



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
CAJAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA
SALUD**

ESCUELA ACADÉMICO

PROFESIONAL BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**BACTERIAS TERMÓFILAS CULTIVABLES PRODUCTORAS DE AMILASAS
DE LA FUENTE TERMAL EL TRAGADERO, BAÑOS DEL INCA.
CAJAMARCA, 2021.**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. ODALIZ GRACIELA QUISPE BANDA

ASESORA:

DRA.MBLGA. CLAUDIA CAROLINA RODRÍGUEZ ULLOA

CO - ASESOR:

M.Sc. MBLGO. OMAR DANIEL PAIRAZAMÁN QUIROZ

CAJAMARCA-PERÚ

2022

COPYRIGHT ©

ODALIZ GRACIELA QUISPE BANDA

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Quispe, B. 2022. **Bacterias termófilas cultivables productoras de amilasas de la fuente termal El Tragadero, Baños del Inca. Cajamarca, 2021/** Odaliz Graciela Quispe Banda.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesora: Dra. Claudia Rodríguez Ulloa

Co-Asesor: M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo – UNC

2022

**BACTERIAS TERMÓFILAS CULTIVABLES PRODUCTORAS DE AMILASAS
DE LA FUENTE TERMAL EL TRAGADERO, BAÑOS DEL INCA.**

CAJAMARCA, 2021

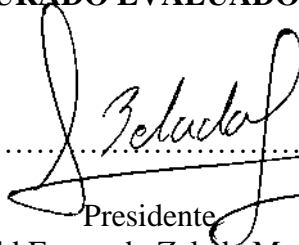
AUTORA: Bach. Odaliz Graciela Quispe Banda

ASESORA: Dra. Claudia Rodríguez Ulloa

CO-ASESOR: M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz.

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo –
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



.....
Presidente
Ronald Fernando Zelada Mazmela



.....
Secretario
Marco Antonio Rivera Jacinto



.....
Vocal
Demetrio Cieza Yrigoín

Cajamarca, 2022 - Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 02:14 pm del 28 de octubre del año 2022, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente II -304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: "Bacterias termófilas cultivables productoras de amilasas de la fuente termal El Tragadero, Baños del Inca. Cajamarca, 2021", del (a) Bachiller en: Ciencias Biológicas Odaliz Graciela Quispe Banda.

Siendo las 02:54 pm del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: **APROBADO – MUY BUENO**, con el calificativo de **17**, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencia Biológicas se encuentra **APTA** para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Jurado Evaluador:

Presidente: M.Cs. Ronald Fernando Zelada Mazmela

Secretario: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Vocal: Dr. Demetrio Cieza Yrigoín

Asesora: Dra. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Co-asesor: M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz

Presidente

Ronald Fernando Zelada Mazmela

Secretario

Marco Antonio Rivera Jacinto

Vocal

Demetrio Cieza Yrigoín

Asesora

Dra. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Co asesor

M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz

Tesista

Odaliz Graciela Quispe Banda

A: El presente informe de tesis está dedicado a mi mamá que por motivos que aún no logro entender no se encuentra conmigo, pero el solo imaginar su cara de felicidad me motiva a continuar y cumplir una de las promesas que le hice; así también se la dedico a mi papá la mejor persona que mi mamá pudo elegir para convertirse en mi amigo y mi guía; y a mis hermanos que son mi motivo de superación máxima

“Todos los triunfos nacen cuando nos atrevemos a comenzar”

Eugene Ware

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a Dios que es el que me permitió estar aquí; a mis padres, mis hermanos y mi prima que es como una hermana, por todo el apoyo y motivación que me brindaron; a mi asesora, la Dra. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa y mi Co- Asesor el Mg. Omar Pairazamán que con sus conocimientos y experiencia lograron ayudarme a culminar satisfactoriamente este trabajo de tesis.

A CONCYTEC - PROCIENCIA que, en el marco de la convocatoria de Proyectos de Investigación Básica 2019-01, financió el Proyecto Semilla “Potencial genético con aplicación biotecnológica industrial y ambiental de la microbiota termófila nativa de las fuentes geotermales de la Región Cajamarca” [número de contrato 395-2019-FONDECYT] del cual forma parte este trabajo de Tesis.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ILUSTRACIONES	x
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE ABREVIACIONES	xii
GLOSARIO	xiii
TÍTULO	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xviii
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II	3
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes de la Investigación	3
2.2 Bases teóricas	6
CAPÍTULO III.....	20
3. DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....	20
3.1 Material Biológico	20
3.2 Lugar de muestreo.....	20
3.3 Toma de muestras de la fuente termal El Tragadero.....	21
3.4 Características fisicoquímicas de las aguas y sedimentos de la fuente termal El Tragadero	21
3.5 Enriquecimiento de bacterias termófilas productoras de amilasas	21
3.6 Aislamiento de bacterias termófilas.....	22
3.7 Determinación cualitativa de la actividad amilolítica	22
3.8 Cuantificación de la actividad amilolítica	23
3.9 Identificación molecular de las bacterias termófilas productoras de amilasas.....	23
3.10 Análisis estadístico.	26
CAPITULO IV	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1. Análisis fisicoquímico de la fuente termal El Tragadero	27
4.2. Caracterización microbiológica de los aislados bacterianos.....	28
4.3. Evaluación cualitativa de la actividad amilolítica de los aislados bacterianos.	30
4.4. Ampliación del gen 16S ARNr.....	31
4.5. Cuantificación de la actividad amilolítica	36
4.6. Discusión.....	37

CAPITULO V.....	45
5. CONCLUSIONES	45
6. RECOMENDACIONES	46
LISTA DE REFERENCIAS.....	47
APÉNDICES.....	54
Apéndice 1. Forma trapezoide de la fuente termal, perímetro y área.	54
Apéndice 2. Tipos de muestras recolectadas	54
Apéndice 3. Aislados bacterianos, tinción Gram y halo de hidrólisis.	55
Apéndice 4. Ficha de registro de identificación de bacterias termófilas productoras de amilasas	62
Apéndice 5. Análisis estadístico	63
ANEXOS.....	66
Anexo 1. OBTENCIÓN ALMIDÓN DE PAPA (Zuñiga, 2013)	66
Anexo 2. Compuestos del agar almidón (Fooladi y Sajjadian, 2010)	66
Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN usando kit comercial PureLink Genomic DNA Kits.....	67

LISTA DE ILUSTRACIONES

- Figura 1.** Variación del diámetro del halo de hidrólisis de almidón en 24, 48 y 72 horas en cada aislado bacteriano de la fuente Termal El Tragadero. 30
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del gen 16S ARNr. Se usó los primers universales 27F y 1492R. 31
- Figura 3.** Árbol filogenético de las secuencias los aislados en estudio comparados con las secuencias del GenBank, perteneciente al género *Bacillus*. 33
- Figura 4.** Árbol filogenético de las secuencias los aislados en estudio comparados con las secuencias del GenBank, perteneciente al género *Caldibacillus*. 34
- Figura 5.** Árbol filogenético de las secuencias los aislados en estudio comparados con las secuencias del GenBank, perteneciente al género *Anoxybacillus*. 34
- Figura 6.** Porcentaje de almidón hidrolizado y tiempo de fermentación. 35

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas independientes de cultivo.	13
Tabla 2. Coordenadas de geolocalización y UTM de las fuentes termales de “El Tragadero”.	20
Tabla 3. Parámetros químicos metales, metaloides y no metales mayoritarios (mMol) medidos en muestras de agua y sedimento (agua intersticial) de la fuente termal El Tragadero.	27
Tabla 4. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias aisladas de la fuente termal El Tragadero.	28
Tabla 5. Identificación de secuencias consenso analizadas con el programa informático BLAST del NCBI.	32

LISTA DE ABREVIACIONES

Medio de enriquecimiento	(ME)
Agar almidón	(AA)
Reacción en Cadena de la Polimerasa	(PCR)
Basic Local Alignment Search Tool	(BLAST)
Tris, borato y EDTA	(TBE)
Metros	(m)
Milímetros	(mm)
Horas	(h)
Minutos	(min)
Segundos	(s)

GLOSARIO

Bacterias cultivables

Son bacterias que tienen la capacidad de crecer y desarrollarse en un medio de cultivo y disponiendo de nutrientes con las condiciones que se proporcionan en un laboratorio (Amann, Ludwig y Schleifer, 1995).

Biopelícula

Es un ecosistema microbiano organizado, formado por una o varias especies de microorganismos agrupados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas. Este tipo de conformación microbiana ocurre cuando las células planctónicas se adhieren a un sustrato o superficie, formando una comunidad, que se caracteriza por la excreción de una matriz extracelular adhesiva protectora (Spormann *et al.*, 2004).

Sedimento

Es un material sólido acumulado sobre la superficie terrestre que derivan de las acciones de fenómenos y procesos que actúan en la atmósfera, en la hidrósfera y en la biósfera (vientos, precipitaciones meteorológicas, desplazamiento de masas de agua en ambientes marinos, circulación de agua superficiales o subterráneas, variaciones de temperatura, acción de agentes químicos y acción de organismos vivos) (Maza, 2014).

Tapete microbiano

Son comunidades de microorganismos que se desarrollan en capas, útiles para el estudio de la vida en tiempos pasado y que persisten y se desarrollan con normalidad hoy en día (Chacon-Baca *et al.*, 2015), ya que están asociados con la precipitación de carbonatos, por lo que han jugado un papel fundamental en el ciclo biogeoquímico del carbono. Se interrelacionan gracias a un gradiente electroquímico establecido por el metabolismo microbiano caracterizado por fluctuaciones en las concentraciones de diversos metabolitos y gases, soportada por procariotas quimiolitótrofos, autótrofos, fotosintéticas y eucariotas.(Chacon-Baca *et al.*, 2015).

Hidrólisis de almidón

El proceso de hidrólisis enzimática consiste en la ruptura de las moléculas de almidón en presencia de agua para obtener dextrinas y glucosa utilizando dos enzimas, la α -amilasa y luego una amiloglucosidasa (AMG). La glucosa obtenida es el sustrato en la etapa posterior de fermentación (Bernal Bustos *et al.*, 2017).

Termoestable

Es una de las principales características de las enzimas aisladas de microorganismos termófilos, estas enzimas tienen aplicaciones comerciales por su buena correspondencia entre su estabilidad inherente y las duras condiciones de los procesos industriales (Demirjian, Morís-Varas y Cassidy, 2001).

TÍTULO

**BACTERIAS TERMÓFILAS CULTIVABLES PRODUCTORAS DE AMILASAS
DE LA FUENTE TERMAL EL TRAGADERO, BAÑOS DEL INCA.
CAJAMARCA, 2021.**

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue identificar bacterias termófilas cultivables con capacidad de producción de amilasas, que habitan la fuente termal El Tragadero, Baños de Inca – Cajamarca; para ello se recolectaron tres tipos de muestras, biopelícula, tapete y sedimento, que se transportaron al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca para su procesamiento y análisis. En condiciones de esterilidad, se mezcló y homogenizó por separado cada tipo de muestras y se adicionó al medio de enriquecimiento incubando por 7 días a 55 °C en agitador orbital a 150 rpm; luego de este tiempo, se inoculó en placas con agar almidón incubando a 55 °C por 48 horas. La capacidad de las bacterias para producir amilasas se evidenció por la formación de un halo de hidrólisis. Se obtuvo un total de 20 aislamientos bacterianos que se evaluaron macro y microscópicamente. Para su identificación molecular se amplificó el gen 16S ARNr por PCR con primers universales, el producto fue observado mediante electroforesis en agarosa y secuenciado en Magrogen-Korea. El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa informático BLASTn con el cual se logró obtener porcentajes de similitud desde 98 a 100 % con las especies del GenBank; el 50 % de las especies encontradas pertenecen a *Bacillus licheniformis*, el 20 % a *Caldibacillus* spp., 10 % *Bacillus* spp. y *Bacillus subtilis*, el 5 % para *Bacillus haynesii* y *Anoxybacillus* spp.; todas pertenecientes a la familia Bacillaceae. Los 6 aislados con mejores perfiles de hidrólisis (T26A, T33A, T56A, T58A, T75A y T81A); se sometieron a evaluación del porcentaje de almidón hidrolizado a diferentes tiempos (24 h, 48 h, 72 h y 96 h), observando que no existe diferencia estadísticamente significativa en la relación tiempo y porcentaje de almidón hidrolizado respecto a los aislados bacterianos analizados. Se concluye que cualquiera de las cepas bacterianas podría ser útiles en diversos procesos de producción de amilasas.

Palabras claves: Amilasas, *Anoxybacillus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus haynesii*, *Caldibacillus*, hidrólisis.

ABSTRACT

The objective of this research was to identify cultivable thermophilic bacteria with amylase production capacity, which inhabit the El Tragadero hot spring, Baños de Inca - Cajamarca; For this, three types of samples were collected: biofilm, microbial mat and sediment, which were transported to the Microbiology Laboratory of the National University of Cajamarca for processing and analysis. Under sterile conditions, each type of sample was mixed and homogenized separately and added to the enrichment medium, incubating for 7 days at 55 °C in an orbital shaker at 150 rpm; after this time, it was inoculated on plates with starch agar, incubating at 55 °C for 48 hours. The ability of bacteria to produce amylases was evidenced by the formation of a hydrolysis halo. A total of 20 bacterial isolates were obtained and evaluated macroscopically and microscopically. For its molecular identification, the 16S rRNA gene was amplified by PCR with universal primers, the product was observed by agarose electrophoresis and sequenced in Magrogen-Korea. The analysis of the sequences was carried out using the BLASTn computer program with which it was possible to obtain percentages of similarity from 98 to 100% with the GenBank species; 50% of the species found belong to *Bacillus licheniformis*, 20% to *Caldibacillus* spp., 10% *Bacillus* spp. and *Bacillus subtilis*, 5% for *Bacillus haynesii* and *Anoxybacillus* spp.; all belonging to the *Bacillaceae* family. The 6 isolates with the best hydrolysis profiles (T26A, T33A, T56A, T58A, T75A and T81A); were subjected to evaluation of the percentage of hydrolyzed starch at different times (24 h, 48 h, 72 h and 96 h), observing that there is no statistically significant difference in the relationship between time and percentage of hydrolyzed starch with respect to the bacterial isolates analyzed. It is concluded that any of the bacterial strains could be useful in various amylase production processes.

Keywords: Amylases, *Anoxybacillus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus haynesii*, *Caldibacillus*, hydrolysis

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Las fuentes termales son ambientes naturales particulares que se caracterizan por presentar altas temperaturas y concentraciones elevadas de algunos elementos como el hierro y el azufre. Estas condiciones, vistas desde el punto antropocéntrico y del común de las bacterias mesófilas, harían pensar que la vida en ambientes bajo estas condiciones sería inusual e incluso nula (Stetter, 1999); sin embargo, el conocimiento actual revela una diversidad impresionante de microorganismos con capacidades desconocidas o potencialidad no reveladas, por lo que estudiar la vida en estos ambientes puede considerarse como una actividad apasionante y desafiante. Nuestro país tiene innumerables fuentes termales sobre las cuales descansa un valor turístico y medicinal. En la provincia de Cajamarca, además del complejo Baños del Inca que es muy conocido por la actividad turística, se encuentra la fuente termal El Tragadero, la cual presenta temperaturas que pueden llegar a 70 °C (según datos no publicados, es la poza termal con mayor temperatura en la región Cajamarca). Lo interesante de todo esto es que no se han realizado estudios para describir la microbiota bacteriana cultivable.

La razón de estudiar la microbiota cultivable de El Tragadero fue conocer los géneros bacterianos con capacidad de producir amilasas termoestables. Las amilasas son enzimas muy utilizadas en todo el mundo en la industria de alimentos y bebidas, textiles y de limpieza, por ejemplo, se utiliza en el ablandamiento de la malta en la industria cervecera, la remoción de almidones en la industria textil, como aditivos en detergentes, entre otras (Ferrerías, 2011). La razón de buscar termozimas es que algunos bioprocesos realizan sus actividades a temperaturas sobre los 45 °C, esto hace que las amilasas producidas por bacterias mesófilas, las más comunes, se desnaturalicen. Las termozimas,

constituyen al día de hoy uno de los grandes productos biotecnológicos de importancia industrial y cabe mencionar que, a pesar de existir un mercado muy grande de enzimas a nivel mundial, el Perú no es productor de alguna, a pesar de contar con una amplia diversidad de lugares muy interesantes de analizar y encontrar a estas bacterias (Rolle, 1998).

Por lo expuesto, reconocemos que existe un vacío de investigaciones sobre ambientes termófilos en la región y de sus poblaciones microbianas; por esa razón, la presente investigación buscó reducir esa brecha y contribuir al conocimiento determinando los géneros de bacterias termófilas cultivables productoras de amilasas que habitan la fuente termal El Tragadero, Baños de Inca - Cajamarca. Además, consideramos que a partir de esta investigación se abre un abanico de opciones para estudios posteriores a nivel microbiológico, molecular y de bioprocesos, sobre las bacterias nativas de este lugar que permita contribuir con más conocimiento regional y nacional del potencial microbiano en las fuentes termales de Cajamarca.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

En diferentes partes del mundo se han hecho estudios sobre microorganismos termófilos con actividad amilolítica que habitan fuentes termales. Una investigación realizada hace casi una década atrás, en las fuentes termales de Meshkinshahr, en la India, se aislaron bacterias que fueron clasificadas por pruebas fenotípicas dentro del género *Bacillus*, y expresaron actividad enzimática de α -amilasas termoestables hasta los 70 °C, en presencia de almidón soluble y a pH 6 (Fooladi y Sajjadian, 2010).

