente a un pH de 4,8. De lo observado según los datos exploratorios la cepa B12N muestra mayor actividad a un pH cercano de 4,8 y la cepa B20A a un pH cercano de 7,4. Además la relación con la biomasa generada de ambas cepas nos indica un buen rendimiento al poseer con menos biomasa a comparación del resto de cultivos mayor actividad enzimática.

3.3.1 Optimización de actividad de endoglucanasas de la cepa B12N

Tabla 6. Análisis de varianza para la actividad enzimática de endoglucanasas de la cepa B12N

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
pH	0,10757	1	0,1076	17,01	0,0002
Temperatura	0,09290	1	0,0929	14,69	0,0004
pH ²	0,13453	1	0,1345	21,27	0,0000
Temperatura ²	0,12573	1	0,1257	19,88	0,0001
Error total	0,28457	45	0,0063		
Total (corr.)	0,74529	49			

Fuente: Elaboración propia.

- R-cuadrada: 61,82 %
- R-cuadrada (ajustada por grados libertad): 58,42 %
- Error estándar: 0,0795219

Interpretación:

Para la optimización de respuesta esperada de la actividad enzimática de la cepa B12N, se realizó un análisis de regresión, donde se excluyó el efecto de la interacción de los factores pH y temperatura por no presentar significancia estadística y no depender el uno del

otro, como en el caso del número de bloques el cual también fue ignorado. Mientras que los efectos de pH y temperatura indican variabilidad significativa con un nivel de confianza del 95 %, siendo el factor pH el que presenta mayor significancia, indicando que la enzima posee cortos rangos de pH para su actividad, mientras que el efecto temperatura presenta mayores rangos por lo que se demuestra su carácter termoestable.

Asimismo, notamos que el valor del cuadrado medio del error (0,0063), el cual viene a ser la varianza del error, es menor que uno por lo cual la variabilidad de los datos es adecuado para el trabajo realizado.

Del estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados, se observó que los factores incluidos en el modelo (pH, temperatura) están explicando el 58,42 % de la variabilidad de la actividad enzimática.

Se obtuvo la siguiente función de respuesta (ecuación de regresión) a utilizar que se ha ajustado a los datos para maximizar los factores de pH y temperatura:

$$AE = - 5,96512 + 0,36398 \text{ pH} + 0,161724 \text{ T} - 0,0309982 \text{ pH}^2 - 0,0011987 \text{ T}^2$$

Donde:

AE: actividad enzimática de endoglucanasas

T: temperatura (°C)

De la ecuación anterior se obtuvo el valor óptimo de 5,9 para el factor pH, en el cual la conformación de la enzima es la más adecuada para la actividad catalítica y 67,5 °C para el factor temperatura, dando un valor maximizado de 0,56 UI ml⁻¹ de actividad enzimática de endoglucanasas, tal como se muestra en la siguiente Figura 10.

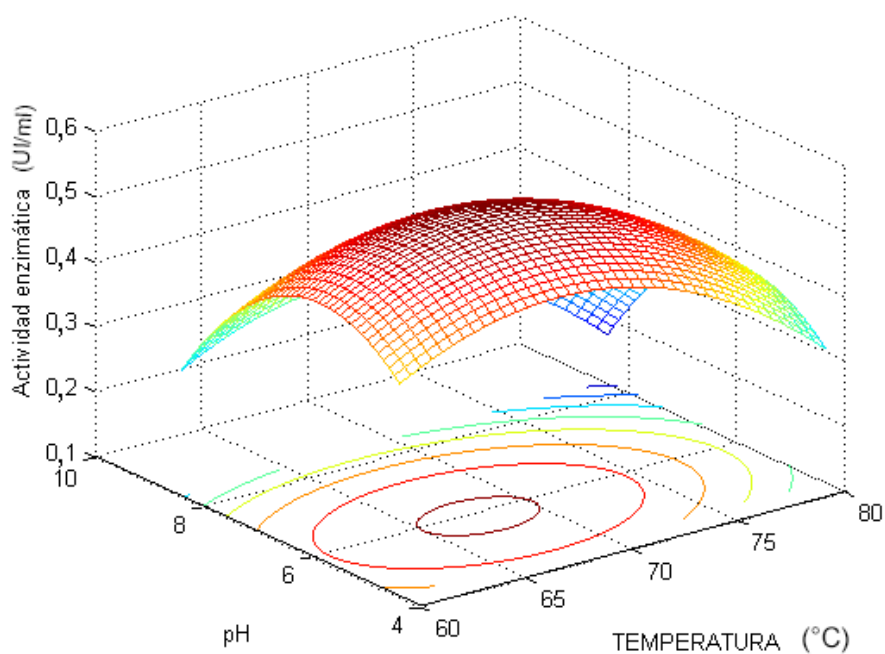


Figura 10. Superficie respuesta estimada de la optimización de la actividad enzimática de endoglucanasas de la cepa B12N.

Fuente: Elaboración propia.

3.3.2 Optimización de actividad de endoglucanasas de la cepa B20A

Tabla 7. Análisis de varianza para la actividad enzimática de endoglucanasas de la cepa B20A

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor-P
pH	0,018019	1	0,01802	11,26	0,0013
Temperatura	0,12799	1	0,12799	79,99	0,0000
pH ²	0,035485	1	0,03549	22,18	0,0000
Temperatura ²	0,184736	1	0,18474	115,45	0,0000
Error total	0,107211	67	0,00160		
Total (corr.)	0,473441	71			

Fuente: Elaboración propia.

- R-cuadrada : 77,36 %
- R-cuadrada (ajustada por grados libertad): 76 %
- Error estándar: 0,040002

Interpretación:

Para la optimización de respuesta esperada de la actividad enzimática de la cepa B20A, se realizó un análisis de regresión, donde se excluyó el efecto de la interacción de los factores pH y temperatura por no presentar significancia estadística y no depender el uno del

otro, como en el caso del número de bloques el cual también fue ignorado. Mientras que los efectos de pH y temperatura indican variabilidad significativa con un nivel de confianza del 95 %, siendo el factor temperatura el que presenta mayor significancia, indicando que la enzima posee cortos rangos de temperatura para su actividad, mientras que el efecto pH presenta mayores rangos.

Asimismo, notamos que el valor del cuadrado medio del error (0,00160), el cual viene a ser la varianza del error, es menor que uno por lo cual la variabilidad de los datos es adecuado para el trabajo realizado.

Del estadístico R-Cuadrada corregida según el número de casos evaluados, se observó que los factores incluidos en el modelo (pH, temperatura) están explicando el 76 % de la variabilidad de la actividad enzimática.

Se obtuvo la siguiente función de respuesta (ecuación de regresión) a utilizar que se ha ajustado a los datos para maximizar los factores de pH y temperatura:

$$AE = -2,96175 + 0,11356 \text{ pH} + 0,096595 \text{ T} - 0,008899 \text{ pH}^2 - 0,0008123 \text{ T}^2$$

Donde:

AE: actividad enzimática de endoglucanasas

T: temperatura (°C)

De la ecuación anterior se obtuvo el valor óptimo de 6,4 para el factor pH, en el cual la conformación de la enzima es la más adecuada para la actividad catalítica y 59,5 °C para el factor temperatura, dando un valor maximizado de 0,27 UI ml⁻¹ de actividad enzimática de endoglucanasas, tal como se muestra en la siguiente Figura 11.

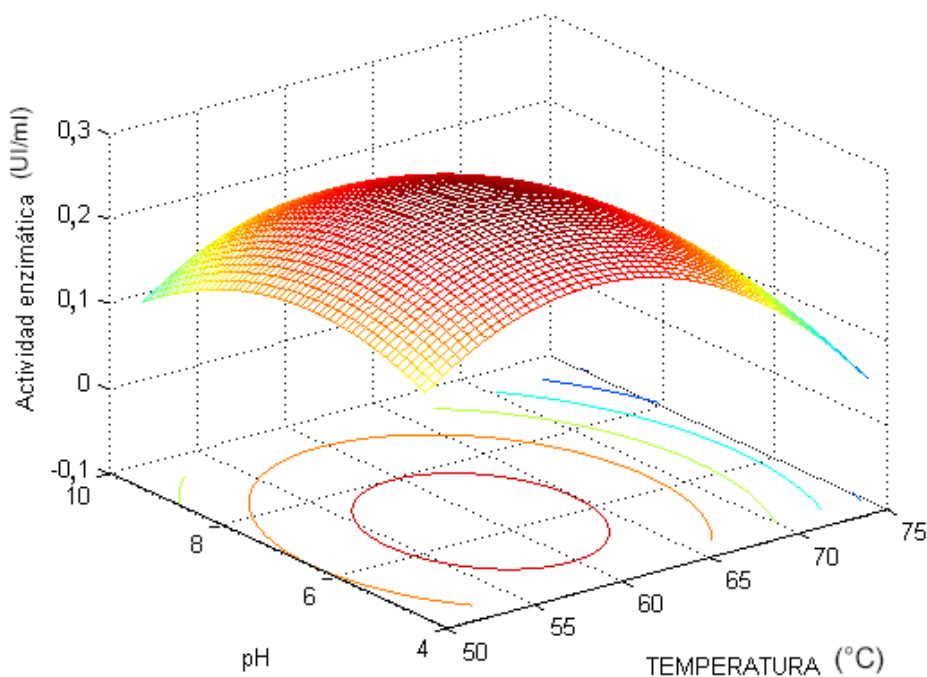


Figura 11. Superficie respuesta estimada de la actividad enzimática de endoglucanasas de la cepa B20A.

Fuente: Elaboración propia.

3.4 Determinación de biomasa celular y cuantificación de proteínas solubles

Tabla 8. Parámetros de productividad de endoglucanasas de las cepas B12N y B20A

Cepa	Proteína (mg ml⁻¹)	AEP* (UI mg de proteína⁻¹)	AEB* (UI mg de biomasa⁻¹)
B12N	0,03	18,66	11,2
B20A	0,25	1,08	4,5

* AEP: Actividad específica, AEB: Rendimiento

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

De la Tabla 6 se observó que la actividad específica por proteína (AEP) de la cepa B12N es mayor indicándonos mayor pureza de la enzima endoglucanasa. Asimismo la actividad específica por biomasa (AEB) fue mayor para la cepa B12N, indicándonos mayor rendimiento de la cepa al utilizar el sustrato celulósico (CMC).

3.5 Análisis molecular

3.5.1 Extracción de ADN

La concentración de ADN extraído de las cepas seleccionadas se leyó en espectrofotómetro Biorad Smart Spec™ Plus, obteniéndose los siguientes valores:

Tabla 9. Concentración y pureza del ADN extraído de las cepas B12N, B20A y de *Escherichia coli* como cepa control

Muestra	Concentración (ng/μl)	Pureza A₂₆₀/A₂₈₀
<i>Escherichia coli</i>	919,5	1,72
B12N	1 231,5	1,86
B20A	1 525,5	1,85

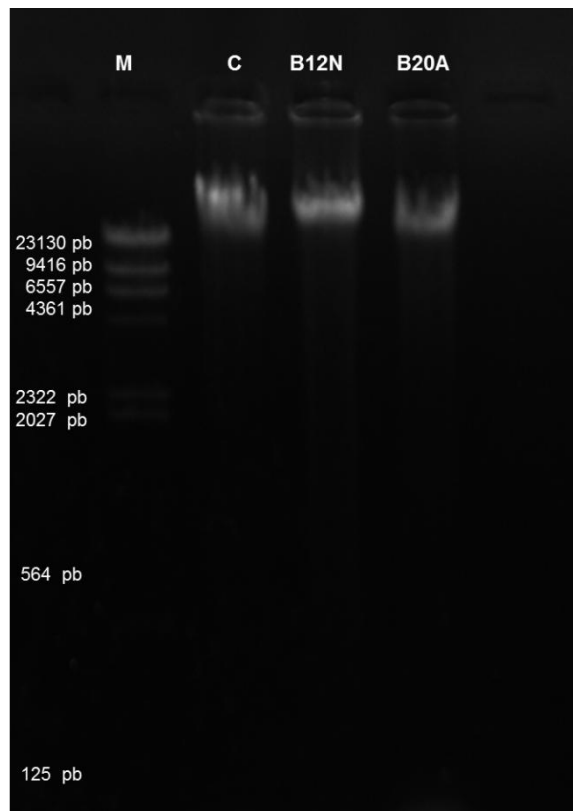
Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

De la tabla 7 se observa que el método empleado para la extracción de ADN genómico es eficiente al obtenerse cantidades considerables de ADN, además la pureza del ADN expresada del análisis espectrofotométrico entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm tiene un promedio cercano a 1,9; lo que indica que el extracto de ADN está libre de contaminación de proteínas.

Además se visualizó el ADN por electroforesis, donde el ADN extraído de la cepa B12N presentó 28 576,764 pb, de la cepa

B20A presentó 24 385,68 pb, y del control 24 385,68 pb (Fotografía 1).



× M: marcador Hind III de 23 130 pb, C: cepa control *Escherichia coli*

Fotografía 1. Electroforesis del ADN de las cepas B12N y B20A.

Fuente: elaboración propia.

3.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se visualizó el producto de PCR amplificado y purificado mediante electroforesis, donde el ADN de la cepa B20A presentó 1 481,817 pb, el de la cepa B12N presentó 1 521,013 pb y del control 1 501,287 pb, valores que coinciden con el tamaño del ARNr 16S (Fotografía 2).



× M: marcador Hind III de 23 130 pb, C: cepa control *Escherichia coli*

Fotografía 2. Electroforesis de PCR de las cepas B12N y B20A.

Fuente: Elaboración propia.

3.5.3 Análisis del secuenciamiento del ARNr 16S

El resultado del secuenciamiento del gen ARNr 16S informa sobre la identidad de la bacteria con la depositada en la base de datos de GenBank (búsqueda en BLAST), que mayor similitud presenta con la bacteria problema, indicando el porcentaje de identidad y el porcentaje de la secuencia que ha sido comparada.

Tabla 10. Similitud de secuencias de ARNr 16S para las cepas B12N y B20A en BLASTN

Muestra Cepa	Pariente más cercano en BLASTN				
	Descripción	Cobertura %	E value	Identidad %	Acceso
B12N	<i>Geobacillus</i> sp. JC106 partial 16S rRNA gene, strain JC106	99	0,0	99	HE575190.1
B20A	<i>Bacillus licheniformis</i> strain F3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	0,0	97	EU256500.1

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

De la tabla 5 se observa que el 99 % del query secuenciado de la cepa B12N presenta matches con el hit de la cepa *Geobacillus* sp. JC106 depositada en la base de datos (identidad) y

un 99 % de la secuencia del query fue alineado con dicho hit (cobertura). Asimismo en la cepa B20A se observa que un 97 % de la secuencia del query presenta matches con el hit de la cepa *Bacillus licheniformis* strain F3 con un 97 % del query alineado. Además se obtuvo para ambos alineamientos un valor de E value menor a 0,02; lo cual nos indica que es un alineamiento muy confiable.

Los score de los hits seleccionados para el alineamiento con las secuencias problemas son los más altos como se observa en el árbol filogenético de la cepa B12N y B20A, donde el score es convertido en distancias, a mayor score más cercana la distancia en el árbol no enraizado (sin hacer suposiciones en cuanto a sus antecesores), el cual fue construido por el método del vecino más próximo "Neighbor - joining", empleando técnicas generales de aglomeración de datos para el análisis de secuencias, sirviéndose de la distancia genética como un medidor de aglomeración (Figura 12, Figura 13).

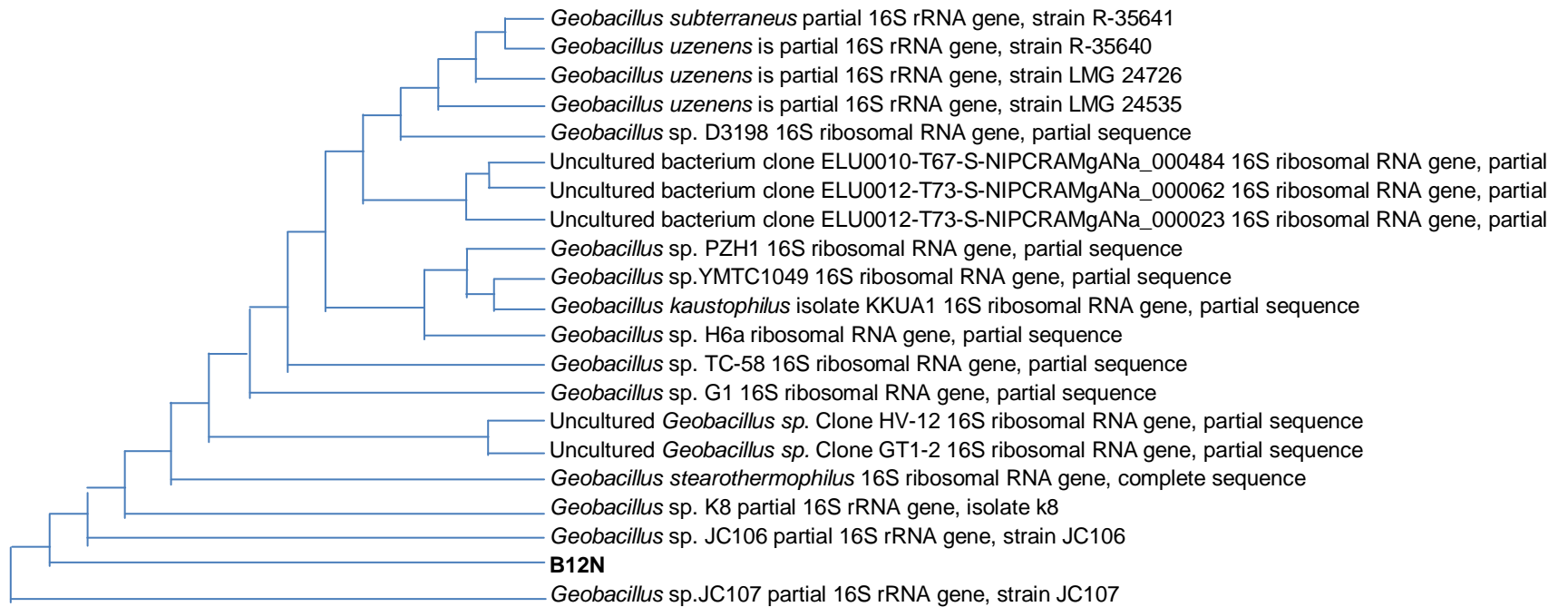


Figura 12. Árbol filogenético de la cepa B12N con el método de Neighbor – joining.

Fuente: National center for biotechnology information (NCBI).

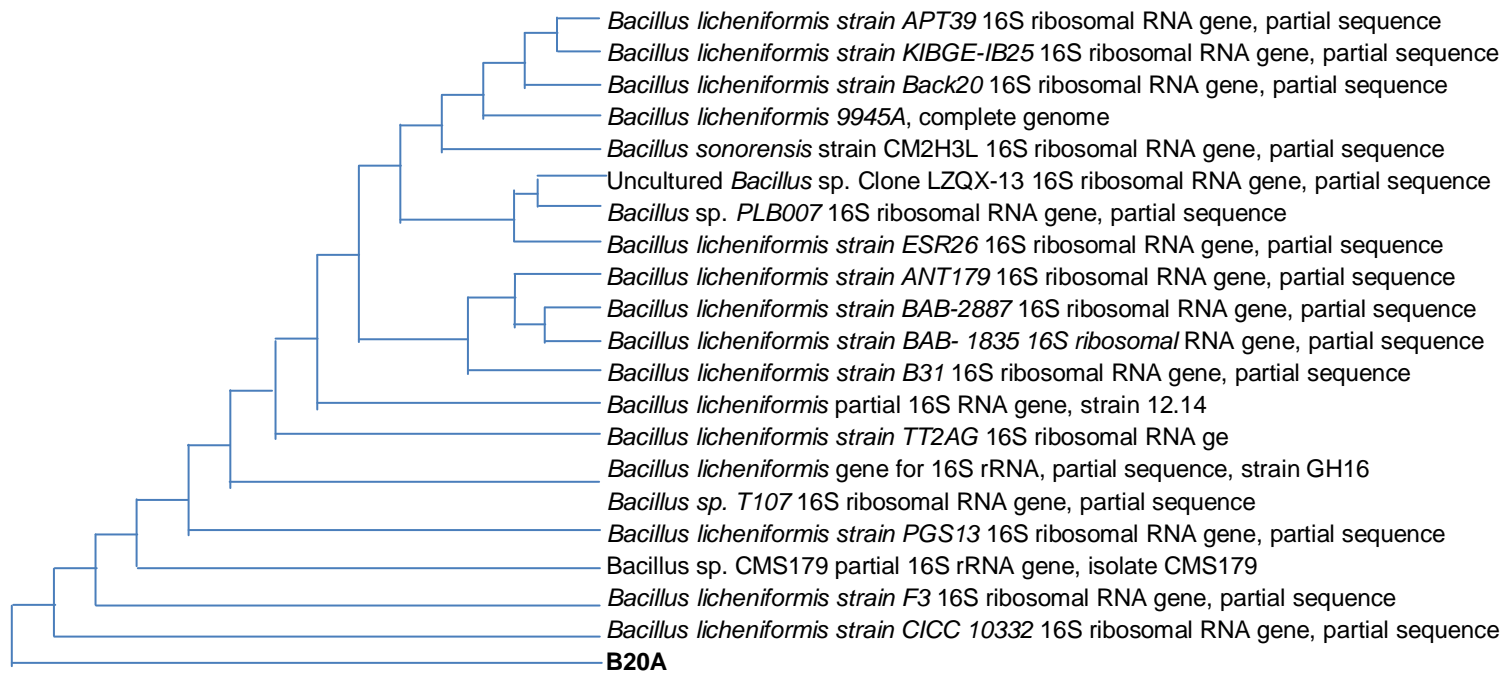


Figura 13. Árbol filogenético de la cepa B20A con el método de Neighbor – joining.