Un trabajo desarrollado en Arabia Saudita, describe el aislamiento de *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. thermoamylovorans*, *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. de muestras de agua de una fuente termal a 60 °C. Lo interesante de este trabajo es que se utilizaron soportes de tubos compuestos por plástico (PCS) para mejorar el crecimiento microbiano a temperaturas más altas, la temperatura óptima de los aislamientos fue de 60°C. Por lo tanto, se usaron diferentes mezclas de PCS para mejorar el crecimiento, PCS mezclado con 20 y 15 % (p/p) de huesos de dátiles y 5 % (p/p) de extracto de levadura estimuló el crecimiento de *B. thermoamylovorans* a 90 °C (Mohammad A. Khiyami, 2012) .

La siguiente investigación destaca el aislamiento de las bacterias termófilas *B. licheniformis* y *Thermomonas hydrothermalis*, los aislados mostraron capacidad para producir algunas enzimas termoestables como amilasa, proteasa, celulosa, gelatinas y lecitina. Además, se construyó el dendrograma UPGMA de las características enzimáticas

de los diez aislados. Este fue el primer informe sobre el aislamiento de una cepa de *Thermomonas* en aguas termales jordanas. Así también, la diversidad en el análisis fenotípico y enzimático entre las cepas de *B. licheniformis* indicó la presencia de subespecies. Estos resultados prometedores pueden explotarse aún más para la producción de enzimas biotecnológicas importantes e industrialmente termoestables. Este estudio amplía las oportunidades de realizar más investigaciones para explorar más la inmensa importancia de estas cepas, especialmente los aislamientos de *Thermomonas*, donde hace falta estudios intensivos sobre este organismo (Mohammad *et al.*, 2017).

La cepa de *Bacillus* spp. BBM1, fue aislada a partir de suelo en la Universidad Nacional de Colombia, se encontró que filogenéticamente está relacionada con las especies *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens* y es productor de alfa-amilasa. La enzima fue muy estable a temperatura de 60 °C aunque presentó actividad significativa entre 30 y 80 °C, además tuvo un pH óptimo entre 5,0 y 7,0 sin requerir cofactores como el calcio para su funcionamiento; estas propiedades hacen que esta enzima sea atractiva para aplicaciones industriales (Quintero, Montoya y Gutiérrez, 2009).

En la región altiplánica de Potosí-Bolivia, se logró determinar la actividad amilolítica y proteolítica de bacterias anaerobias extremófilas aisladas de hábitats extremos a lo largo del altiplano boliviano. Las bacterias fueron expuestas a diferentes temperaturas de crecimiento (de 20 a 80 °C) y salinidad (de 0, 5 y 20 % NaCl) en medios con distintas fuentes de carbono para evaluar su actividad enzimática: almidón soluble, carne, caseína y gelatina; logrando 7 aislamientos de anaerobios halófilo moderados, 2 aislados de anaerobias termófilas y 2 aislados anaerobias hipertermófilas. En las

evaluaciones enzimáticas, las cepas mostraron un máximo de actividad amilolítica de 17,91 UI/mL (termófilo) y 15,83 UI/mL (halófilo moderado), mientras que el máximo de actividad proteolítica fue de 2,4 UI/mL (halófilo moderado) y 1,2 UI/mL (hipertermófilo) (Feraudy, 2011).

Los países en vías de desarrollo han tratado de explotar su riqueza microbiológica, tomando los ambientes extremos como la fuente geotermal Papallacta localizada en la provincia de Napo en Ecuador; esta fuente de agua termal tiene una temperatura promedio de 54 °C y un pH de 8,2, con presencia de altas concentraciones de sodio, cloro y sulfato; en el estudio se hallaron bacterias termófilas *Anoxybacillus amylolyticus*, *Aeribacillus pallidus*, *Anoxybacillus gonensis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermoactinomyces intermedius*, *Tepidimonas taiwanensis* y *Anoxybacillus flavithermus* (Arias Factos, 2018).

Así mismo, en Tarapoto-Perú también existen estudios en fuentes termales, donde se tomó como muestra el agua de la fuente termal y se seleccionaron 14 bacterias con diferentes características microbiológicas, de las cuales 12 presentaban actividad amilolítica, además de las 14 bacterias aisladas 13 pertenecían al género *Bacillus* (Borja, Zavaleta e Izaguirre, 2012).

En el campo geotermal de géiseres de Calientes, Candarave, con temperaturas en torno a 80 °C (Tacna-Perú), (Villena *et al.*, 2019), se logró aislar e identificar *B. licheniformis* productor de amilasas. La capacidad amilolítica se evaluó en un medio de cultivo sólido conteniendo almidón al 1 %, después de 72 horas generó un halo de hidrólisis de 29,5 mm de diámetro. Esta investigación también señala que se generó una

concentración máxima de amilasa de 1410,57 μ g/mL de azúcares reductores a inicios de la fase estacionaria a 54,6 horas de incubación a 60 °C y pH 7, además se logró purificar 2,3 veces la enzima con sulfato de amonio. Finalmente se determinó que la temperatura óptima fue de 58 °C con una actividad de 10,7 U/mL y a un pH óptimo de 6,7 con una actividad de 8,3 U/mL.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Fuentes termales

Las fuentes termales son emanaciones de agua caliente, con rango variable de temperatura y que presentan altas concentraciones de sales minerales, con pH variables y que en muchos casos genera condiciones no favorables para el crecimiento de muchos seres vivos. Según Castany (1971) existen tres formas en las que se pueden originar las fuentes termales: *De origen meteórico*, en la que el agua filtrada de la superficie llega a estratos profundos y aumenta su temperatura por sufrir un gradiente geotérmico, que es variable dependiendo del punto en el que se encuentre (un valor promedio es de 33°C/1 000 m). *De origen juvenil*, originado por “magmatismo”, donde las aguas proceden de la cristalización del magma y por “vulcanismo” donde el vapor de agua del magma generado en estratos profundos, se condensa y surge. Finalmente, las *de origen mixto*, que es una combinación de las anteriores (Vargas, 2010).

En nuestro país las fuentes termales que se encuentran dentro de los departamentos de Cajamarca y Piura, son de origen meteórico, es decir que surgen por subducción de agua subterránea; a diferencia de lo que ocurre en el sur del Perú donde el

predominan las fuentes termales de origen mixto (Vargas, 2010). Cajamarca es considerada como uno de los departamentos con mayor número de fuentes termales entre ellos Chancay Baños, Pinipata Baños, Bombón, El Cumbe, Quilcate, Llanguat, Baños Jerez, Yumagual, Baños del Inca y El Tragadero; este último se encuentra en el distrito de Baños del Inca, sus aguas son cloruradas con contenidos de 98 y 101 mg/L de Cl, temperatura de 68 °C y 71 °C, un pH de 6,6 y la temperatura del reservorio alcanza los 79°C aproximadamente, dichas condiciones son aprovechadas por diversos microorganismos (Instituto Geológico Minero Metalúrgico, 2000).

2.2.2 Microorganismos termófilos

Los microorganismos termófilos pertenecen principalmente a las Eubacterias y Arqueobacterias, que son microorganismos unicelulares procariotas. Se pueden clasificar dependiendo del rango de temperatura al cual crecen: termófilos 45-47 °C, termófilos extremos 50-85 °C e hipertermófilos 85-120°C (Andrade, Pereira y Antranikian, 1999). En el dominio Eucariota la tolerancia a altas temperaturas es menor que en los procariotas, pero se han observado que resisten hasta los 61°C (De Oliveira, Gomes y Rodrigues, 2015). Entre los eucariotas se han encontrado hongos termófilos que crecen a una temperatura máxima de 62 °C y mínima de 20 °C. Los procariotas que se desarrollan a altas temperaturas pueden tener algunas o todas las características de las que se describen a continuación.

Enzimas estables. Conocidas como termoenzimas, las cuales no se desnaturalizan a altas temperaturas o condiciones de pH. A partir de diferentes microorganismos

termófilos se han aislado y caracterizado algunas enzimas como DNA-girasa la cual produce un superenrollamiento positivo del DNA de microorganismos termófilos (Rosenberg *et al.*, 2013).

Variación en los lípidos de la membrana. La membrana celular tiene un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados con elevados puntos de fusión en comparación con los lípidos de los microorganismos mesófilos. Los microorganismos ajustan la composición de ácidos grasos y lípidos dependiendo de la temperatura de crecimiento. Al aumentar la temperatura, se incrementa la proporción de ácidos grasos insaturados. Esta característica le confiere a la membrana celular gran flexibilidad y estabilidad térmica. Los ácidos grasos de la membrana celular proporcionan un ambiente hidrofóbico para la célula y mantienen la célula bastante rígida para vivir a elevadas temperaturas (Sinisterra, 2012).

Proteínas. Son especialmente estables, ya que poseen un mayor número de puentes de hidrógeno entre sus aminoácidos, poseen menor flexibilidad, un menor número de giros en su estructura, tienen una carga superficial mayor y pocos aminoácidos termolábiles hacia el exterior, en comparación con sus contrapartes mesófilas (Oliart-Ros *et al.*, 2016). El crecimiento a elevadas temperaturas es simplemente el resultado de rápidos mecanismos de síntesis celular que van siendo desnaturalizados por el calor. Los termófilos contienen proteínas que son termoestables y resistentes a desnaturalización y proteólisis. Proteínas especiales conocidas como chaperoninas son producidas por estos microorganismos, las cuales ayudan, después de su desnaturalización a replegar las proteínas a su forma nativa y restaurar sus funciones (Haki y Rakshit, 2003).

Otras estrategias. Existen otras estrategias generales que se cree contribuyen con la adaptación de estos extremófilos al medio en el que viven, como el rápido recambio de los metabolitos y estructuras dañadas, la expresión de proteínas de estrés térmico (Simpson *et al.*, 1990), la canalización metabólica, la utilización de una vía metabólica alternativa o la sustitución de compuestos termolábiles dentro de la misma vía, como en el caso de la sustitución del ATP por ADP o pirofosfatos en rutas glicolíticas, o el uso de proteínas de hierro sin grupo hemo, en lugar de NAD(P) en reacciones redox. También se especula con la existencia de protección de metabolitos en microambientes (Sinisterra, 2012).

2.2.3 Bacterias en fuentes termales

Las bacterias termófilas crecen a más de 45 °C; según sus requerimientos nutricionales, predominan las bacterias heterótrofas oligotróficas con escasos requerimientos de carbono y nitrógeno (oligocarbofílicas y oligonitrofílicas), en menor número se han encontrado microorganismos autótrofos, tanto quimiolitótrofos como fotótrofos (cianobacterias, bacterias verdes y rojas), y la mayoría son aerobios o anaerobios facultativos, de pequeño tamaño, móviles y con pigmentos (Frock y Kelly, 2012).

Las bacterias heterótrofas que son el grupo que predomina en las fuentes termales no suelen fermentar los azúcares, pero son amonificantes, proteolíticas, amilolíticas y en menor número celulíticas, estos tipos de bacterias se consideran beneficiosas ya que intervienen en la autodepuración de las aguas si de una forma accidental,

sufren un aporte de materia orgánica; en las fuentes de aguas sulfurosas se encuentran bacterias que oxidan el azufre y el sulfhídrico (*Beggiatoa*, *Thermothrix*, *Thiobacillus*), así como bacterias sulfatorreductoras (*Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*), estas últimas se consideran perjudiciales ya que pueden producir corrosión en las conducciones de hierro debido a la producción de sulfhídrico. En aguas ferruginosas es frecuente la presencia de bacterias que oxidan el ión ferroso a férrico obteniendo energía (*Clonothrix*, *Leptothrix*, *Leucothrix*, *Sphaerotilus*). Muchas de ellas son filamentosas y producen precipitados de óxido e hidróxido férrico que pueden originar obstrucciones y biocorrosiones en las conducciones (De La Rosa y Mosso, 2016).

Así también, en las fuentes cloruradas sódicas e hipertónicas es frecuente la presencia de bacterias halófilas moderadas (*Halomonas*, *Micrococcus*, *Vibrio*) y halotolerantes (*Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Planococcus*), que resisten una elevada osmolaridad debido a complejos mecanismos de regulación interna. En relación con las bacterias heterótrofas, las aguas hipertermales presentan una mayor proporción de bacterias gram positivas, mientras que en las mesotermas predominan los bacilos gram negativos y los cocos gram positivos (Andrade, Pereira y Antranikian, 1999).

Los principales géneros identificados han sido: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. El género *Pseudomonas* es muy ubicuo y se encuentra en ambientes acuáticos con pocos nutrientes, considerando a las especies del grupo fluorescente encontradas en estas aguas, como *P. fluorescens* y *P. putida*, población autóctona de manantiales

meso e hipotermas. En esta agua con menor temperatura también es frecuente la presencia de otros bacilos gram negativos como *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas* (De La Rosa y Mosso, 2016).

Otro grupo de bacterias reportadas frecuentemente en fuentes termales son especies del género *Bacillus* que están ampliamente distribuidas y pueden proceder del suelo o de las propias aguas. La presencia de los cocos gram positivos, *Staphylococcus* y *Micrococcus*, es frecuente en estas aguas que resisten concentraciones altas de sal, aunque no se detectan especies propias del hombre. Otros géneros de cocos presentes en estas aguas son *Vagococcus*, *Planococcus* y *Marinococcus*, típicos de ambientes acuáticos dulces y marinos. El género *Enterobacter*, a pesar de su pertenencia a la familia de las enterobacteriaceas, se considera que forma parte de la micropoblación autóctona ya que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. En ocasiones, principalmente en aguas hipertermales o carbónicas, se encuentran bacilos gram positivos irregulares como *Arthobacter*, *Kurthia*, *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Exiguobacterium*, *Rubrobacter*, y otros difíciles de identificar, cuyo hábitat puede ser el suelo pero que se han adaptado a vivir en condiciones adversas (Frock y Kelly, 2012).

2.2.4 Técnicas de cultivo e identificación de microorganismos termófilos

2.2.4.1 Técnicas dependientes de cultivo

Son los métodos clásicos y más utilizados en la práctica puesto que su realización y coste los hace más accesibles, estos se basan en un medio sintético con agar donde se pueden realizar recuentos de microorganismos y determinar

la diversidad de una muestra y su morfotipo. Los medios sintéticos son elaborados a partir de una gran diversidad de sustratos e incubados en condiciones específicas que cumplen los requerimientos básicos para el crecimiento microbiano como: disponibilidad de nutrientes, consistencia del medio (líquido, semisólido y sólido), presencia o ausencia de oxígeno, humedad, luz, pH y temperatura (Madigan *et al.*, 2015).

Adicionalmente los medios son clasificados según su composición y utilización, algunas de las categorías son medios: nutritivos, enriquecidos, selectivos, inhibidores, diferenciales, de identificación y de multiplicación entre otros. Debido a todas estas características se puede realizar una identificación basados en las características fenotípicas u «observables» de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas (Madigan *et al.*, 2015).

2.2.4.2 Técnicas independientes de cultivo

Los enfoques moleculares dirigidos a finales de 1990 respondieron a la necesidad de abrir nuevas fronteras para la comprensión de la biodiversidad microbiana, solventando varios de los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica. Estos nuevos métodos nombrados independientes de cultivo (Tabla 1) son capaces de detectar e identificar microorganismos directamente en un ambiente sin necesidad de cultivarlos y aislarlos, ya que se fundamentan en la descripción genotípica de los mismos basada en el análisis de ADN o ARN (Ali *et al.*, 2018).

Tabla 1. Técnicas independientes de cultivo (Ali *et al.*, 2018).

Técnica	Descripción
PCR	Amplificación de fragmentos de la secuencia de ADN, con genes específicos de interés.
Tinción fluorescente	Usos de colorantes fluorescentes que se unen a estructura celulares y permiten la diferenciación de viables y no viables.
Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	Unión de sondas de ADN marcadas con un fluorocromo con fragmento de ADN o ARN del microorganismo.
Electroforesis con gel en gradiente desnaturizante (DGGE)	Separación de producto de PCR con igual tamaño pero diferente secuencia, obtención de “Huellas Digitales”.
Análisis por impedancia	Medición de la actividad metabólica de manera indirecta por la modificación de conductividad del medio de cultivo.

Este tipo de metodología consiste en la extracción de los ácidos nucleicos directamente de las muestras para posteriormente ser analizados por técnicas capaces de definir cuántas y cuáles son las especies microbianas presentes, de igual forma específicamente con el ARN es posible entender cuáles son las partes metabólicamente activas de una población específica. El principio de la identificación cultivo-independiente es la utilización de genes como dianas moleculares en los distintos géneros y especies, esto se representa en un estudio taxonómico o de la filogenia de los organismos (Ali *et al.*, 2018).