Fuente: National center for biotechnology information (NCBI).

IV. DISCUSIÓN

Aislamiento

La diversidad microbiana en las fuentes termales de Calientes varió de acuerdo al lugar de muestreo y tipo de muestra, en concordancia con la heterogeneidad de los puntos muestreados (temperatura, pH, naturaleza de la muestra), hallándose por lo general diferentes cultivos bacterianos en cada muestra, tal como lo reportó Valdez (2011), quien indicó que las comunidades microbianas en cada sitio de muestreo serían diferentes a las otras fuentes termales, es decir que la mayoría de las muestras son menos del 50 % similares.

La muestra extraída de la fuente termal T₃ permitió el mayor número de UFC con $6,3 \times 10^3$ UFC ml⁻¹ en el medio de aislamiento selectivo con CMC, posiblemente sus características fisicoquímicas son favorables para el desarrollo de microorganismos productores de celulasas, como la temperatura de 70 °C y pH neutro, que facilitan que bacterias esporógenas y actinomicetos incrementen su actividad y por ende su población (Granados & Valderrama, 2003). Además la naturaleza de la muestra tipo tapetes microbianos se caracteriza por presentar altas densidades de población de microorganismos y es utilizada con éxito para recuperar nuevos organismos. Los tapetes microbianos además de presentar en su mayoría comunidades fotoautótrofas, también poseen comunidades quimioorganotrofas

característico de los microorganismos con celulasas (Nord & Wald, 1995; De Beer & Kühn, 2001).

Del aislamiento realizado el grupo representativo corresponde a bacterias, lo cual está en concordancia con los trabajos en termófilos de Kublanov et al. (2009), y Berquist et al. (1999); quienes reportan como microorganismos celulolíticos termófilos a las bacterias y arqueobacterias. Así mismo las bacterias aisladas presentan en su mayoría forma bacilar, filamentosas, además de ser esporuladas, en concordancia con lo reportado por Valdez (2011) quien indicó que en las muestras evaluadas de los geiseres de Calientes la forma predominante de los microorganismos observados es bacilar con una abundancia relativa del 55 %.

De los 31 cultivos bacterianos aislados hay una predominancia de bacterias Gram positivas con 61,29 %, tal como indica De la Rosa (2000) para fuentes hipertermales, mientras que en las mesotermas hay predominancia de Gram negativos. De las características observadas los cultivos bacterianos aislados podrían pertenecer a los géneros *Bacillus*, *Caldicellulosiruptor*, *Streptomyces* y otros reportados como celulolíticos (Ramírez & Cocha, 2003; Berquist et al., 1999). Sin embargo Valdez (2011) reportó predominancia de bacterias Gram negativas en los géiseres evaluados de Calientes, esto debido posiblemente a que según Debord (1925) las bacterias termófilas suelen presentar una coloración Gram variable, donde ciertos organismos termófilos que forman esporas son Gram negativos a las 24 h y Gram positivas a las 8 h, debido a su metabolismo muy acelerado.

La mayoría de los cultivos bacterianos aislados presentaron colonias cremosas circulares de color crema o beige, Azhari et al. (2010) indica tales características predominantes en bacterias termófilas formadoras de esporas con celulasa crecidas en medio con CMC aisladas de muestras de compost.

Además se debe tener en cuenta la naturaleza del sustrato para al aislamiento de cepas productoras de exoglucanasas; en el presente trabajo se utilizó celulosa microcristalina para el enriquecimiento de las muestras y CMC como inductor para el aislamiento, obteniéndose actividades considerables de endoglucanasas, tal como lo indica Nakandakari (1988) quien empleó celulosa microcristalina, obteniendo cepas que sólo produjeron endoglucanasas; así como Magnelli et al. (1997) emplearon celulosa y asparagina para obtener cepas productoras de endoglucanasas. Por otro lado el uso del medio de producción con CMC 1 % proporcionó una buena inducción de la producción de endoglucanasas principalmente, tal como indican Nasr et al. (2011) y Abou - Taleb et al. (2009) quienes reportaron en cepas del género *Bacillus* mayor eficacia que en medios con celulosa.

Actividad cualitativa

Se sabe que las celulasa bacterianas tienen actividades bastantes altas y más termoestables comparadas con las celulasa fúngicas (Swaroop et al., 2004), teniendo en cuenta esta ventaja, se pre-seleccionaron 6 cultivos con actividad de celulasa, de un total de 31 cultivos bacterianos, mediante el ensayo de presencia de zonas de hidrólisis, indicando su habilidad para

producir celulasas dado que el colorante Rojo Congo presenta fuertes interacciones con polisacáridos unidos por enlaces β -1,4 así como significantes interacciones con β -1,3 - D - glucanos, al producirse la hidrólisis de estos compuestos las interacciones entre el colorante y los polisacáridos se pierden, notándose áreas desteñidas correspondientes al área en el que la bacteria secretó las celulasas, el diámetro de la zona de hidrólisis es equivalente al potencial celulolítico del microorganismo. Aunque el ensayo sea cualitativo da bastante buena correlación con los ensayos de producción en cultivos líquidos, proporcionando la base para una detección rápida y sensible para bacterias celulolíticas (Teather & Wood, 1982).

Los cultivos bacterianos B3R y B4R no mostraron zonas de hidrólisis, demostrando la ausencia de la enzima celulasa, sin embargo crecen en el medio de aislamiento selectivo con CMC, lo cual se debió posiblemente a que los microorganismos presentes no estaban creciendo a expensas del sustrato inicial sino que estaban usando el extracto de levadura presente en el medio, el cual posee nutrientes que permiten establecer el metabolismo primario.

Se observó que el pH óptimo de la actividad de celulasas de los cultivos bacterianos aislados es cercano al pH neutro, donde el 77,42 % de las 31 cultivos mostraron actividad, dándonos un perfil de la naturaleza de las celulasas bacterianas en estudio, tal como indica Howard (2003) en la mayoría de bacterias como por ejemplo *Bacillus* sp. el pH óptimo se encuentra entre 5 y 7, por lo tanto los valores de pH óptimos de las enzimas hidrolíticas bacterianas son distintos a las establecidas en los protocolos

estándar de determinación de actividades celulolíticas donde el pH óptimo es 4,8.

Actividad cuantitativa de endoglucanasas

Los 6 cultivos bacterianos pre-seleccionados fueron considerados termófilos por crecer bien a temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$, mostrando actividad de endoglucanasas a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura por encima de su temperatura de cultivo, lo cual indica que son posibles verdaderos productores de celulasas termoestables, ya que según Hough y Danson (1999) una enzima termoestable tiene una temperatura máxima de reacción por encima de la temperatura de crecimiento óptima del microorganismo. Además la mayoría de las enzimas extracelulares de termófilos muestran una alta termoestabilidad, por lo cual son de importancia en bioprocesamientos, por las posibilidades de almacenamiento prolongado (a temperatura ambiente), el aumento de la tolerancia a disolventes orgánicos, la reducción del riesgo de contaminación, así como las pérdidas de baja actividad durante el procesamiento, incluso a las temperaturas elevadas a menudo utilizadas en el pre-tratamiento de la materia prima (Kristjansson, 1989; Pernilla et al., 2007).

La mayor actividad enzimática de celulasas según Nataraja et al. (2010) depende entre otros factores del pH y temperatura óptima, lo cual se comprobó para las cepas seleccionadas B12N y B20A, en el análisis de regresión múltiple que permitió observar la influencia de la interacción de las

variables independientes (pH y temperatura) sobre la dependiente (actividad enzimática), donde se obtuvo mayor estabilidad sobre la actividad enzimática de los factores en estudio para la cepa B12N, observándose que un 58,42 % de la variabilidad de la actividad enzimática depende de dichos factores y para la cepa B20A fue un 76 %. Además para la cepa B12N la variable temperatura es menos significativa que la de pH, indicándonos su naturaleza termófila, y a un pH óptimo en el rango de temperatura de 60 a 80 °C no se registró una variabilidad muy grande entre sus actividades. Mientras que para la cepa B20A el factor temperatura es más significativo que el factor pH, indicándonos su mayor estabilidad a variaciones de pH.

Al optimizar los factores de pH y temperatura para la máxima actividad de endoglucanasas de las cepas seleccionadas, se obtuvo de una gradiente de temperaturas entre 60 y 80 °C con pH de entre 4,4 y 8,4 que el pH óptimo es 5,9 y la temperatura 67,5 °C, registrando una actividad máxima de 0,56 UI ml⁻¹ para la cepa B12N, valor mayor al registrado por Montoya (2012) quien reporta una actividad de 0,34 UI ml⁻¹ a un valor óptimo a 65 °C y un pH de 6 para una cepa de *Bacillus* sp. BH19.

Para la cepa B20A se observó de una gradiente entre 50 y 75 °C con un pH entre 4,4 y 9,4 que el pH óptimo es 6,4 y la temperatura 59,5 °C, dando una actividad máxima de 0,27 UI ml⁻¹, valores similares a los reportados por Montoya (2012) y Li et al. (2008), en las cepas de *Bacillus* sp. BH62 y *Bacillus subtilis*, sin embargo la cepa B20A presenta ventaja sobre las estudiadas por presentar una temperatura óptima superior en 14 y 10 °C respectivamente.

Por lo tanto de acuerdo a la temperatura óptima para su actividad enzimática se puede considerar a las enzimas de las cepas seleccionadas termoestables, tal como Rastogi et al. (2010) consideró endoglucanasas termoestables a 70 °C y un pH óptimo de 5 en cepas de *Geobacillus* y *Bacillus* aisladas de muestra de compost; Bischoff et al. (2006) encontraron endoglucanasas termoestables a 65 °C a un pH 6 en *Bacillus licheniformis*.

Determinación de biomasa y cuantificación de proteínas solubles

La actividad celulolítica no es parte del metabolismo primario de los microorganismos (etapa de crecimiento) sino que estaría asociada a la resistencia (Lynd et al., 2002), tal como se observó en los cultivos bacterianos seleccionados los cuales a pesar de presentar valores de biomasa similar tienen actividades enzimáticas distintas. Asimismo se observó para el cultivo bacteriano pre-seleccionado B24A la máxima producción de biomasa pero una baja actividad enzimática, por lo tanto no hay una relación directa entre la biomasa producida y la actividad enzimática.

Al analizar las cepas en función de la producción de biomasa, la cepa B12N y B20A presentaron 0,05 mg ml⁻¹ y 0,06 mg ml⁻¹ de medio de producción respectivamente, indicando bajos niveles de producción de masa celular por ml de medio, lo cual es ventajoso en procesos industriales en la separación de la biomasa de los metabolitos de interés.

Otro de los parámetros a tener en cuenta en la selección de microorganismos celulolíticos es la actividad enzimática en función a la

biomasa (AEB), de donde se observó ventajas en las cepas termófilas seleccionadas, con un rendimiento bastante promisorio, ya que al generarse una baja biomasa se produce valores significativos de actividad enzimática obteniéndose valores de 11,2 UI mg⁻¹ y 4,5 UI mg⁻¹ para las cepas B12N y B20A respectivamente, superando a lo reportado por Ramírez y Cocha (2003) quienes obtuvieron 1,18 y 0,90 UI mg⁻¹ de biomasa para *Streptomyces* sp. 28CMC2 y *Thermomonospora curvata* 7CMC8.

La actividad específica de las endoglucanasas por proteínas (AEP), indica la pureza de la enzima, por tanto es de mucha importancia contar con cepas con elevadas actividades específicas, mostrando valores significativos la cepa B12N con 18,66 UI mg⁻¹ de proteína lo cual está acorde a lo reportado por Ramírez y Cocha (2003), quienes obtuvieron 20,14 UI mg⁻¹ de proteína para *Streptomyces* sp. 7CMC10; sin embargo la actividad se presenta a menor temperatura que la reportada en nuestro estudio.

Análisis molecular

Los productos de PCR amplificados por los oligonucleótidos universales como el 27F y 1492R, coincidieron con el tamaño del ARNr 16S.

Del alineamiento del secuenciamiento del gen ARNr 16S con el Genbank ambas cepas se alinearon a los filotipos Firmicutes, lo cual coincide con Valdez (2011) en su análisis molecular del ARNr 16S de los géiseres de Calientes. Además se obtuvo que las cepas B12N y B20A presentan

similitud con especies del género *Geobacillus* y *Bacillus* respectivamente, lo cual es apoyado por la identificación polifásica, recomendada por Stackebrandt et al. (2002) que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación, es así que en el análisis fenotípico se observa bacilos Gram positivos en cadena, esporulados, con colonias cremosas, coincidiendo con las características del género alineado.

Asimismo la cepa B12N presenta un 99 % de identidad con la cepa *Geobacillus* sp. JC106 aislada de aguas termales con azufre en Maharashtra (India) y la cepa B20A tiene un 97 % de identidad con la cepa *Bacillus licheniformis* strain F3 aislada de salchichas secadas al aire en China, lo cual indica su naturaleza adaptativa a diferentes ambientes. Ambos valores hallados de identidad entre genes ARNr 16S son mayores o iguales al 97 %, lo cual es aceptado para ejercer relación entre las cepas a nivel de especie (Stackebrandt & Göbel, 1994).

Erikson y Wood (1985) confirman la presencia de enzimas celulolíticas con actividad básicamente endo - β -1,4 glucanasa y exo - β -1,4 - glucanasa de las bacterias del género *Bacillus* aerobias y termofilicas; Rastogi et al. (2010) caracterizaron endoglucanasas termoestables de cepas de *Geobacillus* y *Bacillus*, lo cual también verifica la similitud encontrada en el alineamiento, por la presencia de dicha enzima.

V. CONCLUSIONES

- Las aguas termales de Calientes, Candarave - Tacna, poseen bacterias con celulasas, donde el 77,42 % de los 31 cultivos bacterianos aislados presentan zonas de hidrólisis en CMC.
- Se logró determinar cuantitativamente la actividad de endoglucanasas, inducidas con CMC al 1 % de las cepas seleccionadas B12N y B20A, las cuales presentaron la mayor actividad enzimática y diámetros de zonas de hidrolisis significativas. Tras optimizar los factores de los que depende la máxima actividad se obtuvo 0,56 UI ml⁻¹ a 67,5 °C y un pH 6 y 0,27 UI ml⁻¹ a 59,5 °C y un pH 6,4; para las cepas B12N y B20A respectivamente.
- La temperatura óptima para la mayor actividad enzimática registrada fue superior a la temperatura de crecimiento, por lo tanto ambas enzimas aisladas son consideradas termoestables.
- La producción de biomasa de las cepas seleccionadas no fue en su totalidad directamente proporcional al nivel de producción de endoglucanasas, indicando su independencia con el crecimiento bacteriano, por lo tanto podrían ser enzimas adaptativas.

- Se logró la identificación molecular de las cepas seleccionadas B12N y B20 con una similitud del 99 % con *Geobacillus* sp. y 97 % con *Bacillus licheniformis* respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- En el análisis cuantitativo de endoglucanasas se debe aplicar diluciones al extracto enzimático para lograr que la concentración de glucosa del blanco de la muestra sea cero, ya que el complejo enzimático se reprime en distintos puntos, cuando la concentración de azúcares fácilmente utilizables aumenta.
- Aplicar consorcios de cepas con potencial celulolítico para mejorar la actividad enzimática.
- Realizar ensayos de cinética de crecimiento y producción de enzima para las cepas seleccionadas con mayor actividad.
- Determinar el peso molecular y el número de contaminantes presentes en las celulasas de las cepas seleccionadas, mediante la técnica del Zimograma.
- Realizar búsqueda de genes de celulasas en las aguas termales de Calientes, mediante bioprospección dirigida.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abou – Taleb, K., Mashhoor, W., Nars, S., Sharaf, M. & Abdel – Azeem, H.** (2009). *Nutritional and environmental factors affecting cellulase production by two strains of cellulolytic bacilli*. Australian Journal of Basic and Applied Science, 3 (3) pp. 17-21.
2. **Alexander, M.** (1980). *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT Editor, S.A. pp. 162-177. México.
3. **Aubert, J.** (1988). *Biochemistry and genetics of cellulose degradation*. Academic press. USA. p. 11.
4. **Azhari, S., Mohamad, L., Mohd, A., Suraini, A., Nor' Aini, A., Umi, K., Mohd, A. & Kenji, S.** (2010). *Isolation and characterization of thermophilic cellulase-producing bacteria from empty fruit bunches-palm oil mill effluent compost*. American Journal of Applied Sciences, 7 (1) pp. 56-62.
5. **Bailey, J., Biely, P. & Poutanen, K.** (1992). *Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity*. Journal of Biotechnology, 23 pp. 257- 270.

6. **Beauchemin, A., Colombatto, D., Morgavi, P. & Yang, Z.** (2003). *Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants.* Journal of Animal Science, 81 (E. Suppl.2), E37-E47.
7. **Beguín, P. & Aubert, J.** (1994). *The biological degradation of cellulose.* FEMS Microbiological Reviews, 13 pp. 25-58.
8. **Berg, B. & Petterson, G.** (1977). *Location and formation of cellulases in Trichoderma viride.* Journal of Applied bacteriology, 42 pp. 65-75.
9. **Berquist, P., Gibbs, M., Morris, D., Te'o, J., Saul, D & Morgan, H.** (1999). *Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria.* FEMS microbiology Ecology, 28 pp. 99-110.
10. **Bischoff, K., Rooney, A., Li, X., Liu, S. & Hughes S.** (2006). *Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of Bacillus licheniformis.* Journal of Biotechnology Lett, 28(21) pp. 1761-5.
11. **Brown, R., Saxena, I. & Kudlicka, K.** (1996). *Cellulose biosynthesis in higher plants.* Trends in Plant Science, 1(5) pp. 149-156.
12. **Carpenter, S. & Barnett, L.** (1967). *Location of cellulose activity in Cellvibrio gilvus.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 122 pp. 1-7.

13. **Carrillo, L.** (2003). *Microbiología agrícola*. ISBN 987-9381-16-5. Salta-Argentina.
14. **Cavaco, A.** (1998). *Mechanism of cellulase action in textile processes*. Carbohydrate Polymers. El Sevier, 37 pp. 273-277.
15. **Ceroni, A. & Gutiérrez, M.** (1988). *Producción de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres*. Boletín de Lima, 55 pp. 13-20.
16. **Cruz, V., Frich, V. & Matsuda, K.** (2010). *Geochemical characterization of thermal waters in the Calientes geothermal field, Tacna, South of Peru*. Proceedings world geothermal congress 2010, Indonesia. p.1.
17. **Czaja W., Young, D., Kawecki, M. & Brown, R.** (2007). *The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications*. Biomacromolecules, 8 pp. 1-12.
18. **De Beer, D. & Kühn, M.** (2001). *Interfacial microbial mats and biofilms*. In: Boudreau, B. Jorgensen, B. (Eds.), *The Benthic Boundary Layer*, Oxford University Press, New York, pp. 374-394.
19. **Debord, G.** (1925). *Reaction to Gram's stain by certain spore-forming bacteria*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 22 pp. 397-398.

20. **De la Rosa, M. & Mosso, M.** (2000). *Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales en España*. España. pp. 153-158.
21. **Erikson, K. & Wood, T.** (1985). "*Biodegradation of wood cellulose: Biosynthesis and biodegradation of wood components*". Academic Press, New York, pp. 469-503.
22. **Fan, L., Lee, Y. & Beardmore, D.** (1980). *Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis*. Biotechnology and Bioengineering, 22 pp. 177-199.
23. **Festucci - Buselli, R., Otoni, W. & Joshi, C.** (2007). *Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants*. Brazilian Journal of Plant Physiology. 19 (1), pp. 1-13.
24. **Ghose, T.** (1987). *Measurement of cellulase activities*. Pure and Applied Chemistry, 59 (2) pp. 257-268.
25. **Granados, L. & Valderrama, J.** (2003). *Evaluación de la actividad proteolítica y amilolítica de actinomicetes termofílicos aislados a partir de pilas de compost*. Tesis de pregrado en Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
26. **Grey, M. & Brendel, M.** (1992). *Rapid and simple isolation of DNA from agarose*. Current Genetics, 22 (1) pp. 83-84.

27. **Grigorevski, A., Nascimento R., Bonb, E. & Coelho, R.** (2005). *Streptomyces drozdowiczii cellulase production using agroindustrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries.* Enzyme and Microbial Technology, 37 pp. 272-277.
28. **Hendricks, C. Doyle, J. & Hugley, B.** (1995). *A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil.* Applied Environmental Microbiology, 61 pp. 2016- 2019.
29. **Hernández A., García E. & Romero H.** (1999). *Celulosomas: sistemas multienzimáticos.* Revista Sociedad Química de México 43 (3-4) pp. 137-142.
30. **Hongpattarakere T.** (2002). *Hyperthermostable cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their biotechnological applications.* Songklanakarin Journal Science & Technology. 24(3) pp. 481-491.
31. **Hough, D. & Danson, M.** (1999). *Extremozymes.* Current Opinion in Chemical Biology. 3 pp. 39-46.
32. **Howard, R., Abotsi, E., Rensburg, J. & Howard, S.** (2003). *Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production.* African Journal of Biotechnology, 2 pp. 602-619.

33. **Iglesias, C., Gutiérrez, C., Venialgo, C. & Gutiérrez, R.** (1999). *La degradación de celulosa en la producción aldonera en época invernal y su relación con la materia orgánica y nutrientes*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. UNNE, 5 pp. 161-163.
34. **Johnson, E., Reese, T. & Demain, A.** (1982). *Inhibition of Clostridium thermocellum cellulase by end products of cellulolysis*. Journal Applied Biochemical, 4 pp. 64-71.
35. **Koyama, M., Helbert, W., Imai, T., Sugiyama, J. & Henrissat, B.** (1997). *Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose*. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 94 pp. 9091-9095.
36. **Krishna, C.** (1999). *Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes*. Bioresource Technology, 69 pp. 231-239.
37. **Kristjansson, JK.** (1989). *Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes*. Trends in Biotechnology, 7 pp. 349–353.
38. **Kublanov, I., Perevalova, A., Slobodkina, G., Lebedinsky, A., Bidzhieva, S., Kolganova, T., Kaliberda, E., Rumsh, L., Haertle, T. & Bonch - Osmolovskaya, E.** (2009) *Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera,*

Kamchatka (Russia). Applied and Environmental Microbiology, 75(1) pp. 286-291.