2.2.5 Enzimas termoestables

Diferentes análisis comparativos entre enzimas termoestables y mesofílicas revelaron que la composición de aminoácidos es ligeramente parecida, pero con una clara diferencia: las enzimas termoestables contienen muchos residuos cargados e hidrofóbicos; al parecer la sustitución de un aminoácido de uno o más lugares de la enzima permite que ésta se pliegue en una forma diferente y resista los efectos desnaturalizantes del calor. La frecuencia de ocurrencia de aminoácidos tales como cisteína, asparragina y ácido aspártico es significativamente menor en proteínas hiperestables con respecto a sus homólogas en microorganismos mesófilos; además la maquinaria de síntesis de proteínas y las membranas son igualmente estables a altas temperaturas (Carrera, 2003). Al comparar estructuras 3D de proteínas termófilas con sus contrapartes mesófilas, se ha observado una estructura altamente conservada. Esto sugiere que los residuos conservados tienen algún significado funcional. La mayoría de las diferencias pueden ser observados en la región de la proteína que interactúa con el solvente: diferencias en los tamaños de hélices, láminas beta y modificaciones iónicas en porciones terminales, así también se observa un empaquetamiento apretado, pero esto no altera la conformación final (Sarmiento y Blamey, 2015) .

Ventajas de enzimas: las enzimas de los organismos termófilos presentan una serie de ventajas que les hacen prevalecer sobre sus homólogas de mesófilos, incluso teniendo en cuenta concesiones hechas a la velocidad catalítica. Algunas de las ventajas con las que cuentan las termozimas son:

- Presentan una mayor resistencia frente a diversos agentes químicos como solventes orgánicos, detergentes, diferentes pH y también frente a proteólisis.
- Mayor estabilidad y una vida media más prolongada, lo que hace que disminuya la necesidad de sustitución en los procesos y abarata su almacenamiento.
- La viscosidad de los medios de reacción es menor cuanto más elevamos la temperatura, con las consiguientes mejoras, que de esto se deriva, en la mezcla y bombeo de sustratos.
- Aumenta la solubilidad de sustratos y productos, de tal manera que se puede incrementar su concentración.
- Posibilidad de reducir la necesidad de refrigeración en procesos de fermentación a gran escala, en los que se generan elevadas temperaturas que resulta costoso disminuir.
- La posibilidad de contaminación, a lo largo de los procesos que requieren esterilidad, se ve disminuida al aumentar la temperatura.
- Se facilita mucho su purificación, tras la expresión heteróloga en un organismo mesófilo, con un tratamiento previo por calor (Ferrerías, 2011).

2.2.6 Amilasas

Las amilasas son enzimas que hidrolizan moléculas de almidón, para obtener diversos productos incluyendo la dextrina, y progresivamente polímeros más pequeños compuestos por unidades de glucosa. Las amilasas constituyen una clase de enzimas industriales correspondiente al 25 % de las enzimas del mercado

(Carrera, 2003) se han descrito tres tipos de amilasas, que a continuación se describen:

2.2.6.1 α -amilasa: Reduce la viscosidad del almidón pues rompe los enlaces alfa 1-4 al azar y obteniendo como resultado maltosa y otros oligosacáridos de diversos tamaños. Esta enzima tiene un peso molecular de 50 000 Daltons, es estable a pH de 5,5 – 8,0 con una actividad optima de 5,9, son dependientes de calcio, aunque el catión no esté integrado en el centro activo de la enzima, este se encuentra fuertemente unido a la enzima y solo puede ser removidos a pH bajo o por el uso de agentes quelantes; la completa remoción del calcio lleva a la pérdida total de la actividad (Espitia Rocha, 2009).

Dentro de los microorganismos que han sido reportados como productores de α -amilasas tenemos: *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Serratia*. Se han obtenido enzimas termoestables a partir de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, permitiendo llevar a cabo la sacarificación a altas temperaturas acelerando el proceso y minimizando la contaminación microbiana (Monteiro de Souza, 2010).

2.2.6.2 β -amilasa: Rompe los enlaces alfa 1-4 y forma cadenas de maltosa (unión de 2 glucosas), debido a que esta enzima está imposibilitada para hidrolizar los puntos ramificados α -1,6 en la molécula de almidón, los productos finales de la acción sobre el sustrato son maltosas y dextrinas, formándose pocas cantidades de maltotriosa y glucosa. Contienen un grupo

sulfhídrico esencial para la actividad enzimática que se lleva a cabo de forma óptima en un rango de pH entre 4 y 5 (Espitia Rocha, 2009).

Algunos microorganismos productores son: *Bacillus polymyxa*, *B. cereus*, *Streptomyces*. Aunque el rendimiento en las cepas silvestres es generalmente bajo, se han descubierto mutantes que producen 200 veces más la enzima que la cepa silvestre (Carolina, 2006).

2.2.6.3 Glucoamilasa: Rompe los enlaces alfa 1-4 como los enlaces alfa 1-6 desde el extremo no reductor para formar unidades de glucosa libre. Sin embargo, la glucoamilasa es incapaz de hidrolizar el almidón por completo a glucosa, ya que la ruptura requiere la participación de una enzima de acción interna. Esta enzima puede ser separada en dos fracciones glucoamilasa I que posee alta actividad desramificante la cual se acelera en presencia de la α -amilasa y glucoamilasa II que posee una baja actividad desramificante (Monteiro de Souza, 2010).

2.2.7 Aplicaciones de amilasas

Uno de los usos principales de las amilasas es la producción de edulcorantes para la industria alimentaria, para ello se utilizan hidrolizados de almidón como aditivos en la fabricación de caramelos, alimentos en conserva o alimentos congelados (Canales, Chávez-Hidalgo y Zavaleta, 2014). En la industria de los detergentes las amilasas son el segundo tipo de enzimas más utilizadas en cuanto a su formulación; el 90 % de todos los detergentes líquidos contienen estas enzimas ya que degradan los residuos de alimentos ricos en almidón como: papas, salsas, chocolate,

dextrinas y otros oligosacáridos más pequeños; debido a la estabilidad de las amilasas es uno de los criterios más importantes para su uso en detergentes donde el ambiente de lavado es muy oxidante (Monteiro de Souza, 2010).

Las α -amilasas también se utilizan en el procesado de la caña de azúcar, puesto que, están en la planta, y por lo tanto en su jugo, existen pequeñas cantidades de almidón que pueden hidrolizarse antes de la evaporación como es el caso de la α -amilasa de *B. licheniformis* a 85 a 95 °C; Además de generar compuestos fermentables, α -amilasas también tienen un efecto anti-endurecimiento en la cocción del pan, y mejoran la retención de la suavidad de productos horneados, aumentando la vida útil de estos productos Actualmente, una amilasa maltogénica termoestable de *Bacillus stearothermophilus* se utiliza comercialmente en la industria de la panadería. Las amilasas también se utilizan para la clarificación de cerveza o jugos de frutas, o para el pretratamiento de alimentos para animales para mejorar la digestibilidad de la fibra (Konsoula y Liakopoulou-kyriakides, 2007).

Las β -amilasas comercialmente disponibles con una actividad catalítica por encima de los 60 °C fueron aisladas a partir de varias especies de *Bacillus*, estas pueden ser usadas en conjunto con enzimas desramificadoras para producir jarabes de maltosa puro. Termamyl y fungamyl son dos enzimas amilolíticas bien conocidas las cuales están actualmente disponibles comercialmente. Estas enzimas son usadas ampliamente en el mundo para la producción de jarabes de glucosa y jarabes con diferentes niveles de dextrosa (Fallis, 2013); la enzima encuentra aplicación en la industria ya que el producto final, la maltosa, es indispensable como edulcorante en

alimentos y productos farmacéuticos debido a su leve dulzor y falta de formación de color. Las β -amilasas también retrasan la retrogradación del almidón, manteniendo así la calidad del pan y evitando que se rancie (Das y Kayastha, 2019).

La utilización de las amilasas bacterianas en las industrias de fabricación de papel y de textil, se basa en la utilidad de las dextrinas producidas a partir del almidón como agentes cohesivos. En la industria textil se utiliza recubrimiento de almidón para evitar que la fibra se retuerza y aumente su peso durante el tejido; sin embargo, para el subsecuente procesamiento de la tela, el almidón tiene que ser completamente removido. Después de ser prelavado en agua caliente a 90 °C durante 10 s, la tela es pasada una o más veces por un baño que contiene una solución 0.5 – 1 % p/v de la α -amilasa de *B. subtilis* y una solución 0.05 % p/v de cloruro de calcio (para estabilizar la enzima) a temperaturas entre 65 y 80°C durante 20 s cada tiempo; así las amilasas se emplean para remover el almidón de la tela el cual evita la ruptura de las fibras longitudinales de ésta en el proceso de tejido (Canales, Chávez-Hidalgo y Zavaleta, 2014).

En la industria del papel se utilizan estas enzimas para producir almidón ligeramente hidrolizado que se emplea como recubrimiento adhesivo del papel imprenta. Las amilasas modifican el almidón en la producción de papel recubierto para lograr mejor brillo, mejor propiedad de impresión y suavidad en el papel. En los detergentes se encuentra otra aplicación de las amilasas, porque estas contribuyen a mejorar la eficacia de la limpieza gracias a la gran degradación de la mugre y producen un mínimo impacto ambiental por ser biodegradables (Haki y Rakshit, 2003).

CAPÍTULO III

3. DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1 Material Biológico

Los microorganismos presentes en las muestras de tapete, biopelícula y sedimento, de la fuente termal de “El Tragadero” constituyeron el material biológico. Cada una de las bacterias termófilas productoras de enzimas constituyeron la unidad de análisis.

3.2 Lugar de muestreo

La fuente termal El Tragadero se ubica en el distrito de Baños del Inca en la provincia de Cajamarca, dentro del perímetro en el hotel Laguna Seca, carretera Cajamarca - Celendín. La fuente termal está constituida por una poza con forma trapezoidal (Apéndice 1), confinada por un cerco metálico de 1,60 m. de altura con una base de concreto, además el cerco está cubierto por plantas tipo enredaderas. Las coordenadas de geolocalización y de UTM – WGS 84 – ZONA 17 de la fuente termal se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Coordenadas de geolocalización y UTM de las fuentes termales de “El Tragadero”

Parámetro	Coordenadas
Latitud	-7° 9' 53,18”
Longitud	-18° 27' 25,77”

Coordenadas UTM	Medida
Este (m.)	180 849. 315
Norte (m.)	9 207 257.830
Nivel (m.)	2674 .02

3.3 Toma de muestras de la fuente termal El Tragadero

Se tomó 4 muestras de sedimento (compuesta de suelo y agua) empleando una jeringa de 60 mL, 4 muestras de tapetes recolectado con una espátula estéril y 4 muestras de biopelícula de la fuente termal El Tragadero (Apéndice 2); se colectaron en botellas estériles de 250 mL y bolsas con cierre hermético de primer uso de 35 x 25 cm. Las muestras fueron transportadas en un cooler tapizado internamente con papel aluminio para conservar la temperatura en el transcurso del traslado del punto de muestreo hasta el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca para su procesamiento y análisis.

3.4 Características fisicoquímicas de las aguas y sedimentos de la fuente termal El Tragadero

Para la determinación de la concentración de iones en el agua y del sedimento de la fuente termal El Tragadero, se preparó frascos estériles con agua de la fuente y se acidificó a un pH de 3,0 con ácido nítrico 1N; de esta forma se envió a la empresa SGS-Perú quien se encargó del análisis y la caracterización mediante espectrofotometría de absorción atómica.

3.5 Enriquecimiento de bacterias termófilas productoras de amilasas

Bajo condiciones de esterilidad se mezcló todas las muestras según su tipo (sedimento, tapete microbiano y biopelícula), en matraces diferentes se homogenizó por agitación manual constante durante 10 minutos. El medio de enriquecimiento (ME), compuesto por almidón de papa (Anexo 1) (1,0 %), extracto de levadura (1,5 %), NaCl (0,3 %) y agua de la fuente termal para la suplementación con los micronutrientes, se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos. 20 mL de las muestras homogenizadas se

adicionó a 180 mL de ME y luego se incubó por 7 días a 55 °C, en agitador orbital a 100 rpm.

3.6 Aislamiento de bacterias termófilas

Después del proceso de enriquecimiento de cada muestra (sedimento, tapete microbiano y biopelícula), de cada matraz se tomó 1 mL de cultivo y se realizó diluciones hasta 10^{-4} en solución salina fisiológica, a partir de las dos últimas diluciones se sembró por superficie en placas con agar almidón (AA) para aislamiento. Este medio de cultivo (Anexo 2) fue preparado con agua de la fuente termal, esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Los cultivos se incubaron a 55 °C por 24 horas, al término de este tiempo se verificó la pureza de los aislados utilizando coloración gram. Posteriormente, las colonias puras fueron repicadas en viales con agar almidón y se conservaron a 4 °C.

3.7 Determinación cualitativa de la actividad amilolítica

A partir de los cultivos puros aislados se sembró por picadura en AA (Anexo 2), el medio se ajustó a un valor de pH similar al lugar de aislamiento, utilizando soluciones de NaCl 1N y HCl 1M. La siembra se realizó por triplicado, se incubó y analizó a 55 °C por 24, 48 y 72 horas. Al término de la incubación se le adicionó lugol para evidenciar la formación de halos de hidrólisis. Los halos fueron medidos con Vernier en milímetros (mm) y se tomó el promedio de las medidas de halos. Este mismo procedimiento se repitió para todas las bacterias aisladas, y se seleccionó las bacterias con mayor actividad amilolítica evidenciada en los halos de hidrólisis (Fooladi y Sajjadian, 2010).

3.8 Cuantificación de la actividad amilolítica

Las bacterias que presentaron producción significativa ($p < 0.05$) de amilasa, en relación al diámetro del halo de hidrólisis, fueron subcultivadas por duplicado en un medio de producción enzimática que contenía 1 % de peptona, 1% de NaCl, 0,5 % de extracto de levadura y 1 % de almidón a un pH 7, e incubadas en baño de agua a 55 °C con agitación de 150 rpm durante periodos de 24, 48, 72 y 96 h. Después de cada aislado seleccionado, se tomaron 4 mL de medio de producción y se centrifugaron por 20 min a 10000 rpm y 4 °C para obtener el sobrenadante que se utilizó como extracto crudo en el ensayo de la degradación de almidón (1%). Este ensayo consistió en utilizar 100 µL de extracto crudo que se mezcló con una solución de almidón al 1 % preparada en tampón fosfato 0,1 la mezcla final se incubó durante 10 min a 55 °C; esta reacción se detuvo añadiendo 1 ml de HCl 0,1 N, y luego se añadió 100 µl de lugol. La absorbancia del complejo yodo-almidón la medida fue a 620 nm por minuto (Ramesh y Lonsane, 1990) y comparada con los valores realizados previamente para la curva padrón de almidón a concentraciones de 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 y 0,6.

3.9 Identificación molecular de las bacterias termófilas productoras de amilasas

3.9.1 Extracción de ADN

Este procedimiento se realizó mediante el kit (Genomic DNA – Invitrogen) , para ello se tomó de 5 a 6 colonias de un cultivo en fase exponencial de cada bacteria termófila productora de amilasa y se suspendió en 150 µL de agua grado molecular, con esta suspensión procedió a seguir el protocolo (Anexo 3) que es diferenciado para bacterias gram positivas y gram negativas.

3.9.2 Evaluación de la calidad de ADN extraído

Para cuantificar y determinar la calidad del ADN extraído se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para eso se colocó 1 μ L de agua grado molecular en el capilar del equipo con la finalidad de blanquear, acto seguido se procedió con la medición de ADN de las bacterias. Las muestras de ADN fueron agitadas brevemente para su correcta homogenización antes de su medición. Se tomó nota de los valores de las ratios 260/280 y 260/230 y de la concentración de ADN.

3.9.3 Amplificación del gen ARNr 16S

El ADN de cada bacteria se utilizó como templado para amplificar por PCR el gen que codifica para el ARNr 16S utilizando los oligonucleótidos 27F (5´ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3´) y el 1492R (5´ TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3´) (Velázquez, Aragón y Romero, 2008). Para ello se utilizó el kit KOD Hot Start DNA Polymerase, con un volumen total de reacción de 50 μ L. Cada mezcla contuvo 1 μ L de ADN, 5 μ L 10 x KOD buffer de reacción, 10 μ M de cada dNTP's, 2.5 U de ADN polimerasa y 1 μ M de cada oligonucleótido, completando el volumen con agua grado molecular. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min en 30 ciclos; una segunda desnaturalización a 94 °C por 1 min; una hibridación a 55 °C por 1 min; extensión: 72 °C por 2 min; 30 ciclos, y extensión final a 72 °C por 7 min.

3.9.4 Electroforesis

Se preparó gel de agarosa al 1 %. Para ello se pesó 0,5 g de agarosa y se suspendió en 50 mL de solución buffer TBE, esto se mezcló y se llevó al microondas por 90 s para disolver la agarosa completamente.