39. **Kung, L.** (1996). *Direct fed microbial and enzyme feed additives*. Muirhead S. (Ed.). The Miller Publishing Company, Minnetonka, Minnesota, pp. 15-20.
40. **Lamed, R. & Bayer, E.** (1988). *The cellulosome of Clostridium thermocellum*. Advances in Applied Microbiology, 33 pp. 1- 46.
41. **Lee, H. & Blackburn, H.** (1975). *Cellulase production by a thermophilic Clostridium species*. Applied Microbiology, pp. 346-353.
42. **Li, W., Zhang, W., Yang, M. & Chen, Y.** (2008). *Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated Bacillus subtilis and its expression in Escherichia coli*. Journal of Molecular Biotechnology, 40 (2) pp. 195-201.
43. **Li, X.** (1997). *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov., a New Cellulolytic Member of the Genus *Streptomyces*. Journal of Bacteriology. (47) pp. 443-445.
44. **Limayem, A. & Steven, C.** (2012). *Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects*. Progress in energy and combustion science. El Sevier, 38 pp. 449-467.

45. **Lincoln, T. & Zeiger, E.** (2006). *Fisiología vegetal*. Editorial Universidad Jaume I, D.L. ISBN 978-84-8021-601-2 (o.c.) p. 596.
46. **Lon Wo, E., Daley, N. & Cárdenas, M.** (2002). *Complejo enzimático celulasa, su potencialidad en dietas con Saccharina*. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 36 (3) pp. 231-234.
47. **Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. & Randall R.** (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry, 193 pp. 265-275.
48. **Lymar, E., Li, B. & Renganathan, V.** (1995). *Purification and Characterization of a cellulose-binding β -glucosidase from cellulose degrading cultures of *Phanaerochaete chrysosporium**. Applied Environmental Microbiology, 8 pp. 2976-2980.
49. **Lynd, L., Van Zyl W., MacBride, J. & Laser, M.** (2005). *Consolidated bioprocessing of cellulosic on celulosic biomass: an update*. Current Opinion in Biotechnology, 66 pp. 506-577.
50. **Lynd, L., Weimer, P., Zyl, W. & Pretorius, I.** (2002). *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology*. USA. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66(3) pp. 506- 577.
51. **Lynd, R., Wyman, C. & Gerngross, T.** (1999). *Biocommodity engineering*. Biotechnology Program, 15 pp. 777-793.

52. **Magnelli, E., Martínez, A. & Mercuri, A.** (1997). *Método simple determinar actividad celulolítica en hongos*. Revista Argentina de Microbiología, 29 pp. 210-214.
53. **Martínez, A., Speranza, M., Ruiz Dueñas, F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martínez, M., Gutiérrez, A. & Del Río, J.** (2005). *Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of fungal attack of lignin*. International Microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology 8(3) pp. 195-204.
54. **Maki, M., Leung, K. & Qin, W.** (2009). *The prospects cellulose producing bacteria for the conversion of lignocellulosic biomass*. International Journal of Biological Sciences, 5(5) pp. 500-516.
55. **Maki, M., Broere, M., Leung, K. & Qin, W.** (2011). *Characterization of some efficient cellulose producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers*. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2(2) pp. 146-154.
56. **Malherbe, S. & Cloete, T.** (2002). *Lignocellulose Biodegradation: Fundamentals and applications*. Reviews in Environmental Science y Biotechnology, 1 pp.105-114.

57. **Mandels, M. & Reese, E.** (1957). *Induction of cellulase in Trichoderma viride as influenced by carbon sources and metals.* Journal of Bacteriology, 73(2) pp. 269-278.
58. **Mc Cleary, V.** (1992). *Measurement of endo- 1,4-3-D-xylanase.*In: Visser, J. Beldman, G., Kusters-van Someren, M.A. and Voragen, A.G.J.(Eds.) Xylans and xylanases. El Sevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 161-170.
59. **Meza, V., Moreno, P., Tengerdy, R. & Gutiérrez, M.** (1995). *Transfer of a benomyl resistance marker by heat-inactivated Trichoderma reesei protoplasts.* Biotechnology Letters, 17(8) pp. 827–832.
60. **Miller, L.** (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.* Analytical Chemistry, 31 pp. 426-428.
61. **Montoya, R.** (2012). *Selección de cepas de Bacillus sp. potenciales para la producción de hidrolasas.* Centro Nacional de Pesquisa en Energia e Materiais. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.
62. **Mullings, R. & Parish, J.** (1984). *New reducing sugar assay for the study of cellulases.* Enzyme and Microbial Technology, 6 pp. 491-496.

63. **Nakandakari, J.** (1988). *Aislamiento, selección y estudios preliminares de hongos secretores de celulasas*. Tesis de pregrado en Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.
64. **Nasr, S., Abozaid, A. Hussein, A. & Alsalem, F.** (2011). *Cellulase production by local bacteria Isolated from Taif in Saudi Arabia*. Journal.of Agricultural Sciences, 19 (1) pp.163-170.
65. **Nataraja, S., Chetan, D. & Krishnappa, M.** (2010), *Effect of temperature on cellulose enzyme activity in crude extracts isolated from solid wastes microbes*. International Journal of Microbiology Research, 2 (2) pp. 44-47.
66. **Nelson, N.** (1944). *A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose*. Journal of Biology Chemical, 153 pp. 375-380.
67. **Nord, S. & DM, Ward.** (1995). *Diverse Thermus species inhabit a single hot spring microbial mat*. Systematic and Applied Microbiology, 18 pp. 274-278.
68. **Ooshima, H., Sakata, M. & Harano, Y.** (1983). *Adsorption of cellulase from Trichoderma viride on cellulose*. Biotechnology and Bioengineering, 25 pp. 3103-3114.

69. **Ovando, S. & Wahszewski, K.** (2005). *Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos*. Universidad y Ciencia, 21(42) pp.111-120.
70. **Palacios, S.** (2004) *Diseño experimental aplicado a ciencia y tecnología*. 1ª edición. Lima: Concytec.
71. **Pérez, J., Muñoz, J., De la Rubia, T. & Martínez, J.** (2002). *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview*. International Microbiology 5(2) pp. 53-63.
72. **Pernilla, T., Gashaw, M. & Nordberg, E.** (2007). *Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining*. Journal of Microbial Cell Factories, pp. 6-9.
73. **Peters, D.** (2006). *Carbohydrates for fermentation*. Journal of Biotechnology, 1 pp. 806-814.
74. **Prasertsan, P. & Oi, S.** (1992). *Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in the saccharification of palm cake and palm fibre*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 8 pp. 536-538.
75. **Ragauskas, A. , Williams, C., Davison, B., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert C., Frederick W., Hallett J., Leak, D., Liotta, C., Mielenz, J.,**

- Murphy, R., Templer, R. & Tschaplinski, T.** (2006). *The path forward for biofuels and biomaterials*. Science, 311 pp. 484-489.
76. **Ramírez, P.** (1993). *Degradación enzimática de la celulosa*. Tesis de pregrado en Biología. UNMSM, Lima.
77. **Ramírez, P. & Cocha, J.** (2003). *Degradación enzimática de celulosa por*
78. **Ramírez, P. & Cocha, J.** (2003). *Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica*. Revista Peruana de Biología, 10(1) pp. 67-77.
79. **Rastogi, G., Bhalla, A, Adhikar, A, Bischoff, K., Hughes, S., Christopher, L. & Sani, R.** (2010). *Characterization of thermostable cellulases produced by Bacillus and Geobacillus strains*. Journal of Bioresource Technology, 101(22), pp. 8798-8806.
80. **Rees, H., Grant, S., Jones, B., Grant, W. & Heaphy, Sh.** (2003). *Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries*. Extremophiles, 7 pp. 415-421.
81. **Ríos, N.** (2008). *Aislamiento de cepas anaerobias termófilas productoras de celulasas y hemicelulasas, provenientes de la región altiplánica de Bolivia implicadas en la producción de etanol mediante técnicas de*

cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales. Tesis de pregrado en Farmacia y Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.

82. **Rodicio, M. & Mendoza, M.** (2004). *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 22 (4) pp. 81-87.
83. **Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M.** (1991). *Cellulose biosynthesis and function in bacteria*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 55 pp. 35-58.
84. **Sabatier, M. & Fish, M.** (1996). *Methods of analysis for feed enzymes: methodological problems*. Journal of Applied Poultry Research, 5 pp. 408-413.
85. **Sambrook, J. & Russell, D.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
86. **Semedo, L., Gomes, C., Lindares, A., Duarte, G., Nascimento, R., Rosado, A., Pinheiro, M., Margis, R., Silva, K., Alviano, C., Manfio, G., Soares, M.; Lindares, L. & Coelho, R.** (2004). *Streptomyces drozdowiczii sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil*. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54 pp.1323-1328.

87. **Sheehan, J. & Himmel, M.** (1999). *Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. department of energy's research and development activities for bioethanol*. Biotechnology Program, 15 pp. 817-827.
88. **Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G., Grimont, P., Kämpfer, P., Maiden, M., Nesme, X., Rosselló-Mora, ...Whitman, W.** (2002). *Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology*. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 52 pp. 1043-1047.
89. **Stackebrandt, E. & Goebel, B.** (1994). *Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology*. International Journal of Systematic Bacteriology, 44 pp. 846-849.
90. **Sternberg, D., Vijayakumar, P. & Reese, T.** (1977). *β -Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose*. Canadian Journal of Microbiology, 23 pp. 139-147.
91. **Stockton, C., Mitchell, D., Grohmann, K. & Himmel, M.** (1991). *Optimum b-glucosidase supplementation of cellulase for efficient conversion of cellulose to glucose*. Biotechnology Letter, 13 pp. 57-62.

92. **Stutzenberger, F., Kaufman, A. & Lossin, R.** (1970). *Cellulolytic activity in municipal solid waste composting*. Canadian Journal of Microbiology, 16 pp. 553-560.
93. **Sugden, C. & Bhat, M.** (1994). *Cereal straw and pure cellulose as carbon sources for growth and production of plant cell wall degrading enzymes by Sporotrichum thermophile*. World Journal of Microbiology and Botechnology, 10 pp. 444-451.
94. **Swaroopa, D. Thirumale, S. & Nand, K.** (2004). *Production of cellulose by Clostridium papyrosolvens CFR- 703*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 20 pp. 629-632.
95. **Teather, R. & Wood, P.** (1982). *Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen*. Applied and Environmental Microbiology, 43 (4) pp.777-780.
96. **Ten, L., Im, W., Kim, M., Kang, M. & Lee, S.** (2004). *Development of a plate technique for screening of polysaccharide degrading microorganism by using a mixture of insoluble chromogenic substrates*. Journal of Microbiological Methods, 56 pp. 375-382.
97. **Vahjen, W., Glaser, K., Froeck, M. & Simon, O.** (1997). *Non starch polysaccharide hydrolyzing enzymes as feed additives: detection of enzyme activities and problems encountered with quantitative*

determination in complex samples. Archives of animal nutrition, 50 (4) pp. 331-345.

98. **Valdez, Y.** (2011). *Caracterización molecular y determinación de la diversidad microbiana para bacterias y arqueas hipertermófilas de los géiseres de Calientes, Candarave, Tacna- Perú*. Tesis de pregrado en Biología. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna.
99. **Vega, K., Villena, G., Sarmiento, V., Ludeña, Y., Vera, N. & Gutiérrez, M.** (2012). *Production of alkaline cellulase by fungi isolated from an undisturbed rain forest of Peru*. Biotechnology Research International, 2012 p. 2.
100. **Viviano, F., Medina, L., Ramos, N., Amaiz, L. & Valbuena, O.** (2011). *Degradación de celulosa por bacterias de aguas termales de Las Trincheras, Venezuela*. Revista Latinoamericana Biotecnología Ambiental y Algal, 2 (1) pp. 18-29.
101. **Wessel, D. & Fluegge, U.** (1984). *Analytical Biochemistry*, 138 pp. 141-143.
102. **Wilkie, C. & Woo, S.** (1977). *A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses*. Carbohydrate Research, 57 pp. 145-162.

103. **Woese, C.** (1987). *Bacterial evolution*. Review of Microbiology, 55 (2) pp. 221-271.
104. **Wood, M. & Bhat, K.** (1988). *Methods for measuring cellulose activities*. In: Wood, W.A., Kellogg, S.T. (Eds.), *Methods in Enzymology*, 160 pp. 87-112. Academic Press, CA, USA.
105. **Zaldívar, M., Steiner, J., Musalem, M. & Contreras, I.** (1987). *Aislamiento de un mutante de Trichoderma pseudokoningii hiperproductor de celulasas*. Sociedad Española de Microbiología SEM, 3 pp. 33-44.
106. **Zeikus, G., Benbassat, A., Ng, T. & Lamed, R.** (1981). *Thermophilic ethanol fermentations*. Editor Hollander, A. et al. Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals. Plenum Publishing Corp. New York, USA. pp. 441-461.
107. **Zhang, Y., Himmel, M. & Mielenz, J.** (2006). *Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies*. Biotechnology Advances, 24 pp. 452- 481.

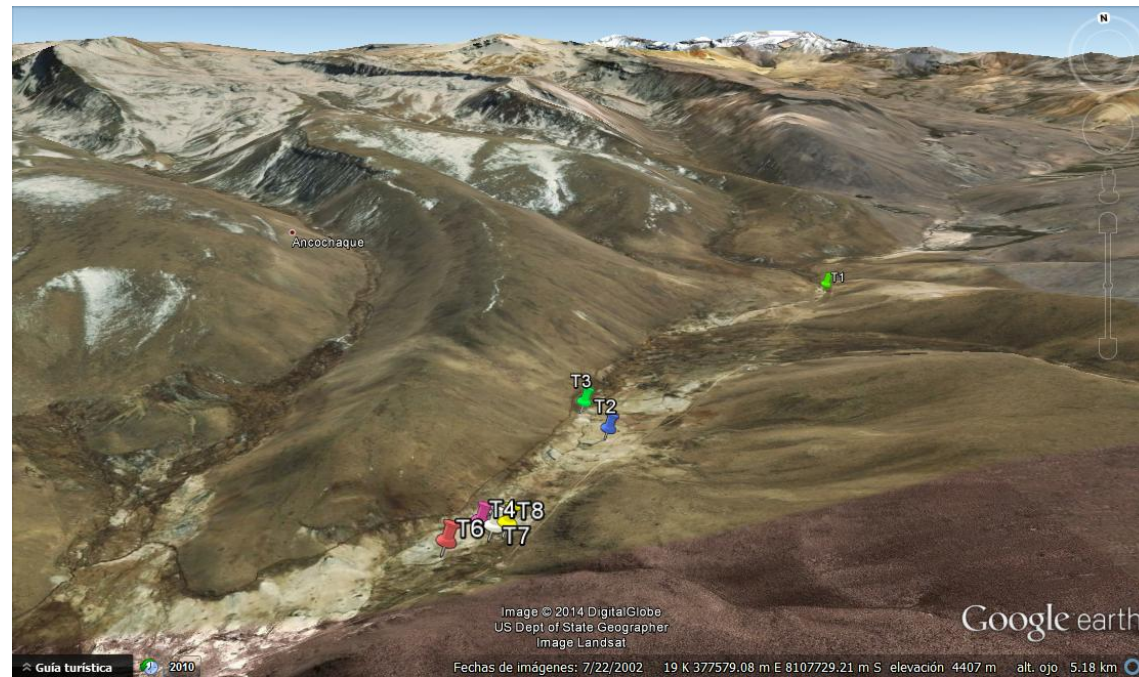
VIII. ANEXOS

Anexo 1. Fuentes termales de Calientes muestreadas



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 2: Ubicación geográfica de las fuentes termales muestreadas de Calientes



Fuente: Google earth.

Anexo 3. Características macroscópicas de los cultivos bacterianos aislados de Calientes

Cepa	Forma	Aspecto	Color	Tamaño (mm)
B1A	Circular	Cremosa	Crema	1
B2A	Circular	Cremosa	Beige	1
B3A	Circular	Cremosa	Crema con centro café	3
B4A	Circular	Cremosa	Beige	1,5
B5A	Circular	Cremosa	Beige	1
B6A	Circular	Cremosa	Crema	3
B7A	Circular	Cremosa	Crema	2
B8A	Circular	Cremosa	Beige con punto café	5
B9A	Irregular	Aterciopelado	Crema	4
B10A	Circular	Cremosa	Beige	1
B11N	Circular	Rugosa	Café	4
B12N	Circular	Cremosa	Beige con punto café	1
B13N	Circular	Cremosa	Beige	4
B14N	Circular	Cremosa	Beige con centro café	3
B15N	Circular	Aterciopelado	Beige	2
B16N	Circular	Cremosa	Beige con centro café	4
B17N	Irregular	Cremosa	Beige con centro café	2
B18N	Circular	Cremosa	Crema	3
B19N	Circular	Cremosa	Café	4
B20A	Estrellada	Aterciopelada	Beige con centro café	4
B21A	Circular	Cremosa	Crema con centro beige	3

B22A	Circular	Cremosa	Beige	1
B23A	Circular	Cremosa	Café	5
B24A	Estrellada	Aterciopelada	Beige	3
B25A	Circular	Cremosa	Café	5
B26A	Circular	Cremosa	Beige	3
B27A	Irregular	Cremosa	Café	5
B1R	Irregular	Lisa	Café con punto	5
B2R	Circular	Cremosa	Café con punto	2
B3R	Irregular	Algodonosa	Pardo	2
B4R	Irregular	Lisa	Blanca	11

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 4. Características microscópicas de los cultivos bacterianos aislados de Calientes

Cultivo	Gram	Características	Tamaño (µm)	Desviación estándar
B1A	Positivo	Bacilos cortos, delgados, esporulados	2,6	0,38
B2A	Positivo	Bacilos largos, delgados, forman cadenas	5,8	1,28
B3A	Negativo	Bacilos largos, delgados, con inclusiones	5,1	1,26
B4A	Negativo	Bacilos largos, delgados	5,3	0,66
B5A	Positivo	Bacilos largos, delgados	4,8	0,80
B6A	Negativo	Bacilos largos, delgados	4,7	0,69
B7A	Negativo	Bacilos largos, delgados	4,9	0,80

B8A	Negativo	Bacilos largos, delgados, forman filamentos	8,7	1,10
B9A	Negativo	Bacilos largos, delgados	5,4	0,76
B10A	Positivo	Bacilos largos, delgados	4,7	0,67
B11N	Negativo	Bacilos largos delgados	4,2	0,79
B12N	Positivo	Bacilos cortos, delgados, forman cadenas	2,5	0,44
B13N	Negativo	Bacilos medianos, delgados, forman cadenas largas	3,9	0,53
B14N	Positivo	Bacilos medianos, delgados, esporulados	3,7	0,34
B15N	Positivo	Bacilos largos delgados, esporulados, filamentosos	4,1	0,63
B16N	Positivo	Bacilos largos, delgados	4,0	0,74
B17N	Positivo	Bacilos largos, delgados, forman filamentos	6,8	1,40
B18N	Negativo	Bacilos medianos, delgados	5,5	0,47
B19N	Positivo	Bacilos largos, gruesos, forman filamentos	7,4	1,34
B20A	Positivo	Bacilos cortos, gruesos, forman largas cadenas	2,0	0,26
B21A	Positivo	Bacilos medianos, gruesos, forman cadenas	3,5	0,48
B22A	Negativo	Bacilos medianos delgados, forman filamentos	3,8	0,51
B23A	Negativo	Bacilos largos delgados, forman filamentos	4,3	0,65
B24A	Positivo	Bacilos medianos, delgados	3,3	0,77
B25A	Negativo	Bacilos largos, delgados, forman	5,8	1,12

		filamentos		
B26A	Positivo	Bacilos largos , forman filamentos	4,2	0,73
B27A	Positivo	Bacilos largos, delgados con inclusiones	4,5	0,46
B1R	Positivo	Bacilos cortos gruesos	1,9	0,29
B2R	Positivo	Bacilos largos, delgados, ligeramente curvados	5,9	0,83
B3R	Positivo	Filamentoso, con amenóspora café y conidióforo simple	2,8	1,00
B4R	Positivo	Bacilos largos, gruesos	4,1	0,62

Fuente: Elaboración propia.