A todo ello se agregó 5 μ L de SYBR Safe (Invitrogen) y se mezcló antes de verter el contenido en el molde evitando la formación de burbujas; luego se colocó los peines adecuados y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta gelificar. Posteriormente los peines fueron retirados y el gel se colocó en la cubeta de electroforesis conteniendo TBE necesario para cubrir el gel, se colocó 5 μ L del marcador de peso molecular en el primer carril (el marcador a utilizar fue de 100 bp DNA Ladder de Life Technologies Invitrogen). Los demás carriles fueron utilizados para incorporar los productos de PCR, para ello se mezcló 4 μ L de ADN más μ L de loading buffer. Estas mezclas fueron homogenizadas y sembradas en los respectivos carriles. Se utilizó la fuente de poder PowerPac Basic Power Supply de Bio Rad y se corrió a 100 voltios por 30 minutos. Al finalizar la corrida se retiró el molde con el gel y se observó en un transiluminador con luz UV (Visible Blue transiluminador), las bandas correspondientes al gen (Padilla *et al.*, 2011).

3.9.5 Secuenciamiento y análisis bioinformático.

Se envió 25 μ L de producto de PCR del gen 16s RNAr de cada bacteria para su secuenciamiento a Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron evaluadas y editadas en el programa Chromas versión 2,6,6 para obtener la secuencia consenso, luego mediante un análisis BLASTn utilizando las bases de datos del Genbank (NCBI), se determinó su porcentaje de similitud con las especies

bacterianas más cercanas para cada uno de los aislados. Las secuencias del gen 16S ARNr de las especies cercanas con porcentajes de similitud mayor a 99 % fueron recuperadas de la base de datos de nucleótidos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) e incorporadas en un archivo multi-FASTA junto con las secuencias query (secuencias obtenidas en este estudio); todas las secuencias se alinearon y editaron con el programa AliView. Finalmente, para establecer las relaciones filogenéticas y la construcción del árbol filogenético se empleó el programa bioinformático MEGA v. 10,2 con el método Neighbord joining y 1000 bootstrapp.

3.10 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 25.0. Se corroboró la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro – Wilk, posteriormente se aplicó la prueba de Kruskal – Wallis. Se trabajó con un nivel de significancia $p \leq 0,05$.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis fisicoquímico de la fuente termal El Tragadero

La fuente termal El tragadero tiene una temperatura aproximada de 70,7 °C y una conductividad eléctrica de 681 $\mu\text{S}/\text{cm}$ con un pH de 7,5. El análisis químico del agua y sedimento (agua intersticial) nos muestra diferentes concentraciones de elementos metales, metaloides y de no metales mayoritarios que se muestran en la tabla 3; Ca, Si, Fe y Al los que predominan en el agua termal, en el análisis del sedimento predominó Si, Al, Mg y Fe datos que se asemejan a lo descrito en un estudio donde se analizó la hidrogeología de las fuentes termales de Cajamarca (Los Perolitos y el Tragadero) (Peña, Sima y Baratoux, 2007)

Tabla 3. Parámetros químicos metales, metaloides y no metales mayoritarios (mMol/L) medidos en muestras de agua y sedimento (agua intersticial) de la fuente termal El Tragadero.

METALES TOTALES	Concentración en Agua (mMOL/L)	Concentración en Sedimento (mMOL/L)
Aluminio	$9,9 \times 10^{-1}$	$27,9 \times 10^{-1}$
Hierro	$13,3 \times 10^{-1}$	$9,2 \times 10^{-1}$
Zinc	$3,9 \times 10^{-3}$	$19,7 \times 10^{-3}$
Manganeso	$6,2 \times 10^{-2}$	$10,1 \times 10^{-2}$
Magnesio	$3,1 \times 10^{-1}$	$16,5 \times 10^{-1}$
Sodio	$6,7 \times 10^{-1}$	$4,5 \times 10^{-1}$
Silicio	$17,2 \times 10^{-1}$	$38,5 \times 10^{-1}$
Potasio	$1,2 \times 10^{-1}$	$5,4 \times 10^{-1}$
Fosforo	$7,5 \times 10^{-2}$	$11,3 \times 10^{-3}$
Calcio	$26,1 \times 10^{-1}$	$18,1 \times 10^{-1}$
Azufre	$6,9 \times 10^{-1}$	-
Nitrógeno	$2,1 \times 10^{-2}$	-

4.2. Caracterización microbiológica de los aislados bacterianos

Se logró aislar 20 bacterias nativas con características morfológicas diferentes de la fuente termal El Tragadero, estas fueron codificadas con la letra en mayúscula “T” seguida de un número y una letra “A” final (Tabla 4); la caracterización microbiológica de los aislados bacterianos se realizó en un cultivo puro con agar nutritivo y en éste se analizó características macroscópicas como el color de la colonia en el cual predominó el color crema frente al blanco y el amarillo; en la forma de la colonia hubo una variedad de estas entre irregulares, puntiformes y rizoides en cuanto al borde la mayoría presenta un borde ondulado; también se registró características microscópicas a 100x y con aceite de inmersión con ayuda de coloraciones gram y wirtz, los 20 aislados son bacilos gram positivos; en cuanto a la formación de endoesporas todos los aislados revelaron esta formación en distintas ubicaciones dentro de la célula vegetativa.

Tabla 4. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias aisladas de la fuente termal El Tragadero.

CÓDIGO	TIPO DE MUESTRA	COLOR	FORMA	BORDE
T6A	Biopelícula	Crema	Irregular	Ondulado
T26A	Sedimento	Blanco	Puntiforme	Regular
T30A	Biopelícula	Blanco	Irregular	Ondulado
T31A	Biopelícula	Amarillo	Irregular	Ondulado
T33A	Tapete	Blanco	Rizoide	Filamentosa
T36A	Tapete	Crema	Irregular	Ondulado
T38A	Biopelícula	Blanco	Puntiforme	Regular
T42A	Sedimento	Crema	Puntiforme	Regular
T43A	Tapete	Blanco	Puntiforme	Regular
T56A	Tapete	Crema	Irregular	Filamentosa
T58A	Biopelícula	Crema	Irregular	Ondulado
T60A	Biopelícula	Crema	Irregular	Ondulado
T61A	Biopelícula	Crema	Irregular	Ondulado

T62A	Biopelícula	Crema	Irregular	Ondulado
T701A	Sedimento	Crema	Irregular	Ondulado
T702A	Sedimento	Crema	Puntiforme	Ondulado
T75A	Tapete	Crema	Irregular	Ondulado
T81A	Sedimento	Amarillo	Puntiforme	Regular
T88A	Tapete	Crema	Irregular	Ondulado
T89A	Tapete	Crema	Irregular	Ondulado

Los resultados de la tabla 4 evidencian la diversidad de cepas bacterianas termófilas de interés; un aspecto muy importante de destacar es el tipo de muestra en el que se encontró la mayor cantidad de aislados que fueron los tapetes microbianos los cuales son ecosistemas muy complejos con una gran variedad de nutrientes que permiten el desarrollo integral de diversos microorganismos de distintos tipo: fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimioautótrofos y heterótrofos (Brito, 2019); además, estos destacan por su gran resistencia y adaptación a lugares extremos como es la fuente termal El Tragadero. Otra característica que tiene esta fuente termal es que presenta muchas fluctuaciones diarias y estacionales en diversas variables fisicoquímicas frente a ello los microorganismos deben adaptarse frecuentemente a los cambios de su ambiente, este dato también nos ayuda a comprender por qué predominan los microorganismos que forman endosporas, que fueron evidenciadas mediante la coloración wirtz, donde también se puede observar la ubicación (termales, subterminales y centrales) propias de la mayoría de aislados.

La presencia de bacterias todas gram positivas en forma de bacilos que según estudios serían más resistentes al calor (Madigan *et al.*, 2015) y los géneros identificados más representativos son: *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus* y *Clostridium*.(De La Rosa y Mosso, 2016).

4.3. Evaluación cualitativa de la actividad amilolítica de los aislados bacterianos.

En la figura 1 podemos observar las medidas en mm de los halos de hidrólisis que produjo cada aislado bacteriano, producido a una temperatura de 55 °C en agar almidón durante 24, 48 y 72 horas. Los aislamientos que destacan fueron: T26A, T33A, T56A, T58A, T75A y T81A (Apéndice 3) con diámetros de halos mayores a 10,5 mm, siendo el aislado T33A el que obtuvo mayor halo de hidrólisis de 18,5 mm en 72 h. De todos los evaluados se seleccionaron 6 aislados bacterianos que destacaron en el diámetro de halo de hidrólisis de almidón para la evaluación cuantitativa de la actividad amilolítica (porcentaje de almidón hidrolizado).

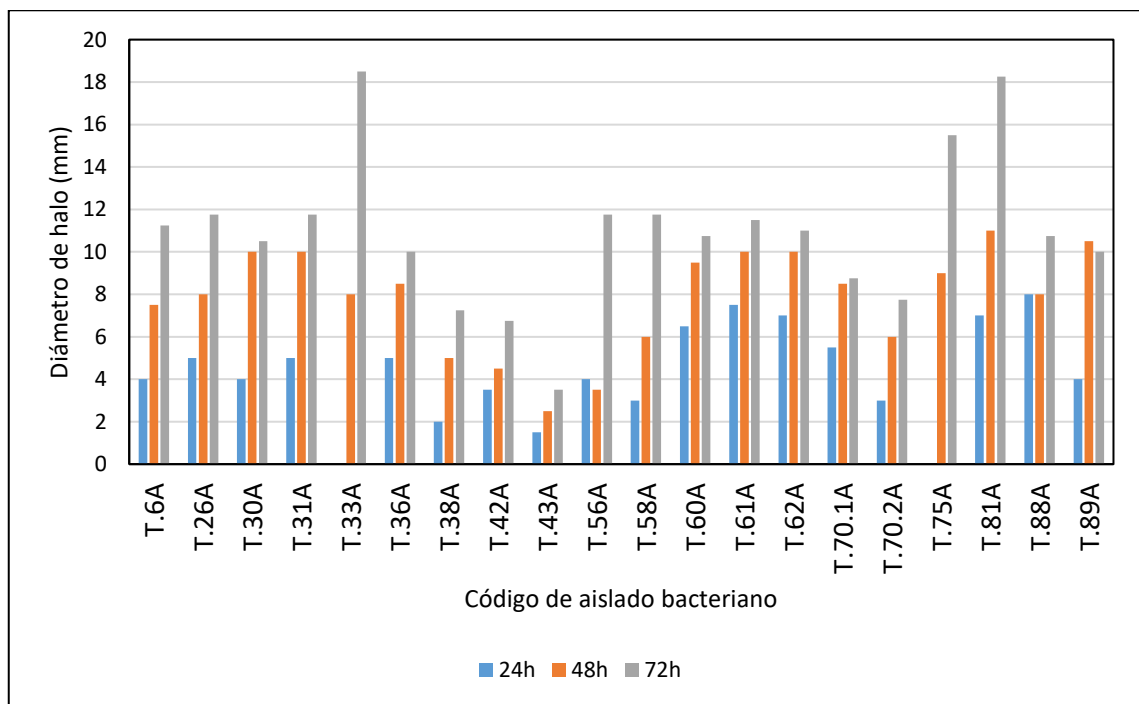


Figura 1. Variación del diámetro del halo de hidrólisis de almidón en 24, 48 y 72 horas en cada aislado bacteriano de la fuente Termal El Tragadero.

4.4. Ampliación del gen 16S ARNr

En la figura 2 se observa las bandas del gen 16S ARNr amplificado para los 20 aislados con esto podemos confirmar que todos pertenecen al dominio Bacteria.

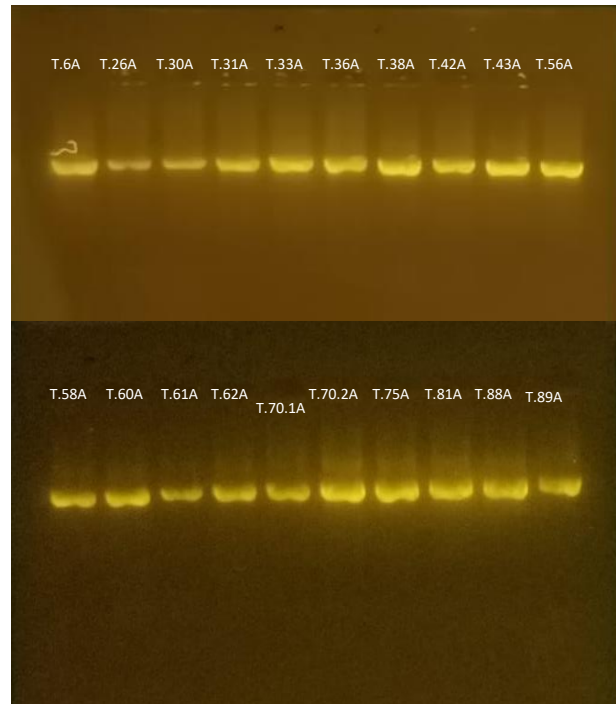


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del gen 16S ARNr. Se usó los primers universales 27F y 1492R.

Los resultados obtenidos mediante el alineamiento local de las secuencias consenso del gen 16S ARNr de los 20 aislados de este estudio se realizaron en el programa informático BLASTn, previa edición de las mismas en los programas Chromas y ALIVIEW. Se encontró que la mayoría de los aislados pertenecen género *Bacillus* y en menor frecuencia se obtuvo los géneros *Caldibacillus* y *Anoxybacillus* (Tabla 5). Los aislados T6A, T31A, T36A, T56A, T61A, T62A, T701A, T702A, T88A y T89A presentan secuencias 16S ARNr homólogas a la especie *Bacillus licheniformis* con un porcentaje similitud entre 98 % y 100 % siendo esta la especie con mayor frecuencia en el estudio; los aislados T26A, T38A, T42A y T43A presentan secuencias 16S

ARNr homólogas al género *Caldibacillus* spp. y los aislados T30A y T60A al género *Bacillus* spp; los aislados T33A y T75A presentan secuencias 16S ARNr homólogas a la especie *Bacillus subtilis* con un porcentaje de similitud de 100 %; los aislados T58A y T81A presentan secuencias 16S ARNr homologas a la especie *Bacillus haynesii* y al género *Anoxybacillus* respectivamente.

Tabla 5. Identificación de secuencias consenso analizadas con el programa informático BLASTn del NCBI

CÓDIGO	POSIBLE ESPECIE BACTERIANA	PORCENTAJE DE SIMILITUD	COBERTURA (%)	Nº DE ACCESO GENBANK
T6A	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	99,2	MW148421.1
T26A	<i>Caldibacillus spp.</i>	100	99,65	OM142594.1
T30A	<i>Bacillus</i> spp.	100	99,80	MT505503.1
T31A	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	97,36	KP216574.1
T33A	<i>Bacillus subtilis</i>	100	99,93	MT538531.1
T36A	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	100	ON527736.1
T38A	<i>Caldibacillus spp.</i>	99	99,35	OM142594.1
T42A	<i>Caldibacillus spp.</i>	99	99,35	OM142594.1
T43A	<i>Caldibacillus spp.</i>	100	99,43	OM142594.1
T56A	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	94,99	MW148421.1

T58A	<i>Bacillus haynesii</i>	98	99,49	MK467540.1
T60A	<i>Bacillus</i> spp.	100	99,82	KX815280.1
T61A	<i>Bacillus licheniformis</i>	98	99,69	MT032332.1
T62A	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	99,86	JN366781.1
T701A	<i>Bacillus licheniformis</i>	98	99,64	MN410531.1
T702A	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	99,41	MK515041.1
T75A	<i>Bacillus subtilis</i>	100	99,79	KU862331.1
T81A	<i>Anoxybacillus</i> spp.	100	99,86	EU621360.1
T88A	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	99,93	KP216575.1
T89A	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	99,71	JN366781.1

En la figura 3 se muestra la relación filogenética de algunos de los aislados analizados en esta investigación con diversas secuencias obtenidas de la base de datos de genes, (GenBank); a través de un árbol filogenético construido con el método de Neighbor joining. Todas estas pertenecen a la familia *Bacillaceae* al género *Bacillus*; el valor bootstrap del análisis fue de 1000 réplicas, la barra de 0.005 representa el 0,5 % de la divergencia entre especies. En la figura 4 se encuentra el árbol filogenético con las posiciones de los aislados y secuencias del GenBank pertenecientes al género *Caldibacillus*; el valor bootstrap también fue de 1000 réplicas y la barra de 0.02 representa el 2 % de divergencia entre especies. Por último, en la figura 5, la relación filogenética del aislado T81A perteneciente al género *Anoxybacillus*; el valor bootstrap fue de 1000 réplicas y la barra de 0.0002 representa el 0,02 % de divergencia entre especies relacionadas.

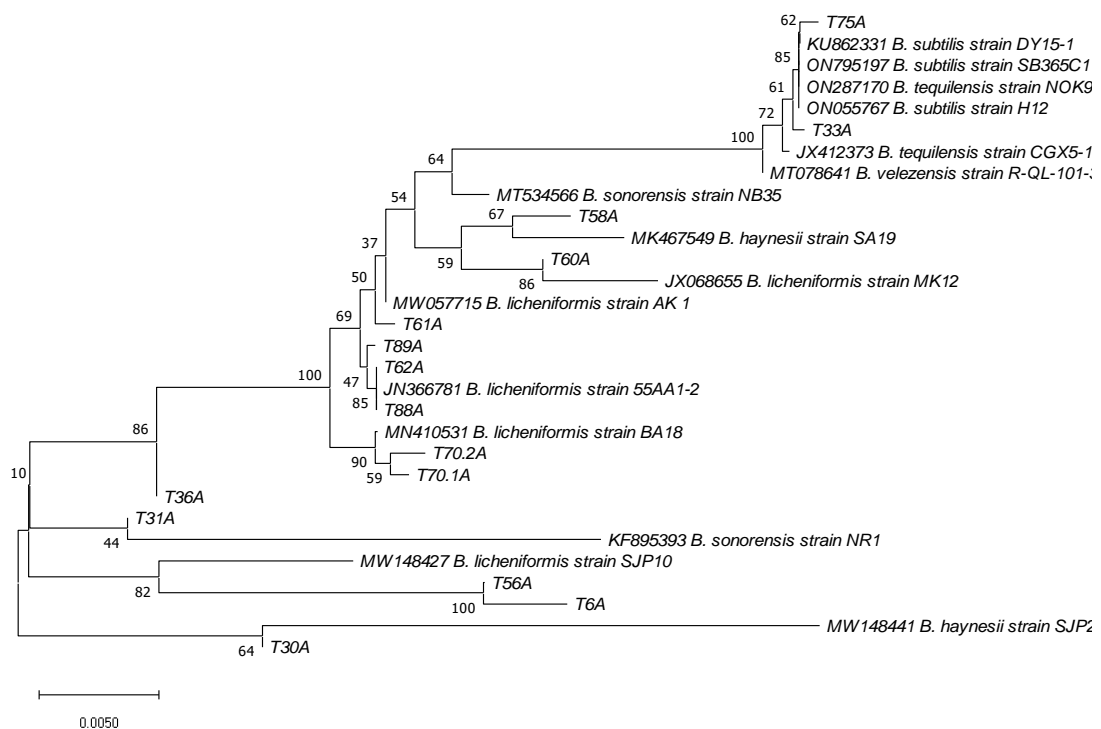


Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias 16S ARNr de los aislados en estudio comparados con secuencias del GenBank pertenecientes al género *Bacillus*.

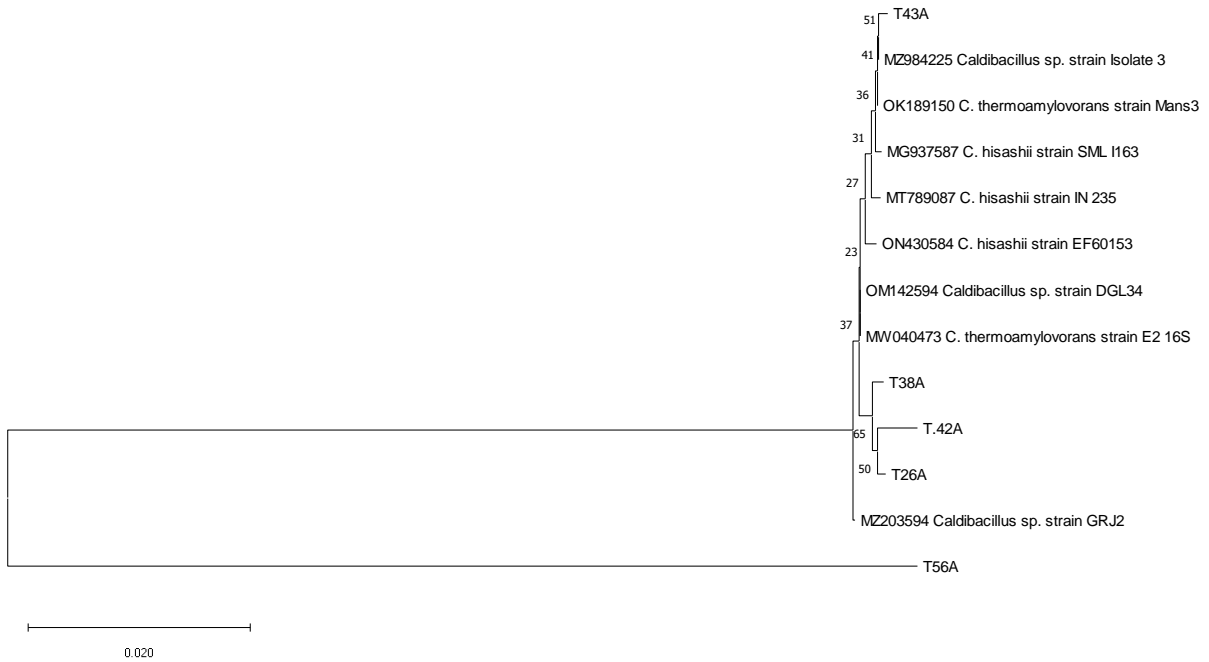


Figura 4. Árbol filogenético de las secuencias 16S ARNr de los aislamientos en estudio comparados con secuencias del GenBank pertenecientes al género *Caldibacillus*.

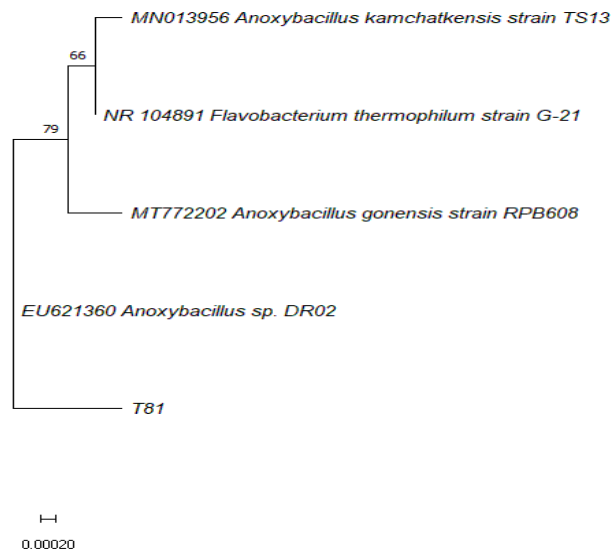
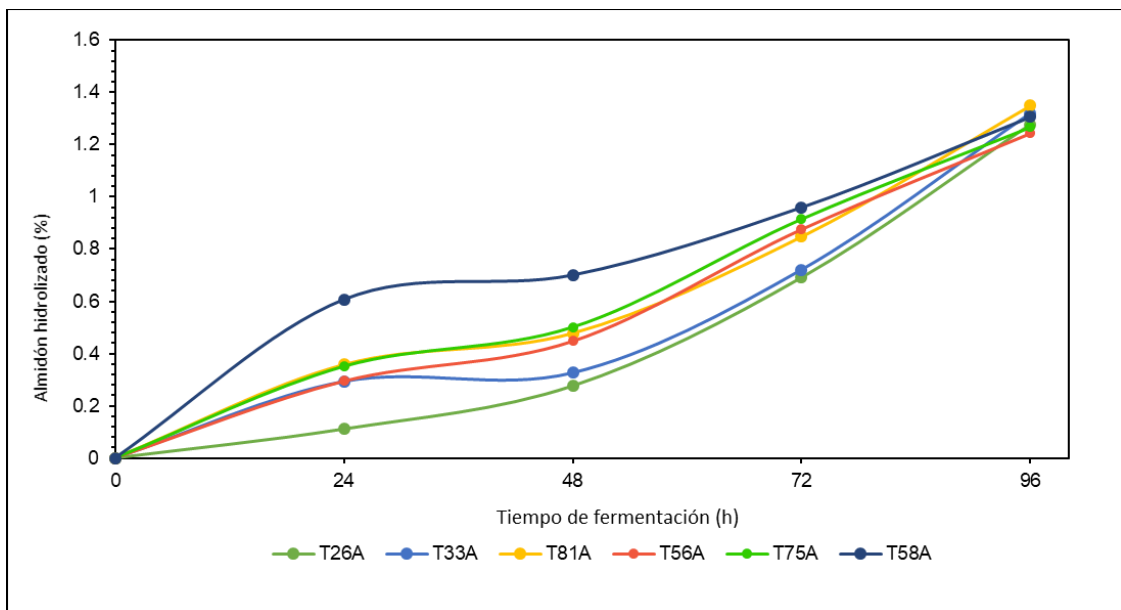


Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias 16S ARNr de los aislados en estudio comparados con secuencias del GenBank pertenecientes al género *Anoxybacillus*.

4.5. Cuantificación de la actividad amilolítica

La producción de la amilasa fue cuantificada mediante el porcentaje de almidón hidrolizado en los 6 aislados bacterianos con mayor diámetro de halo de hidrólisis (T26A *Caldibacillus* spp, T33A *Bacillus subtilis*, T56A *Bacillus licheniformis*, T58A *Bacillus haynesii*, T75A *Bacillus subtilis* y T81A *Anoxybacillus* spp); para esta determinación se utilizó un medio que contiene como sustrato principal almidón al 1 % que fue evaluado en intervalos de tiempo de 24 h, obteniendo el almidón completamente hidrolizado a las 96 h a una temperatura de 55 °C; al realizar evaluación la estadístico se concluyó que no existe diferencia significativa con respecto al porcentaje de almidón hidrolizado y los tiempos de evaluación entre los aislamientos evaluados (Figura 6).

Figura 6. Porcentaje de almidón hidrolizado y tiempo de fermentación.



4.6. Discusión

El análisis fisicoquímico de agua y sedimento de la fuente termal El Tragadero (Tabla 3) muestra las concentraciones de metales, metaloides y de no metales mayoritarios, las cuales varían en agua y sedimento; los resultados en el agua, nos indican que estamos frente a unas aguas duras (Rodríguez, 2010). Posiblemente la razón de que las concentraciones de metales sea alta radique en el origen mismo de la fuente termal, ya que se ha reportado que las fuentes termales en la zona norte del Perú se forman por procesos de subducción en capas más profundas (Instituto Geológico Minero Metalúrgico, 2000), por lo que en el trayecto de ascenso hacia la superficie lleva consigo una carga importante de estos metales, además de que la temperatura del agua favorece la disolución de estos metales en elementos iónicos en el trayecto de ascenso y en la superficie (Peña y Severyn, 2008).

Algunos factores de esta fuente termal como la temperatura y la alta carga iónica favorecen el desarrollo de ciertas bacterias y en ciertos casos potencia la actividad enzimática ya que algunos metales, como los cationes divalentes del calcio, magnesio, manganeso, pueden servir como cofactores enzimáticos para evitar la desnaturalización de sus ácidos nucleicos y proteínas, ya que se encuentran en ambientes con temperaturas elevada (Stetter, 1999); esto nos permitió utilizar el agua de la fuente en la preparación de los medios de cultivo que se usaron para analizar el crecimiento y la producción de los diferentes aislados bacterianos; la presencia de minerales en el agua sería un factor para el crecimiento y desarrollo de microorganismos en ambientes extremos (Sinisterra, 2012).

La presencia de calcio tiene gran importancia en la producción de amilasas ya que induce, estabiliza y acelera la expresión de ésta; se conoce que la suplementación de iones metálicos en el medio de fermentación promueve el crecimiento microbiano, que a su vez acelera la producción de enzimas. Se sabe que la mayoría de las α -amilasas son dependientes de metales para iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} , la suplementación con Ca^{2+} generalmente se requiere para un aumento en la producción de α -amilasa por varias bacterias; sin embargo, algunos iones metálicos podrían tener un impacto negativo sobre los microbios en la producción de α -amilasa, por ejemplo, Li^{2+} y Hg^{2+} tienen efectos negativos sobre la producción de α -amilasa (Pandey, Negi y Soccol, 2016).

Las muestras estudiadas de la fuente termal El Tragadero corresponden a biopelículas, tapete y sedimentos, ambientes con escasa formación de oxígeno debido a las altas temperaturas, en ese sentido los microorganismos deben adaptarse para desarrollarse adecuadamente (Stetter, 1999); el 40 % de las bacterias fueron aisladas de biopelículas, que son agrupaciones microbianas localizadas en la superficie y que necesitan de oxígeno para poder desarrollarse (Spormann *et al.*, 2004), esto podría deberse a que la estructura del biopelículas proporciona una mejor protección frente al estrés físico, químico y biológico (Spormann *et al.*, 2004).

Las asociaciones microbianas pueden conformar de una manera más estable la formación de tapetes microbianos, en donde las condiciones ambientales pueden variar en relación al entorno, debido a la presencia de oxígeno producido por cianobacterias promoviendo una mayor diversidad microbiana (Chacon-Baca *et al.*, 2015). Los sedimentos, debido a su escasa concentración de oxígeno promoverán un ambiente anóxico donde las bacterias anaeróbicas y aerobias facultativas se desarrollan. Los resultados de los aislados

bacterianos indicados en la tabla 4 y 5 muestran que todas son bacterias gram positivas y formadoras de endosporas. Fisiológicamente se entiende que este tipo de bacterias sobrevivan a altas temperaturas por contar con endosporas, además de un suministro constante de elementos iónicos de la fuente termal como el Mg^{+2} y Ca^{+2} que brindarían estabilidad a las membranas celulares (Brock, 2016); sin embargo, su predominio puede deberse a que con el tiempo han llegado a establecerse en diferentes estratos de la fuente termal a partir de la formación de biopelículas, tapetes microbianos y sedimentos y que también tengan genes responsables de la síntesis de enzimas relacionadas con la degradación del almidón, esto podría ser importante para su recuperación en relación a otros grupos bacterianos que no tengan estas enzimas, por ese motivo se observó mayor predominio en el aislamiento de este tipo de bacterias al degradar sustratos complejos como el almidón.

En la figura 1 se observa que 20 bacterias hidrolizaron el almidón en un rango de tiempo de 24 a 72 horas. La proporcionalidad en la hidrólisis de almidón en los tiempos de evaluación planteados, se debe a la constante producción de enzimas amilasas, considerada como un metabolito primario inherente al crecimiento microbiano, por ese motivo al obtener halos de hidrólisis de almidón cada vez de mayor medida se conoce intrínsecamente su capacidad enzimática amilolítica. Dentro del análisis de esta evaluación se llegó a seleccionar 6 aislados bacterianos, cuyas mediciones del diámetro de halos de hidrólisis presentaron diferencias significativas en relación al resto ($p \leq 0,05$) (Apéndice 5). La capacidad enzimática amilolítica depende de sus características genotípicas y fisiológicas. Las primeras se refieren a la presencia de genes que sintetizan amilasas, como las alfa-amilasas, beta amilasas, glucoamilasas, pullulasas, alfa-glucosidasa y ciclodextringlicosiltransferasa (Gupta *et al.*, 2003) y en ese sentido, las

bacterias gram positivas esporuladas son productoras de estas enzimas. Las segundas, tratan de explicar el funcionamiento de las amilasas a partir de su relación con la temperatura y pH, que al ser óptimos ayudan a mejorar la velocidad específica de la reacción enzimática. Según un estudio en un ambiente similar se reportó condiciones óptimas de temperaturas de 58,6 °C y pH de 6,7 en bacterias productoras de amilasas del campo geotermal de Candarave en Tacna – Perú (Ferrer 2016). Desde esa perspectiva, se debe precisar que la presente evaluación realizada a 55 °C y a un pH de 7, mostró un espectro interesante de hidrólisis de almidón.

En la identificación de los 20 aislamientos bacterianos (Tabla 5), el género *Bacillus* representa el 75 % de los aislados; de los cuales T30A y T60A solo se identificaron como *Bacillus spp.* según el análisis de los resultados obtenidos mediante el alineamiento local de las secuencias consenso del gen 16S ARNr; las colonias presentaron morfologías muy similares de color crema, forma irregular y borde ondulado; el diámetro promedio del halo de hidrólisis a 55 °C por 72 h fue de 10,6 mm; este género es uno de los más representativos entre las bacterias termófilas y también existen muchos reportes del análisis de las condiciones para la producción de amilasas (De Souza y Leal, 2000) (Zavaleta, Díaz y Vega, 2018). Una de las especies que se identificó fue *Bacillus subtilis* (T33A y T75A), cuyas colonias presentaron morfología muy similares, de color blanco, forma rizoide y borde filamentoso; el diámetro promedio de hidrólisis a 55 °C por 72 h fue de 17 mm, uno de mayores diámetro de halo; esta especie es reportada como productora de α -amilasas (Yan y Wu, 2017); así mismo, se ha investigado los medios y las condiciones adecuadas para mejorar la producción y purificación de ésta (Raul *et al.*, 2014).