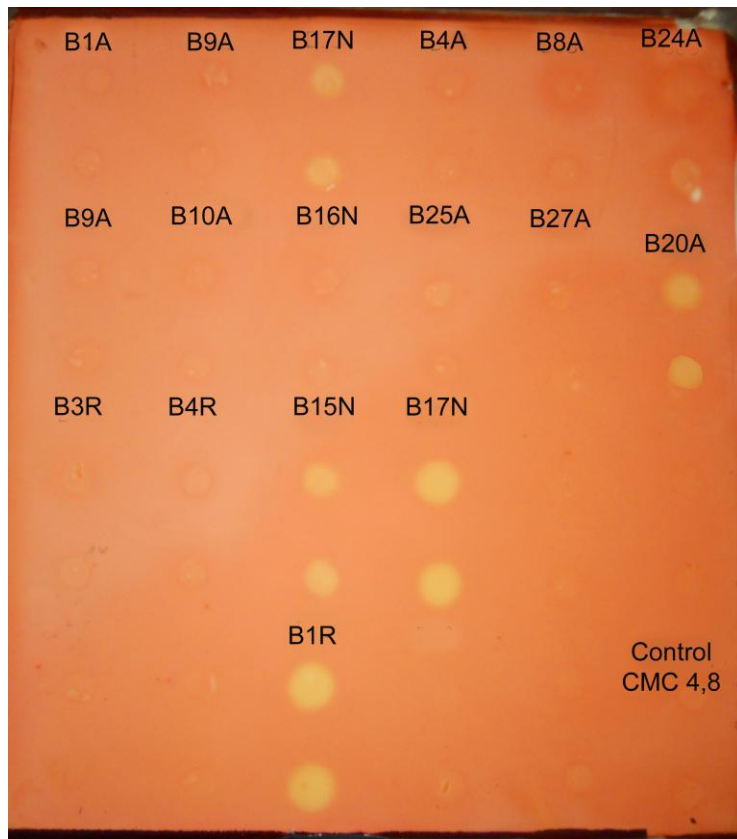
Anexo 5. Actividad cualitativa de celulasas de los cultivos bacterianos aislados de Calientes

Cultivo	Diámetro de zona de hidrólisis (mm)			
	pH 4,8	pH 7,4	pH 8,4	pH 9,4
B1A	0,0 ± 0,00	6,8 ± 0,35	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B2A	6,5 ± 0,00	7,5 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B3A	7,0 ± 0,00	7,0 ± 0,00	8,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B4A	6,5 ± 0,00	7,5 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B5A	6,5 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B6A	8,3 ± 0,35	7,3 ± 0,35	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B7A	7,5 ± 0,00	8,5 ± 0,00	8,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B8A	8,3 ± 0,35	9,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B9A	0,0 ± 0,00	7,3 ± 0,35	7,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00

B10A	0,0 ± 0,00	7,3 ± 0,35	7,5 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B11N	7,8 ± 0,35	8,5 ± 0,00	7,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B12N	12,8 ± 0,35	9,3 ± 0,35	7,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B13N	7,5 ± 0,00	7,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B14N	7,3 ± 0,35	7,5 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B15N	10,0 ± 0,00	9,0 ± 0,00	8,6 ± 0,18	8,8 ± 0,35
B16N	0,0 ± 0,00	6,5 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B17N	10,3 ± 0,35	10,3 ± 0,35	8,5 ± 0,00	6,8 ± 0,00
B18N	10,0 ± 0,00	8,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B19N	12,3 ± 0,35	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B20A	7,5 ± 0,00	8,5 ± 0,00	8,1 ± 0,18	9,0 ± 0,00
B21A	8,0 ± 0,00	9,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B22A	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	9,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B23A	7,5 ± 0,00	6,3 ± 0,35	7,8 ± 0,35	0,0 ± 0,00
B24A	9,5 ± 0,00	9,0 ± 0,00	8,8 ± 0,35	6,5 ± 0,00
B25A	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	7,0 ± 0,00	8,5 ± 0,00
B26A	8,8 ± 0,35	7,5 ± 0,00	7,8 ± 0,35	0,0 ± 0,00
B27A	6,5 ± 0,00	6,3 ± 0,35	6,5 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B1R	12,0 ± 0,00	10,5 ± 0,00	8,5 ± 0,00	8,5 ± 0,00
B2R	8,3 ± 0,35	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B3R	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
B4R	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00

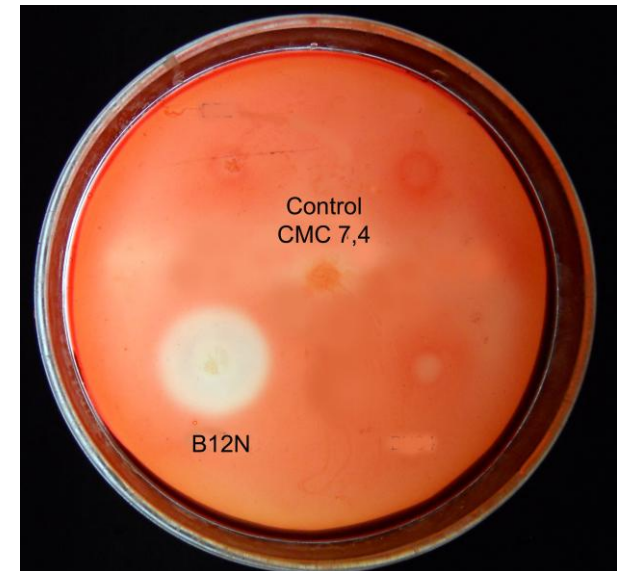
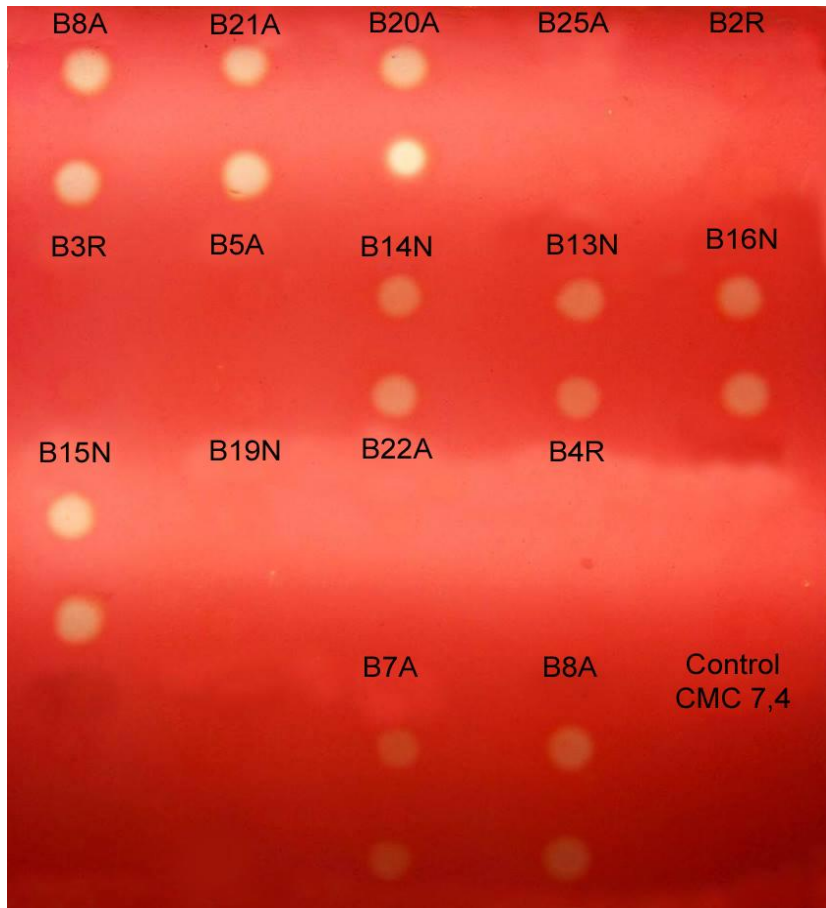
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 6. Zonas de hidrólisis de celulasas a pH 4,8



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 7. Zonas de hidrólisis de celulasas a pH 7,4



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 8. Actividad cuantitativa de endoglucanasas de cepa B12N

Temperatura (°C)	pH	Actividad (UI ml ⁻¹)	
		Repetición 1	Repetición 2
50	4,4	0,33	0,38
50	5,4	0,35	0,38
50	6,4	0,42	0,42
50	7,4	0,32	0,27
50	8,4	0,33	0,36
50	9,4	0,27	0,27
55	4,4	0,37	0,41
55	5,4	0,39	0,40
55	6,4	0,41	0,42
55	7,4	0,36	0,26
55	8,4	0,30	0,30
55	9,4	0,32	0,34
60	4,4	0,38	0,52
60	5,4	0,47	0,54
60	6,4	0,41	0,56
60	7,4	0,31	0,32
60	8,4	0,35	0,35
60	9,4	0,33	0,35
65	4,4	0,47	0,46
65	5,4	0,59	0,67
65	6,4	0,50	0,53
65	7,4	0,36	0,38
65	8,4	0,37	0,36
65	9,4	0,31	0,30
70	4,4	0,51	0,57
70	5,4	0,62	0,67
70	6,4	0,56	0,60
70	7,4	0,41	0,45
70	8,4	0,35	0,38
70	9,4	0,38	0,37
75	4,4	0,28	0,29

75	5,4	0,47	0,47
75	6,4	0,57	0,64
75	7,4	0,30	0,27
75	8,4	0,33	0,26
75	9,4	0,26	0,25
80	4,4	0,27	0,27
80	5,4	0,27	0,40
80	6,4	0,41	0,42
80	7,4	0,25	0,27
80	8,4	0,27	0,27
80	9,4	0,26	0,26
85	4,4	0,28	0,27
85	5,4	0,30	0,30
85	6,4	0,34	0,36
85	7,4	0,25	0,26
85	8,4	0,26	0,27
85	9,4	0,26	0,26

Fuente: Elaboración propia.

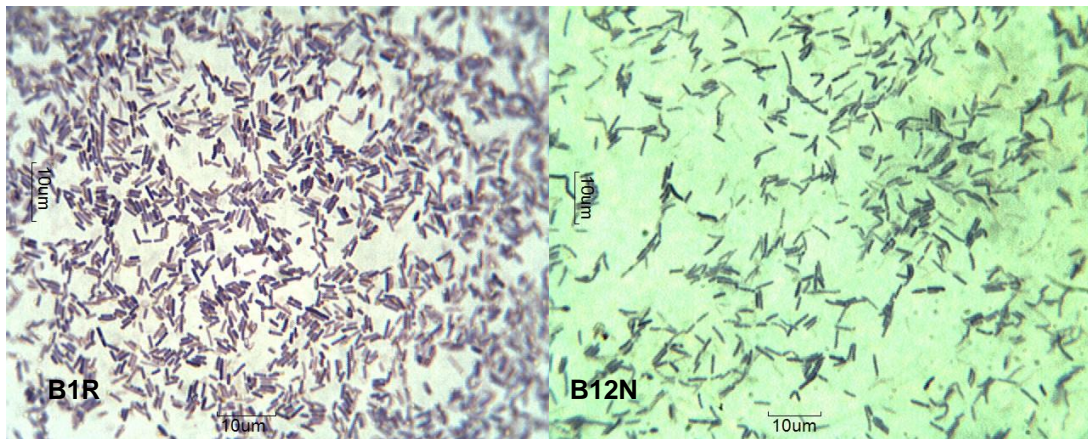
Anexo 9. Actividad cuantitativa de endoglucanasas de cepa B20A

Temperatura (°C)	pH	Actividad (U ml ⁻¹)	
		Repetición 1	Repetición 2
50	4,4	0,19	0,19
50	5,4	0,19	0,19
50	6,4	0,19	0,19
50	7,4	0,19	0,21
50	8,4	0,15	0,16
50	9,4	0,15	0,14
55	4,4	0,24	0,20
55	5,4	0,30	0,20
55	6,4	0,30	0,20