Otros aislados encontrados pertenecen a la especie *B. licheniformis* (T6A, T31A, T36A, T56A, T61A, T62A, T701A, T702A, T88A y T89A) cuyas colonias presentaron morfologías muy similares, color crema, forma irregular y borde ondulado; el diámetro promedio del halo de hidrólisis a 55 °C por 72 h fue de 10,45 mm; según estudios esta especie produce α -amilasas (Ferrer et al., 2015). La producción de amilasa por *B. licheniformis* es respaldada por diversas investigaciones como el estudio realizado en Jordania en donde se aisló esta bacteria de aguas termales y se demostró su capacidad para producir diversas enzimas termoestables incluyendo amilasas (Mohammad A. Khiyami, 2012). Otro estudio analiza la producción de amilasa por *B. licheniformis* con sustrato de almidón comercial y almidón químicamente puro (Zeña y Lleque, 2015). Entre las bacterias, *Bacillus spp.* es ampliamente utilizada para la producción de α -amilasa termoestable para satisfacer las necesidades industriales. Se conoce que *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* son buenos productores de α -amilasa y se han utilizado ampliamente en la producción comercial de la enzima para diversas aplicaciones (Srivastava et al., 2015).

Otro aislado identificado como *B. haynesii* (T58A) presentó colonias de color crema, forma irregular y borde ondulado; el diámetro promedio del halo de hidrólisis a 55 °C por 72 h fue de 11,8 mm, esta especie es muy utilizada ya que produce biofilms y pigmentos que ayudarían como antioxidantes (Romero y Banerjee, 2022), además es reconocida por producir lipasas aunque otro estudio la reportó como negativo en cuanto a la producción de amilasas (Parsai et al., 2020); asimismo, no se logró encontrar reportes de actividad amilolítica de esta especie en fuentes termales de Perú y en América, por tal motivo se consideraría un hallazgo novedoso e importante que podría profundizarse en futuros estudios.

Un 20 % de aislamientos bacterianos pertenecieron al género *Caldibacillus* (T26A, T38A, T42A, T43A) con características culturales como color blanco, puntiforme, borde regular y un halo de hidrólisis promedio a 55 °C por 72 h de 7,3 mm, la degradación del almidón fue baja en relación a los otros aislados; no se encontró reportes de este género en la producción de amilasas; pero si formando parte de consorcio microbiano con actividad celulítica (Silva y Setubal, 2017); también se encontró que ciertas especies presentan actividad lipolítica (Mora-González *et al.*, 2020), de allí que el presente estudio sería el primero en identificar a este género como productor de amilasas y nos abre así un abanico de investigaciones futuras.

Con un 5 %, el género *Anoxybacillus* (T81A) presentó colonias de color amarillo, puntiforme y borde regular, el diámetro promedio del halo de hidrólisis a 55°C por 72h fue de 18,3 mm; aunque hay reportes de la presencia de este género en fuentes termales (Khalil *et al.*, 2017), no hay estudios como productor de amilasas; de acuerdo a los resultados obtenidos, este sería es uno de los géneros que produce mayor halo de hidrólisis, es así que la fuente termal El Tragadero alberga géneros y especies de bacterias termófilas que podrían ser explotadas por su capacidad amilolítica.

Por otro lado también se evaluó la producción de la amilasa mediante la evaluación del porcentaje de almidón hidrolizado en los 6 aislamientos bacterianos con mayor diámetro de halo de hidrólisis (T26A *Caldibacillus* spp, T33A *Bacillus subtilis*, T56A *Bacillus licheniformis*, T58A *Bacillus haynesii*, T75A *Bacillus subtilis* y T81A *Anoxybacillus*) (Figura 6), para esta determinación se utilizó un medio que contuvo como sustrato principal almidón al 1 % en tiempos de 24, 48, 72 y 96 h y se demostró la capacidad que presentan las bacterias para hidrolizar el almidón en un proceso de fermentación líquida,

también se encontró que a las 96 h se hidrolizó todo el almidón; al relacionar el porcentaje de almidón hidrolizado y los tiempos de fermentación en estos 6 aislamientos no se observó diferencias significativas ($p > 0,05$) (Apéndice 5), por lo que podemos afirmar que todas estas bacterias pueden hidrolizar el almidón de manera similar.

Con las secuencias del gen 16S ARNr de los 20 aislados se realizó el análisis de las relaciones filogenéticas de cada uno de ellos y se encontró que estos se encuentran divididos en tres géneros, todos pertenecientes a la familia *Bacillaceae*. Las bacterias que se identificaron con el género *Bacillus*; se reagruparon entre varias especies con un 0,5 % de divergencia entre especies (Figura 3); los aislamientos T75A y T33A se ubicaron entre las especies *Bacillus subtilis*, dato que ratificaría su identificación, con el análisis BLASTn, sí también T58A se encuentra evolutivamente muy cerca a *B. haynesii* SA19 (Código Gen Bank MK467540.1).

En la figura 4 se encuentra el árbol filogenético con la distribución de los aislados de este estudio y las secuencias del GenBank que las agrupan con el género *Caldibacillus*; con un 2 % de divergencia entre especies. Los aislamientos T26A, T38A, T42A, T43 se encuentran claramente ubicadas en el clado perteneciente a especies del género *Caldibacillus*, y se confirma su divergencia en cuanto a los otros aislamientos ya que el aislado T56A (figura 3) pertenece al clado de la especie *B. licheniformis* que queda fuera de los grupos formados (outgroup). Se sabe que *Caldibacillus*, a partir de mayo de 2020, contiene un total de 6 especies con nombres válidamente publicados, este género se identificó como un clado monofilético y no relacionado filogenéticamente con otras

especies de *Bacillus* en estudios que examinaron las relaciones taxonómicas dentro de *Bacillus* (Gupta *et al.*, 2020) .

Por último, en la figura 5, la relación filogenética del aislado T81A agrupado con el género *Anoxybacillus*; presenta pequeños valores de un 0,02% de divergencia con las especies comparadas. El aislado T81A no solo tiene una relación evolutiva con el clado del género *Anoxybacillus* sino que se confirma su identificación mediante el análisis BLASTn realizado previamente.

Por todo lo mencionado, la fuente termal El Tragadero es un ambiente que tiene las condiciones para el crecimiento y desarrollo de diversas bacterias con potencial en cuanto a la producción de enzimas termoestable como la amilasa, que representa una gran oportunidad para futuros estudios complementarios en diversas áreas y procesos industriales que permitan aprovechar el enorme potencial biotecnológicos de esta fuente termal.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES

- Se logró obtener 20 aislados bacterianos termófilos que producen amilasas de la fuente termal El tragadero.
- El análisis del gen 16S ARNr mostró que del total de aislados el 50 % de ellos son *Bacillus licheniformis*, 20 % son especies del género *Caldibacillus*, 10 % clasificaron como *Bacillus* spp., 10 % como *Bacillus subtilis*, uno es *Bacillus haynesii* y el último es *Anoxybacillus* spp.
- En la evaluación de hidrólisis en placa los aislados T26A, T33A, T56A, T58A, T75A y T81A mostraron halos de hidrólisis de almidón significativamente mayores al resto a las 72 h de evaluación.
- A las 96h hidrolizaron completamente el almidón. El análisis estadístico demostró que todas estas bacterias presentan capacidades similares en la producción de amilasas.
- La fuente termal El Tragadero es un ambiente con mucha diversidad microbiológica y el agua con presencia de iones de Calcio, Silicio, Hierro y Aluminio que participan con la producción de amilasas termoestables en estos aislados.

6. RECOMENDACIONES

Las principales recomendaciones para futuras investigaciones:

- Continuar la línea de investigación en bacterias termófilas con potencial en producción de amilasas en la fuente termal El Tragadero.
- Probar con mayor temperatura la evaluación de hidrólisis del almidón.
- Producir, purificar e identificar el tipo de amilasa.
- Considerar el uso de otros marcadores moleculares para la identificación de los aislamientos, debido a que solo se pudo identificar hasta género en algunos casos.

LISTA DE REFERENCIAS

- Ali, S. et al. (2018) Aplicación de métodos de cultivo no convencionales para el aislamiento e identificación de bacterias halófilas y termófilas de ambientes extremos. Pontificia Universidad Javeriana. doi: 10.1051/mateconf/201712107005.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1995) 'Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation', *Microbiological reviews*, 59(1), pp. 143–169. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535888>.
- Andrade, C. M. M. C., Pereira, N. and Antranikian, G. (1999) 'Extremely thermophilic microorganisms and their polymerhydrolytic enzymes', *Revista de Microbiologia*, 30(4), pp. 287–298. doi: 10.1590/S0001-37141999000400001.
- Arias Factos, J. E. (2018) Aislamiento e identificación de bacterias termófilas de la fuente geotermal Papallacta. Available at: <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10618%0Ahttp://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/11850>.
- Bernal Bustos, C. R. et al. (2017) 'Hidrólisis enzimática de almidón', *Revista de Investigación*, 10(1), pp. 129–140. doi: 10.29097/2011-639x.70.
- Borja, J., Zavaleta, A. and Izaguirre, V. (2012) 'Bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas aisladas de aguas termales de tarapoto - peru', 15(2), pp. 66–70.
- Brito, D. (2019) "Importancia de los tapetes microbianos en ambientes extremos y propuesta de lineamientos para su conservación en México". Universidad Autónoma De Baja California.
- Brock, T. D. (2016) 'Life at High Temperatures', 1019(May), pp. 1012–1019. doi: 10.1126/science.230.4722.132.
- Canales, P. E., Chávez-Hidalgo, E. L. and Zavaleta, A. I. (2014) Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín Characterization of halophilic bacteria producing amylase isolated from San Blas Salterns in Junin, *Rev. Colomb. Biotecnol.* Diciembre.

- Carolina, R. (2006) Aislamiento y caracterización de microorganismos termófilos anaerobios lipolíticos, proteicos y amilolíticos de manantiales termominerales de Paipa e Iza (Bocaya). Pontificia Universidad Javeriana.
- Carrera, J. E. (2003) 'Producción Y Aplicación De Enzimas Industriales', Facultad de Ciencias Agropecuarias, 1(1), pp. 9–15.
- Chacon-Baca, E. et al. (2015) 'Tapetes microbianos recientes en el Manantial hidrotermal de Baño San Ignacio, Linares y Nuevo León', Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana. México, 64, pp. 387–400.
- Das, R. and Kayastha, A. M. (2019) ' β -Amylase: General Properties, Mechanism and Panorama of Applications by Immobilization on Nano-Structures BT - Biocatalysis: Enzymatic Basics and Applications', in Husain, Q. and Ullah, M. F. (eds). Cham: Springer International Publishing, pp. 17–38. doi: 10.1007/978-3-030-25023-2_2.
- Demirjian, D., Morís-Varas, F. and Cassidy, C. (2001) 'Enzymes from extremophiles', Current Opinion in Chemical Biology, 5(2), pp. 144–151. doi: 10.1016/S1367-5931(00)00183-6.
- Espitia Rocha, L. C. (2009) 'Determinación de la concentración de alfa y beta amilasas comerciales en la producción de etanol a partir almidón de cebada empleando', Javerianaeducó, pp. 1–114. Available at: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis206.pdf>.
- Fallis, A. . (2013) 'Identificación y determinación la actividad amilolítica de 3 cepas bacterianas formadoras de esporas aisladas de los suelos del bosque protector "Mindonambillo" utilizando tres fuentes distintas de almidón como sustrato.', Journal of Chemical Information and Modeling, 53(9), pp. 1689–1699. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Feraudy, W. T. (2011) Determinación de las actividades amilolíticas y proteolíticas en cultivos en batch de bacterias anaerobias extremófilas aisladas de muestras clectadas en la región altiplánica de Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés.
- Ferrer, C. et al. (2015) 'Caracterización de la enzima amilasa de la bacteria termófila Bacillus licheniformis BA-3 aislada de los Géiseres de Candarave (Tacna-Perú)', pp. 65–70.

Ferreras, E. (2011) Expresión y estudio de enzimas termoestables de interés biotecnológico. Universidad Autónoma de Madrid.

Fooladi, J. and Sajjadian, A. (2010) 'Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable α -amylase producing strain', 2(1), pp. 46–50.

Frock, A. D. and Kelly, R. M. (2012) 'Extreme thermophiles: Moving beyond single-enzyme biocatalysis', Current Opinion in Chemical Engineering. Elsevier Ltd, 1(4), pp. 363–372. doi: 10.1016/j.coche.2012.07.003.

Gupta, R. et al. (2003) 'Microbial α -amylases : a biotechnological perspective', 38. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00053-0.

Gupta, R. S. et al. (2020) 'Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades , proposed as novel Bacillaceae genera , by phylogenomics and comparative genomic analyses : description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp . nov . and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species', pp. 5753–5798. doi: 10.1099/ijsem.0.004475.

Haki, G. and Rakshit, S. (2003) Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review, Bioresource technology. doi: 10.1016/S0960-8524(03)00033-6.

Instituto Geológico Minero Metalúrgico (2000) 'Aguas termales y minerales en el norte del Perú', Riesgos volcánicos e hidrotermalismo en el Perú - Boletín 22 Serie D: Estudios Regionales, pp. 1–120.

Khalil, A. et al. (2017) 'Novel *Anoxybacillus flavithermus* AK1 : A Thermophile Isolated from a Hot Spring in Saudi Arabia', Arabian Journal for Science and Engineering. Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/s13369-017-2622-z.

Konsoula, Z. and Liakopoulou-kyriakides, M. (2007) 'Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates', 98, pp. 150–157. doi: 10.1016/j.biortech.2005.11.001.

De La Rosa, M. del C. and Mosso, M. Á. (2016) 'Diversidad microbiana de las aguas minerales termales', pp. 153–158.

Madigan, M. et al. (2015) Brock Biology of microorganisms. catorceava.

- Maza, J. (2014) 'Cátedra de obras hidráulicas obras fluviales', Universidad Nacional de Córdoba, pp. 1–41.
- Mohammad A. Khiyami (2012) 'Thermo-aerobic bacteria from geothermal springs in Saudi Arabia', *African Journal of Biotechnology*, 11(17), pp. 4053–4062. doi: 10.5897/ajb11.3339.
- Mohammad, B. T. et al. (2017) 'Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes', *International Journal of Microbiology*, 2017. doi: 10.1155/2017/6943952.
- Monteiro de Souza, P. P. de O. (2010) 'Application of microbial alpha- amylase in industry – A Review', pp. 850–861.
- Mora-gonzález, P. C. et al. (2020) 'Metagenomic Approach to Bacterial Diversity and Lipolytic Enzymes ' Genes from a Steam Soil of Los Humeros Geothermal Field (Puebla , México) Metagenomic Approach to Bacterial Diversity and Lipolytic Enzymes ' Genes from', *Geomicrobiology Journal*. Taylor & Francis, 0(0), pp. 1–11. doi: 10.1080/01490451.2020.1852452.
- Oliart-Ros, R. M. et al. (2016) 'Utilization of microorganisms from extreme environments and their products in biotechnological development', *CienciaUAT*, 11(1), pp. 79–90.
- De Oliveira, T. B., Gomes, E. and Rodrigues, A. (2015) 'Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy', *Extremophiles*, 19(1), pp. 31–37. doi: 10.1007/s00792-014-0707-0.
- Padilla, C. et al. (2011) 'Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico.', *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*, pp. 1–8. Available at:
- Pandey, A., Negi, S. and Soccol, C. R. (2016) *Current developments in biotechnology and bioengineering: Production, isolation and purification of industrial products, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products.*

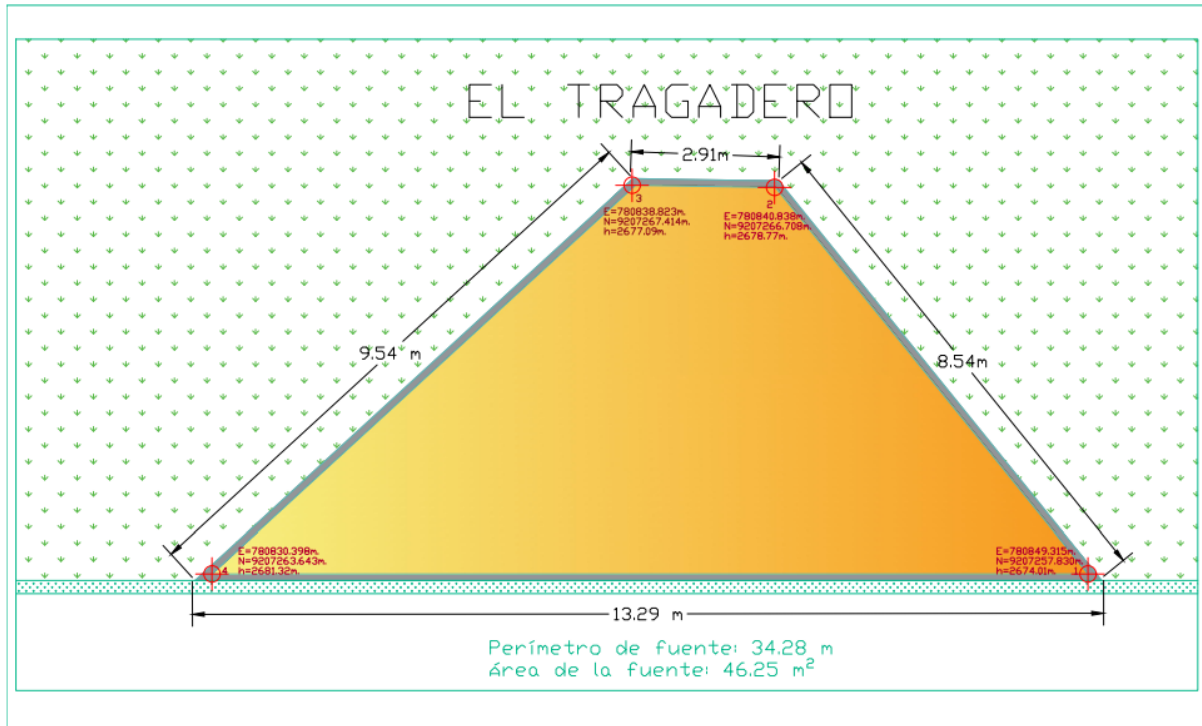
- Parsai, S. et al. (2020) 'Lipase producing thermophilic bacteria isolation and characterization from hot of Central India', (December). doi: 10.51365/NJLS.2020.v17i02.003.
- Peña, F. and Severyn, O. (2008) Modelo hidrogeológico del funcionamiento de las fuentes termales de Baños del Inca, Cajamarca-Perú. Universidad de Liberec Republica Checa.
- Peña, F., Sima, J. and Baratoux, L. (2007) Hidrogeología de las fuentes termales de Cajamarca y Churin para el desarrollo de las aguas termales y minerales. AQUA TEST a.s, Republica Checa.
- Quintero, M. M., Montoya, O. C. and Gutiérrez, P. A. S. (2009) 'Purificación y caracterización de una alfa-amilasa producida por la cepa nativa *Bacillus* sp. BBM1', pp. 31–38.
- Ramesh, M. V and Lonsane, B. K. (1990) 'Microbiology Biotechnology App // ed Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid-state fermentation system', pp. 501–505.
- Raul, D. et al. (2014) 'Production and Partial Purification of Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) Using Solid State Fermentation', 2014.
- Rodríguez, S. A. (2010) 'La Dureza del Agua', p. 32.
- Rolle, R. S. (1998) 'Review: Enzyme applications for agro-processing in developing countries: An inventory of current and potential applications', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5), pp. 611–619. doi: 10.1023/A:1008896500986.
- Romero, R. and Banerjee, A. (2022) 'Stress Dependent Biofilm Formation and Bioactive Melanin Pigment Production by a Thermophilic *Bacillus* Species from Chilean Hot Spring'.
- Rosenberg, E. et al. (2013) The prokaryotes: Gammaproteobacteria, *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*. doi: 10.1007/978-3-642-38922-1.
- Sarmiento, F. and Blamey, R. P. J. M. (2015) 'Cold and hot extremozymes : industrial relevance and current', 3(October). doi: 10.3389/fbioe.2015.00148.

- Silva, A. M. and Setubal, J. C. (2017) 'Genome-Centric Analysis of a Thermophilic and Cellulolytic Bacterial Consortium Derived from Composting', 8(April). doi: 10.3389/fmicb.2017.00644.
- Simpson, H. D. et al. (1990) 'Purification and some properties of a thermostable DNA polymerase from a *Thermotoga* species', *Biochemistry and Cell Biology*, 68(11), pp. 1292–1296. doi: 10.1139/o90-192.
- Sinisterra, J. V. (2012) *Microorganismos extremófilos*. Facultad de farmacia.
- De Souza, C. and Leal, M. (2000) 'Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp.', pp. 298–302.
- Spormann, A. M. et al. (2004) 'Microbial biofilms', *Nanoscale Technology in Biological Systems*, pp. 341–357. doi: 10.1201/9780203500224.
- Srivastava, R. et al. (2015) 'Amylases : An Overview with special reference to alpha', 4(1), pp. 1886–1901.
- Stetter, K. O. (1999) 'Extremophiles and their adaptation to hot environments', *FEBS Letters*, 452(1–2), pp. 22–25. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00663-8.
- Vargas, V. (2010) 'Las fuentes termales en el Perú, estado y uso actual', 9, pp. 1175–1178.
- Velázquez, A., Aragón, C. and Romero, A. C. (2008) 'Extracción y purificación de ADN', *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Villena, C. et al. (2019) 'Caracterización de la enzima amilasa de la bacteria termófila *Bacillus licheniformis* BA-3 aislada de los Géiseres de Candarave (Tacna-Perú)', *Ciencia & Desarrollo*, pp. 65–70. doi: 10.33326/26176033.2015.20.516.
- Yan, S. and Wu, G. (2017) 'Bottleneck in secretion of α - amylase in *Bacillus subtilis*', *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, pp. 1–8. doi: 10.1186/s12934-017-0738-1.
- Zavaleta, R. A., Díaz, L. L. and Vega, R. S. (2018) 'Aislamiento y selección de cultivos nativos de *Bacillus* sp. productor de amilasas a partir de residuos amiláceos del mercado La Hermelinda, Trujillo, Perú', *Revista Rebiol*, 36(2), pp. 16–26. Available at: <http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/1700>.

Zeña, L. and Lleque, L. (2015) Efecto del almidón comercial de *Zea mays* sobre la cinética de producción de amilasas por *Bacillus licheniformis*. Universidad Nacional de Trujillo.

APÉNDICES

Apéndice 1. Forma trapezoide de la fuente termal, perímetro y área.



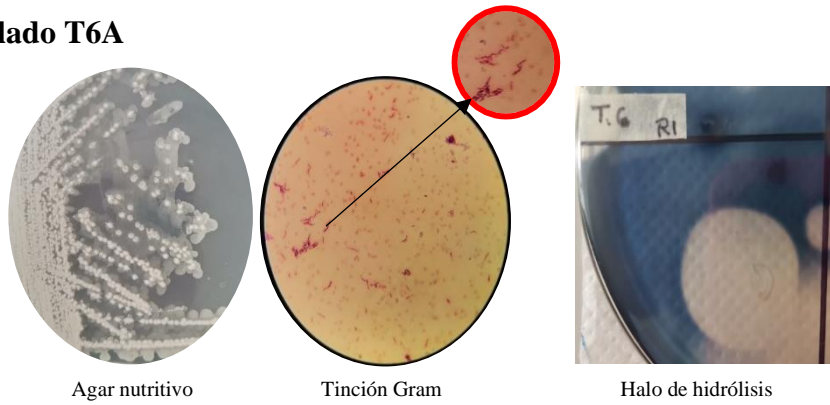
Apéndice 2. Tipos de muestras recolectadas



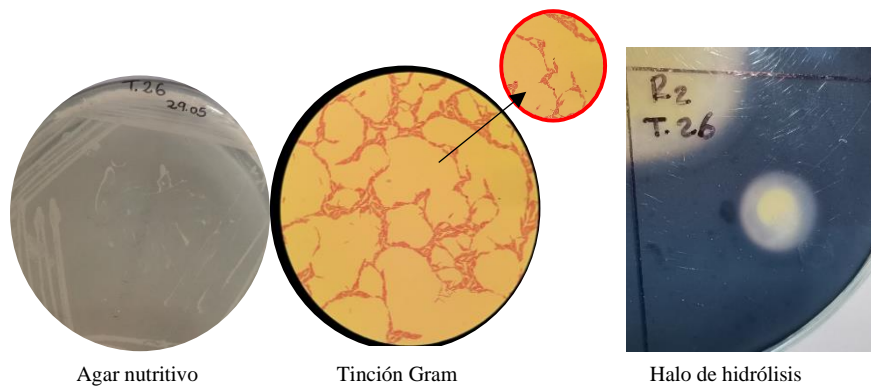
a. Tapete, b. Biopelícula, c. Sedimento y d. forma de recolección de muestra.

Apéndice 3. Aislados bacterianos, tinción Gram y halo de hidrólisis.