55	7,4	0,27	0,26
55	8,4	0,21	0,19
55	9,4	0,15	0,09
60	4,4	0,30	0,26
60	5,4	0,28	0,28
60	6,4	0,30	0,30
60	7,4	0,36	0,39
60	8,4	0,32	0,20
60	9,4	0,18	0,08
65	4,4	0,19	0,19
65	5,4	0,19	0,21
65	6,4	0,19	0,22
65	7,4	0,27	0,23
65	8,4	0,18	0,17
65	9,4	0,17	0,14
70	4,4	0,17	0,10
70	5,4	0,18	0,14
70	6,4	0,18	0,19
70	7,4	0,20	0,19
70	8,4	0,16	0,18
70	9,4	0,16	0,17
75	4,4	0,06	0,07
75	5,4	0,06	0,06
75	6,4	0,05	0,05
75	7,4	0,06	0,05
75	8,4	0,02	0,02
75	9,4	0,02	0,03

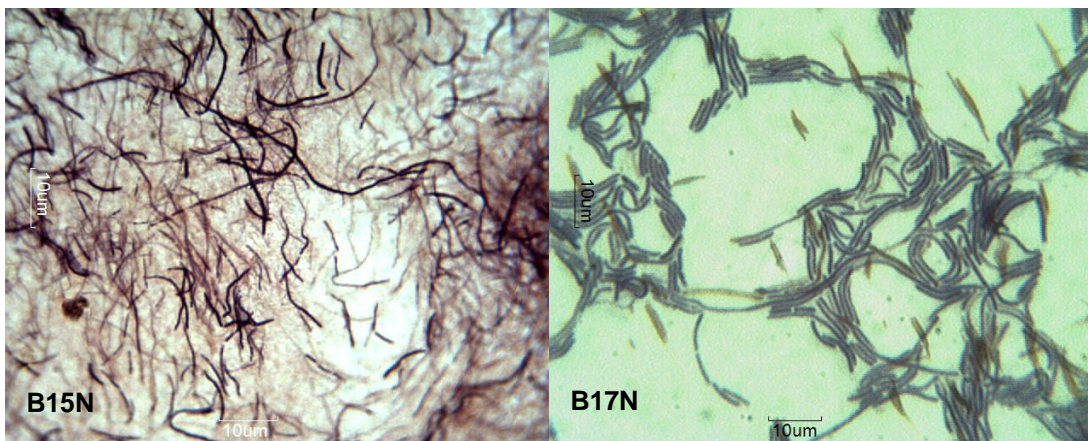
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 10. Fotografía microscópica de los cultivos bacterianos B1R y B12N



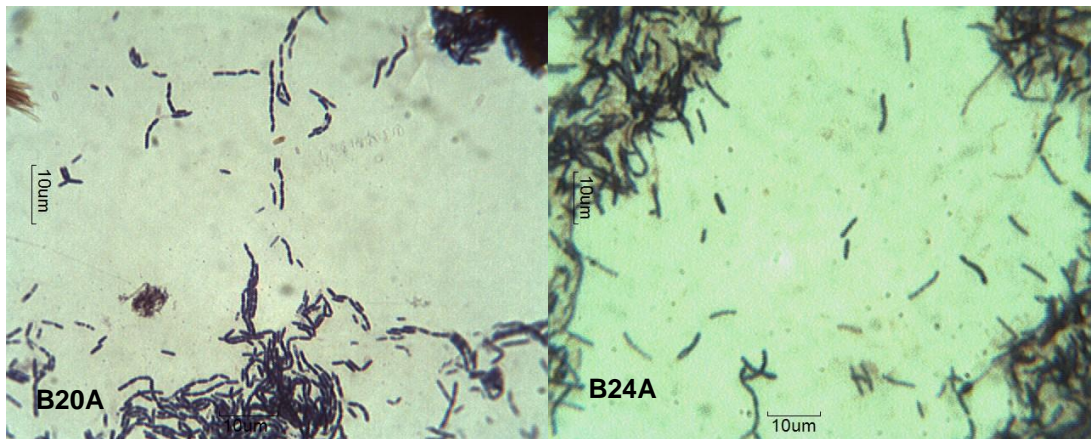
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 11. Fotografía microscópica de los cultivos bacterianos B15N y B17N



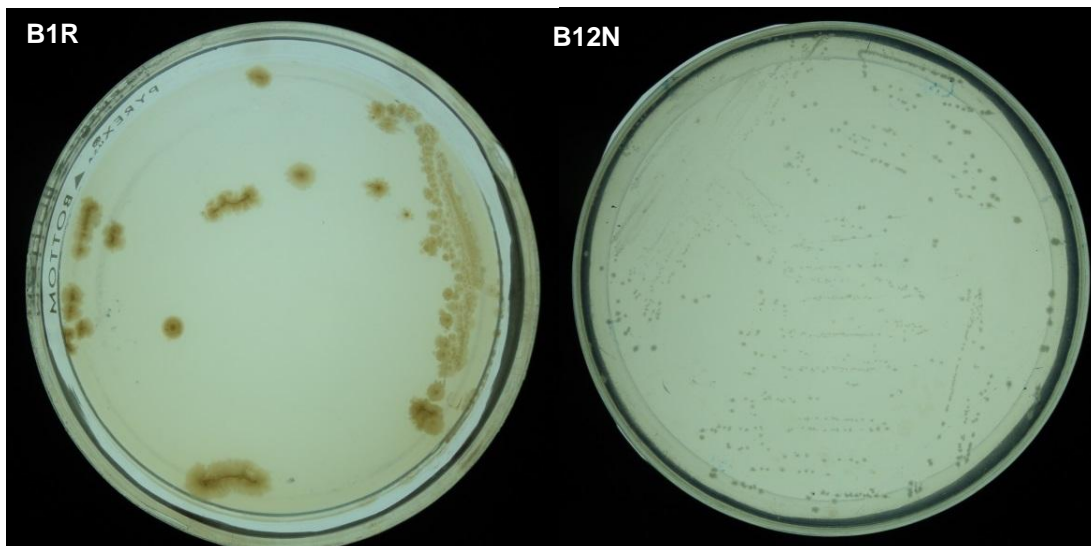
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 12. Fotografía microscópica de los cultivos bacterianos B20A y B24A



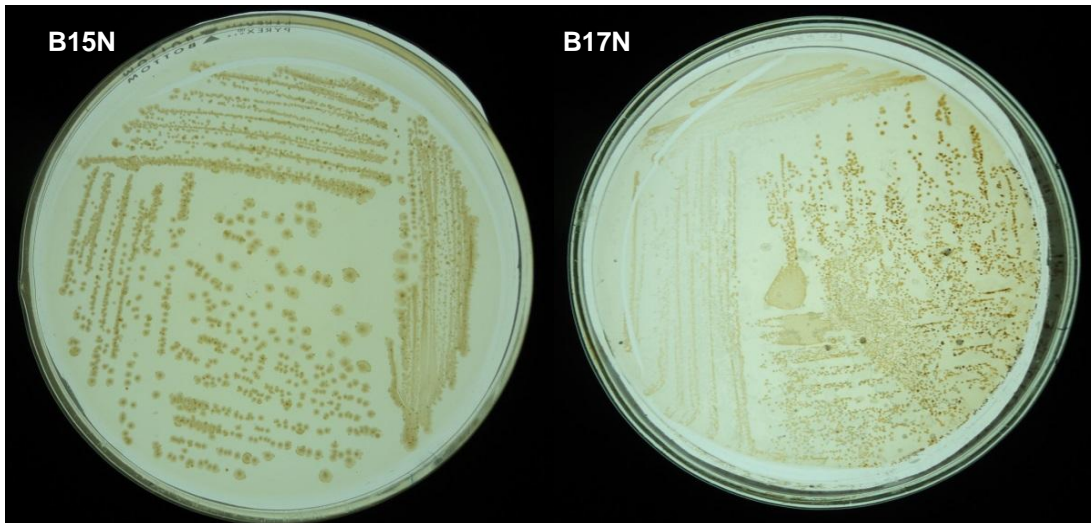
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 13. Fotografía macroscópica de los cultivos bacterianos B1R y B12N



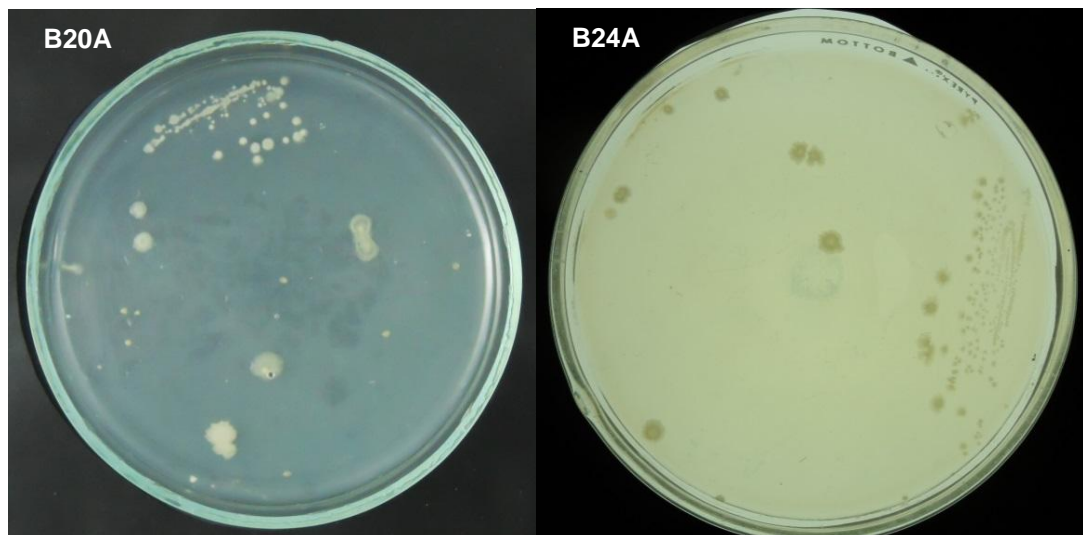
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 14. Fotografía macroscópica de los cultivos bacterianos B15N y B17N



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 15. Fotografía macroscópica de los cultivos bacterianos B20A y B24A



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 16. Fermentación sumergida en agitador orbital para producción de celulasas



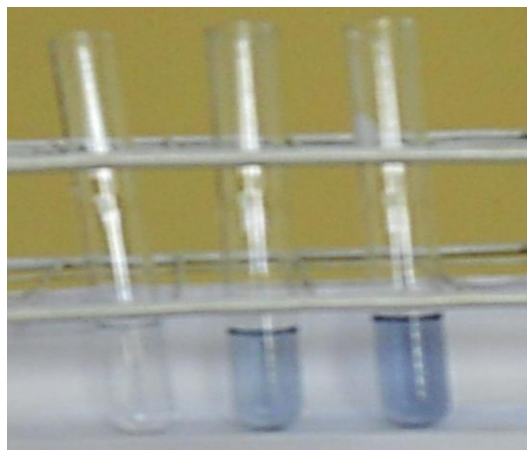
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 17. Actividad de endoglucanasas medida por el método de DNS



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 18. Cuantificación de proteínas solubles de cepas B12N y B20A por método de Lowry



Fuente: Elaboración propia.



Helena Beatriz Zapata Málaga

TESISTA



Roberto Castellanos Cabrera

ASESOR