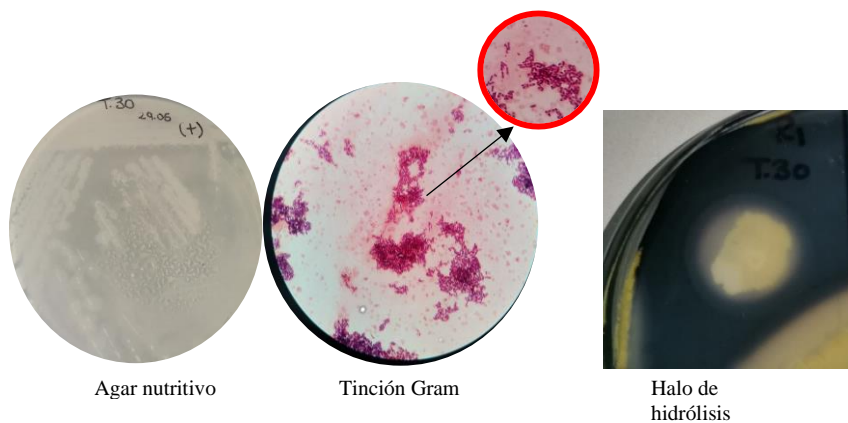
Aislado T6A



Aislado T26A



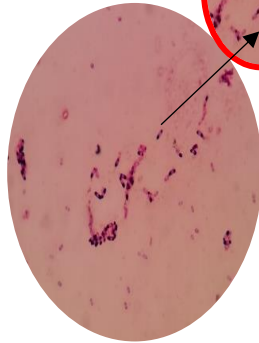
Aislado T30A



Aislado T31A



Agar nutritivo



Tinción Gram

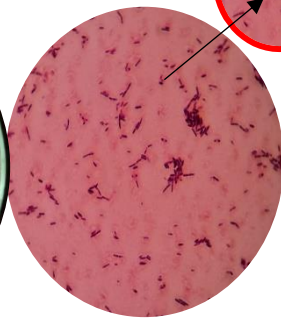


Halo de hidrólisis

Aislado T33A



Agar nutritivo



Tinción Gram

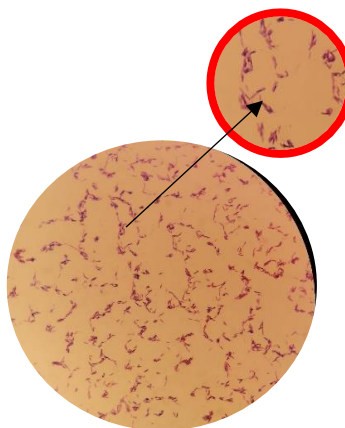


Halo de hidrólisis

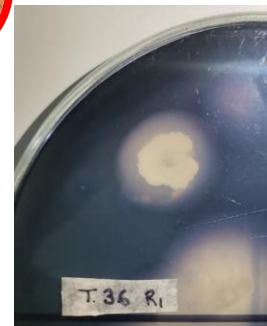
Aislado T36A



Agar nutritivo



Tinción Gram

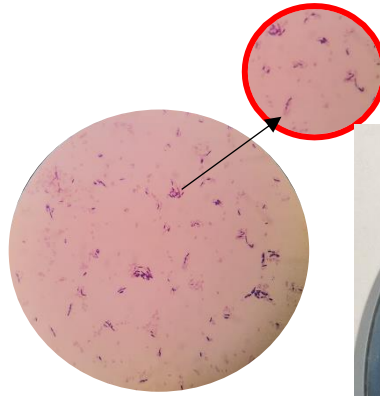


Halo de hidrólisis

Aislado T38A



Agar nutritivo



Tinción Gram

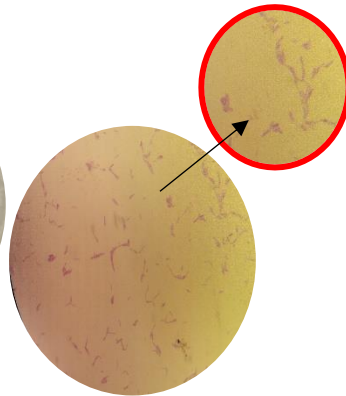


Halo de hidrólisis

Aislado T42A



Agar nutritivo



Tinción Gram



Halo de hidrólisis

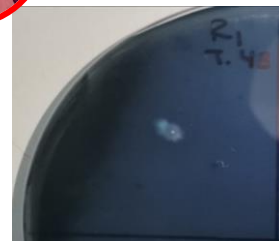
Aislado T43A



Agar nutritivo

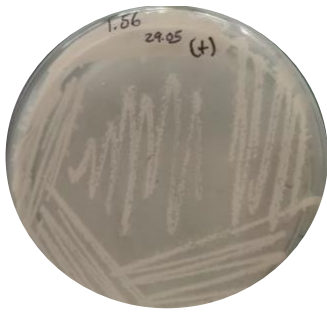


Tinción Gram

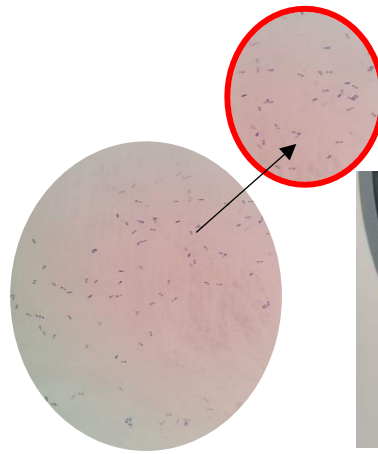


Halo de hidrólisis

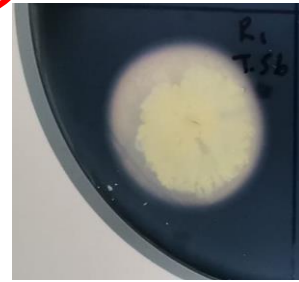
Aislado T56A



Agar nutritivo

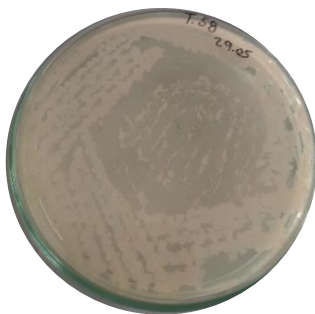


Tinción Gram

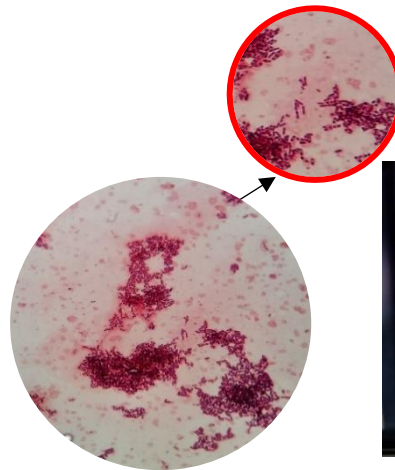


Halo de hidrólisis

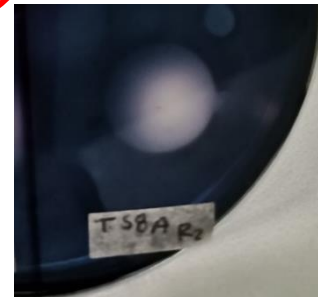
Aislado T58A



Agar nutritivo

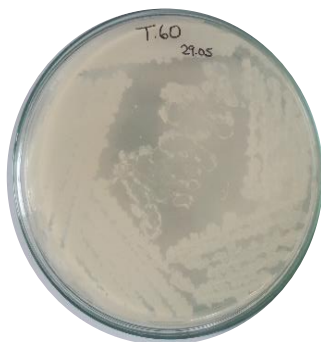


Tinción Gram

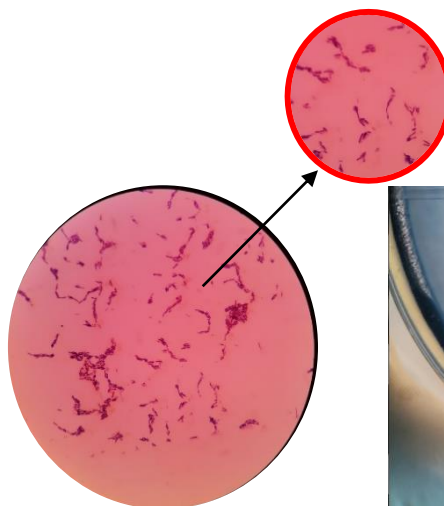


Halo de hidrólisis

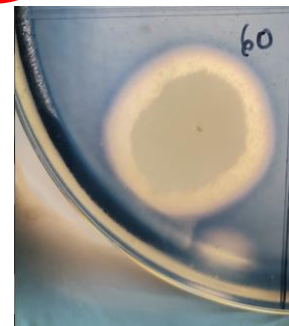
Aislado T60A



Agar nutritivo



Tinción Gram

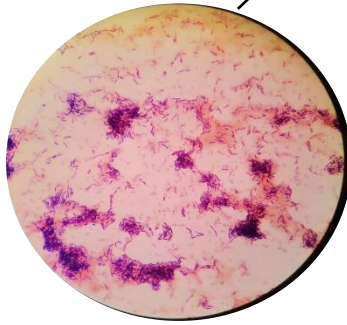


Halo de hidrólisis

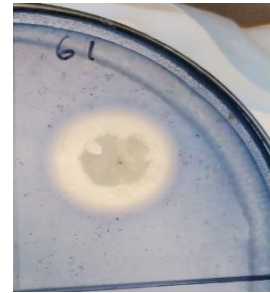
Aislado T61A



Agar nutritivo

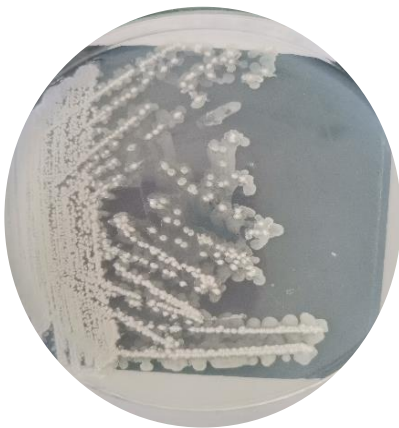


Tinción Gram

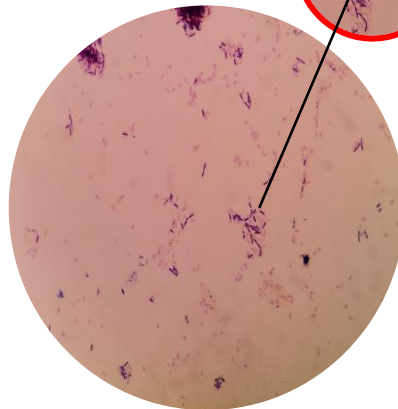


Halo de hidrólisis

Aislado T62A



Agar nutritivo



Tinción Gram

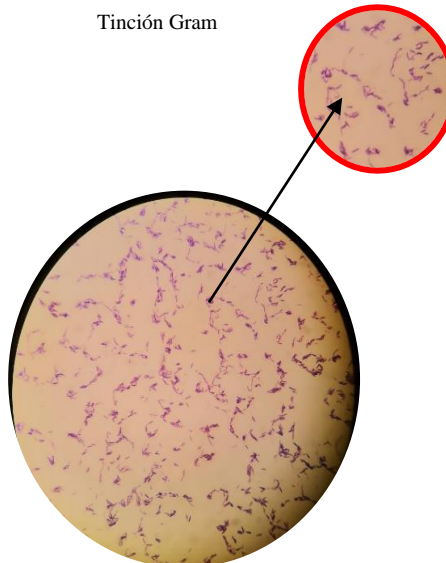


Halo de hidrólisis

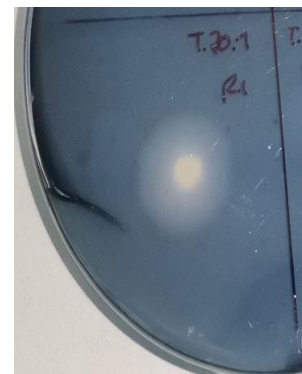
Aislado T701A



Agar nutritivo

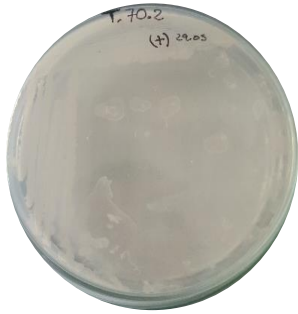


Tinción Gram

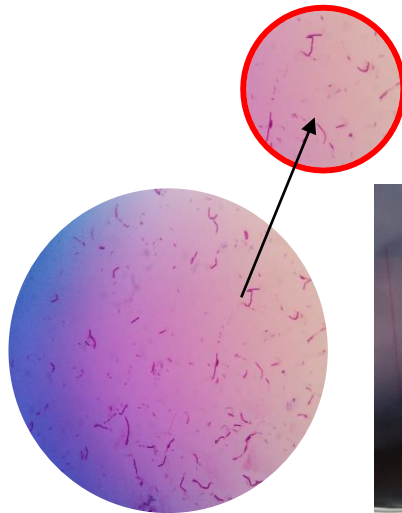


Halo de hidrólisis

Aislado T702A



Agar nutritivo



Tinción Gram



Halo de hidrólisis

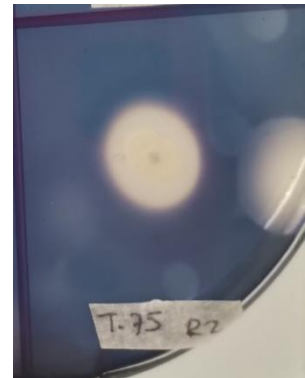
Aislado T75A



Agar nutritivo



Tinción Gram

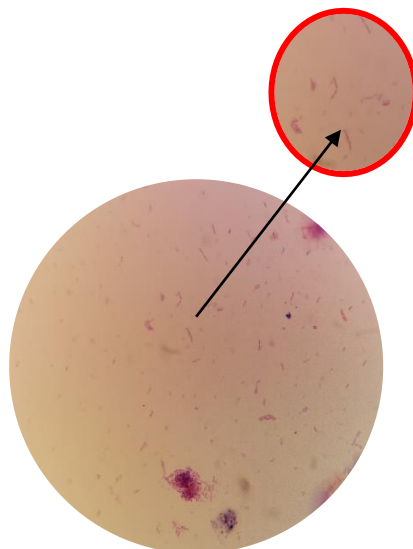


Halo de hidrólisis

Aislado T81A



Agar nutritivo



Tinción Gram
60

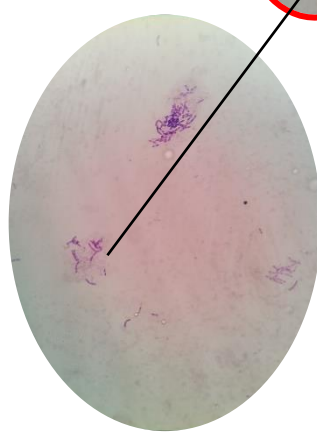


Halo de hidrólisis

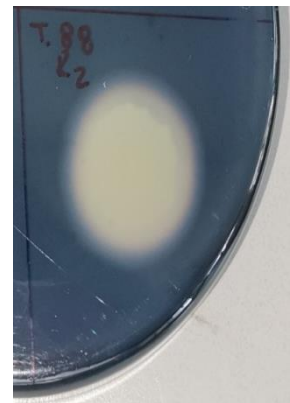
Aislado T88A



Agar nutritivo

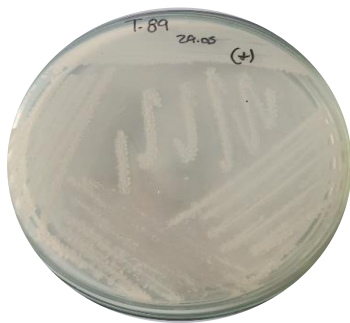


Tinción Gram

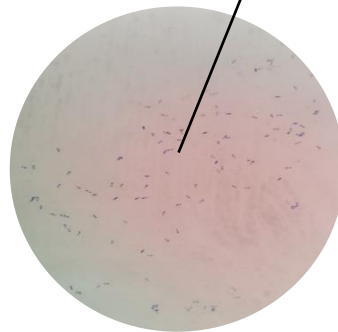


Halo de hidrólisis

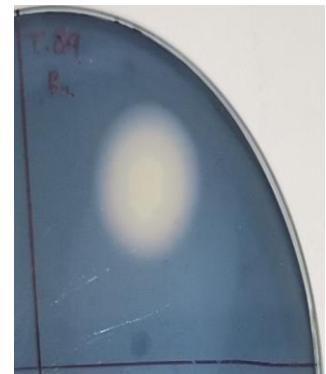
Aislado T89A



Agar nutritivo



Tinción Gram



Halo de hidrólisis

Apéndice 4. Ficha de registro de identificación de bacterias termófilas productoras de amilasas

DESCRIPCIÓN DE LA CEPA:

LUGAR DE AISLAMIENTO:

TEMPERATURA:

pH:

DÍA DEL AISLAMIENTO:

FICHA DE REGISTRO DE IDENTIFICACION CARACTERISTICAS CULTURALES				
Código de cepa:	ELEVACION	BORDE	TEXTURA	COLOR

FICHA DE REGISTRO DE IDENTIFICACION CARACTERISTICAS DE COLORACION		
Código de cepa:	GRAM	WIRTZ

Ficha de registro de producción de amilasas

FICHA DE REGISTRO DE PRODUCCION DE AMILASAS	
Código de cepa	
Nivel de hidrolisis	
Temperatura	

Apéndice 5. Análisis estadístico

Asociación entre diámetros de halo de hidrólisis y los 20 aislamientos

Prueba de Kruskal Wallis

		Rangos	
	Código	N	Rango promedio
Diámetro	T6	6	64,08
	T26	6	55,08
	T30	6	68,17
	T31	6	76,67
	T33	6	60,17
	T36	6	60,25
	T38	6	26,67
	T42	6	28,67
	T43	6	9,83
	T56	6	42,42
	T58	6	51,50
	T60	6	76,25
	T61	6	90,75
	T62	6	82,67
	T701	6	69,17
	T702	6	48,17
	T75	6	64,67
	T81	6	88,17
	T88	6	73,83
	T89	6	72,83
	Total	120	

Resumen de prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes

N total	120
Estadístico de prueba	42,336 ^a
Grado de libertad	19
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,002

a. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

Conclusión: Existen diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los diámetros netos obtenidos por los diferentes aislamientos.

Asociación entre almidón hidrolizado y los aislamientos en diferentes tiempos de fermentación

		Rangos		
Tiempo		Código	N	Rango promedio
24 horas	Almidón hidrolizado	T26	2	1,50
		T33	2	4,50
		T56	2	6,00
		T58	2	11,50
		T75	2	8,00
		T81	2	7,50
		Total	12	
48 horas	Almidón hidrolizado	T26	2	3,50
		T33	2	3,00
		T56	2	6,50
		T58	2	11,50
		T75	2	8,50
		T81	2	6,00
		Total	12	
72 horas	Almidón hidrolizado	T26	2	4,50
		T33	2	4,50
		T56	2	6,50
		T58	2	10,50
		T75	2	8,50
		T81	2	4,50
		Total	12	

Estadísticos de prueba^{a,b}

tiempo	Concentración almidón hidrolizado	
24 horas	H de Kruskal-Wallis	8,846
	gl	5
	Sig. asintótica	,115
48 horas	H de Kruskal-Wallis	7,769
	gl	5
	Sig. asintótica	,169

72 horas	H de Kruskal-Wallis	4,923
	gl	5
	Sig. asintótica	,425

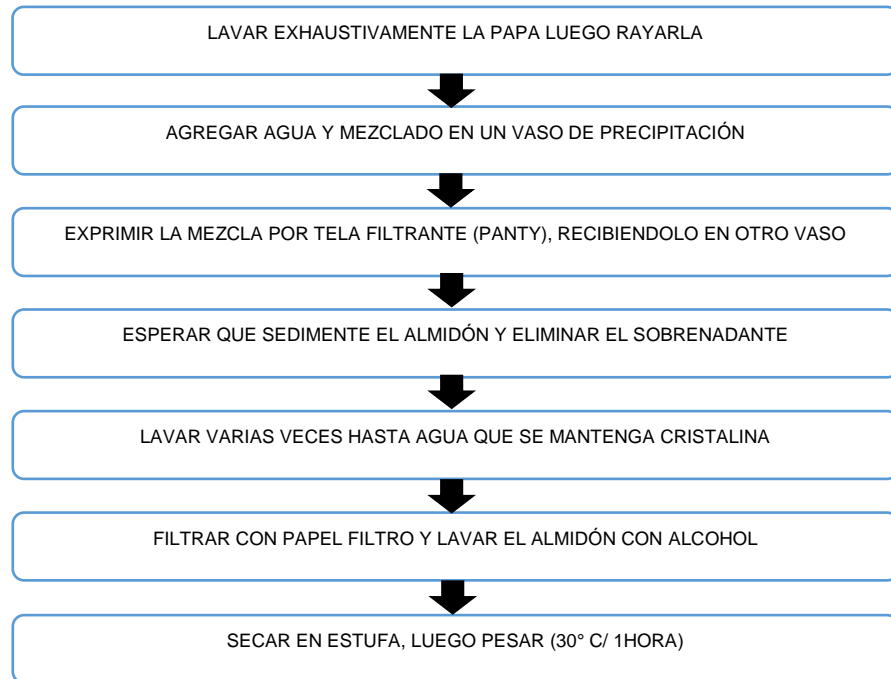
a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: cepa

Conclusión: No existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de almidón hidrolizado obtenidos por los diferentes aislamientos.

ANEXOS

Anexo 1. OBTENCIÓN ALMIDÓN DE PAPA (Zuñiga, 2013)



Anexo 2. Compuestos del agar almidón (Fooladi y Sajjadian, 2010)

Agar almidón (preparación de 100 mL)	
Compuesto	Masa (g)
KHPO ₄	0,03
K ₂ HPO ₄	0,07
Almidón	1
Extracto de levadura	0,3
Peptona	0,5
MgSO ₄	0,5
NaCl	0,3
Agar	2

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN usando kit comercial PureLink Genomic DNA Kits

1. Preparación de lisado

Prepare el lisado utilizando un protocolo de preparación de muestras apropiado de la siguiente manera:

a. Bacteria gram negativa:

Utilice el siguiente protocolo para preparar lisado de células bacterianas Gram negativas.

1. Coloque un baño de agua o un bloque térmico a 55 °C.
2. Coseche hasta 2×10^9 Gram negativos (~1 mL de cultivo de E. coli durante la noche) por centrifugación. Si está utilizando un sedimento de células congeladas, continúe con el Paso 3.
3. Vuelva a suspender el sedimento celular en 180 μ l de PureLink® Genomic Digestion Buffer. Agregue 20 μ l de proteinasa K (suministrada con el kit) para lisar las células. Mezclar bien mediante agitación breve en vórtex.
4. Incube el tubo a 55 °C con agitación vorticial ocasional hasta que se complete la lisis (entre 30 minutos y un máximo de 4 horas).
5. Agregue 20 μ L de RNasa A (suministrada con el kit) al lisado, mezcle bien con un vórtex breve e incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
6. Agregue 200 μ l de PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer y mezcle bien agitando en vórtex para obtener una solución homogénea.
7. Agregue 200 μ L de etanol al 96–100 % al lisado. Mezcle bien agitando en vórtex durante 5 segundos para obtener una solución homogénea.

Nota: cuando procese varias muestras, puede preparar una mezcla maestra de tampón/etanol mezclando 200 μ l de tampón de lisis/unión y 200 μ l de etanol al 96–100 % para cada muestra.

b. Lisado de células bacterianas gram-positivas

Utilice el siguiente protocolo para preparar lisado de células bacterianas Gram positivas.

1. Establecer dos baños de agua o bloques térmicos a 37°C y 55°C, respectivamente. 2. Prepare el tampón de digestión de lisozima (vea la receta en la página 15). A ~200 μ L de tampón de digestión de lisozima/muestra, agregue lisozima fresca para obtener una concentración final de lisozima de 20 mg/ml.

*“Lisozima y tampón de digestión de lisozima (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 2,5 mM, Triton X-100 al 1 %) para lisado de células bacterianas”

4. Vuelva a suspender el sedimento celular en 180 μ L de tampón de digestión de lisozima que contiene lisozima del Paso 2. Mezcle bien agitando brevemente en vórtex.
5. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
6. Agregue 20 μ L de proteinasa K (suministrada con el kit). Mezclar bien mediante agitación breve en vórtex.

7. Agregue 200 μL de tampón de unión/lisis genómica PureLink® y mezcle bien agitando brevemente en vórtex.
8. Incubar a 55°C durante 30 minutos.
9. Agregue 200 μL de etanol al 96–100 % al lisado. Mezcle bien agitando en vórtex durante 5 segundos para obtener una solución homogénea.
10. Continúe con Unión de ADN (página 23).

2. Unión de ADN

1. Retire una columna de centrifugación PureLink® en un tubo de recolección del paquete.
2. Agregue el lisado (~640 μL) preparado con PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer y etanol a la PureLink® Spin Column.
3. Centrifugar la columna a 10 000 \times g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Deseche el tubo de recolección y coloque la columna de centrifugación en un tubo de recolección PureLink® limpio suministrado con el kit.
5. Continúe con Lavado de ADN.

3. Lavado de ADN

1. Agregue 500 μL de tampón de lavado 1 preparado con etanol (página 23) a la columna.
2. Centrifugar la columna a temperatura ambiente a 10 000 \times g durante 1 minuto. 3. Deseche el tubo de recolección y coloque la columna de centrifugación en un tubo de recolección PureLink® limpio suministrado con el kit.
4. Agregue 500 μL de tampón de lavado 2 preparado con etanol (página 23) a la columna.
5. Centrifugar la columna a máxima velocidad durante 3 minutos a temperatura ambiente. Deseche el tubo de recolección.

4. ADN eluido

1. Coloque la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.
2. Agregue 25–200 μL de PureLink® Genomic Elution Buffer a la columna. Consulte Parámetros de elución (página 13) para elegir el volumen de elución adecuado para sus necesidades.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar la columna a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente. El tubo contiene ADN genómico purificado.
4. Para recuperar más ADN, realice un segundo paso de elución utilizando el mismo volumen de tampón de elución que la primera elución en otro tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.
5. Centrifugar la columna a máxima velocidad durante 1,5 minutos a temperatura ambiente. El tubo contiene ADN purificado. Retire y deseche la columna.

5. Almacenamiento de ADN

- Almacene el ADN purificado a –20 °C o utilice el ADN para la aplicación posterior deseada.
- Para el almacenamiento a largo plazo, almacene el ADN purificado en tampón de elución genómica PureLink® a –20 °C, ya que el ADN almacenado en agua está sujeto a hidrólisis ácida.