

# AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CELULOLÍTICAS TERMÓFILOS DE GÉISERES NATURALES DE CANDARAVE - TACNA

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THERMOPHILIC CELLULOLYTIC BACTERIA FROM NATURAL GEYSERS CANDARAVE - TACNA

<sup>1</sup> Helena Beatriz Zapata Málaga; <sup>2</sup> Roberto Castellanos Cabrera

### RESUMEN

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

**Palabras clave:** *Bacillus licheniformis*, endoglucanasas, gen ARNr 16S, *Geobacillus* sp., termoestables.

### ABSTRACT

Isolation of 31 bacterial cultures were performed from Calientes hot springs, selecting the cultures that showed significant diameters of hydrolyzed zones and the highest amount of endoglucanases activity in submerged culture, induced with CMC 1 %. The selected strains B12N and B20A have a maximum activity of thermostable endoglucanases, with an industrial importance, of 0,56 UI ml<sup>-1</sup> at 67,5 °C and pH 5,9 and 0,27 UI ml<sup>-1</sup> at 59,5 °C and pH 6,4 respectively; the strain B12N presents the highest enzyme purity with 18,66 UI mg<sup>-1</sup> of protein. Also was presented a similarity with the 16S rRNA gene of *Geobacillus* sp. at 99 % and with *Bacillus licheniformis* at 97 % for the strain B12N and B20A respectively after their sequencing.

**Key words:** *Bacillus licheniformis*, endoglucanases, 16S rRNA gene, *Geobacillus* sp., thermostables.

### INTRODUCCIÓN

La importancia del estudio de la diversidad microbiana radica en la participación activa sobre los ciclos biogeoquímicos, gracias a la cual se recupera y recicla materia y energía por medio de enzimas y complejos enzimáticos específicos que poseen dichos microorganismos, entre ellos se encuentran los microorganismos celulolíticos en el reciclaje de la celulosa (Hongpattarakere, 2002), la cual es una de las moléculas poliméricas más abundantes en la biósfera (Martínez *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 1999) y con alto potencial de bioconversión a biocombustibles (Bhalla *et al.*, 2013).

La hidrólisis eficiente de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de al menos tres enzimas. De acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se clasifican en tres grandes grupos: endo  $\beta$ -1,4 glucanasas ( $\beta$ -1,4 glucano glucanohidrolasa), exo  $\beta$ -1,4 celobiohidrolasas y las  $\beta$ -1,4 glucosidasas (Lymar *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006). Estas enzimas pueden ser secretadas por una serie de microorganismos como hongos y bacterias, sin embargo la utilización de la celulosa requiere que los

microorganismos tengan celulosas extracelulares que sean fácilmente recuperables del sobrenadante del cultivo (Lynd *et al.*, 2002), además de mantener su actividad hidrolítica ante una serie de factores físicos y químicos que limitan su aplicación a nivel industrial, como las elevadas temperaturas de reacción.

Siendo consideradas las bacterias termófilas prometedoras en la degradación de celulosa, por la termoestabilidad de sus enzimas, es de gran importancia la selección de estos microorganismos con una eficiente actividad celulolítica para obtener sustancias biológicamente activas con interés biotecnológico e industrial.

Con la identificación de microorganismos con utilidad económica, se proveerá a las fuentes termales de Calientes, de la provincia de Candarave, departamento de Tacna, un valor económico en términos de riqueza genética.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Ubicación y delimitación del área de estudio

El área de estudio comprendió la zona geotermal de Calientes, ubicada en la provincia de Candarave, región

<sup>1</sup> Biólogo Microbiólogo, Laboratorio de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna-Perú.

<sup>2</sup> Bioquímico, Laboratorio de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna-Perú.



Tacna, la cual se encuentra a 4 400 msnm, al occidente de la cordillera de los Andes en el sur de Perú (Cruz *et al.*, 2010).

En dicha zona se encuentran las ocho fuentes termales muestreadas, las cuáles mostraron las más altas temperaturas de 60 a 88 °C, pH entre 7,1 y 7,5 y tenían presencia de tapetes microbianos, biopelículas y fango.

### Colección de muestra

Se colectaron en total 1 L (de 2 puntos de muestreo por fuente termal) de las muestras de fango, biopelículas o tapetes microbianos de las 8 fuentes termales de Calientes y fueron transportadas en termos estériles de 1 L para su procesamiento.

### Aislamiento

Se realizó un enriquecimiento de la biodiversidad procariota termofílica con actividad de celulasas de las muestras con el método modificado de Kublanov *et al.* (2009). Se agregó a las muestras 1 % (p/v) de celulosa microcristalina y se incubó a 100 rpm, por 14 días a 70 °C para las muestras T1 - T5 y a 60 °C para las muestras T6 - T8. Luego se procedió a la siembra por incorporación de la muestra y se incubó a 60 °C por 10 días. El medio de aislamiento contenía por litro: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 11,7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,7 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,6 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,8 g, extracto de Levadura 0,5 g, peptona 0,5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 500 mg, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 160 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 140 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 370 mg, CMC 10 g y agar 20 g; el pH fue ajustado a 7 con NaOH 1 N.

Las colonias crecidas fueron estriadas para luego ser almacenadas en agar nutritivo y conservadas a 4 °C. Para la identificación microscópica se realizó la coloración Gram.

### Actividad cualitativa de celulasas

Fue desarrollada en base al método de Teather y Wood (1982). Para ello, se sembró por incorporación 20 µl de inóculo (D.O. de 0,3) en 150 µl de medio de producción de celulasas descrito por Mandels y Reese (1957): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,14 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 %, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,03 %, CaCl<sub>2</sub> 0,03 %, Co(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,03 %, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 500 mg L<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 160 mg L<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 140 mg L<sup>-1</sup>, CoCl<sub>2</sub> 200 mg L<sup>-1</sup>, peptona 0,1 %, extracto de levadura 0,1 %, CMC 0,5 %, se agregó agar al 2 % (p/v), se ajustó el pH a 7 con NaOH 1N. Se sembró en microplacas ELISA de fondo plano de 96 pozos (LabSource, Arbor, IL, USA) y se incubaron a 60 °C por 72 h. El contenido de cada pocillo (después de comprobar el crecimiento del microorganismo) se retiró con un sacabocado estéril y se colocó sobre placas de vidrio, que contenían los medios sólidos con el sustrato de celulasas (Meza *et al.*, 1995), incubándose a 70 °C en baño María por 4 h.

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

Para el revelado de las zonas de hidrólisis por las celulasas, se agregó una solución de Rojo Congo al 0,1% (p/v) hasta cubrir toda la placa, se dejó a temperatura ambiente por 15 min y luego se retiró el exceso de colorante lavando con NaCl 1 M. Se evidenció la actividad enzimática

por la difusión de la enzima, presente en el disco de agar sobre el medio de tamizado por la presencia de zonas transparentes no teñidas.

### Actividad cuantitativa de celulasas

Se inoculó 3 % (v/v) de caldo nutritivo con crecimiento bacteriano (D.O. de 0,3) en matraces con deflectores de 250 ml con 40 ml de medio de producción con CMC 1 % (p/v) ajustado a pH 7 con NaOH 1 N. Se incubó a 150 rpm por 48 horas a 60 ± 5 °C. El cultivo obtenido se centrifugó a 6 000 rpm por 20 min, el sobrenadante fue utilizado para la actividad enzimática y medición de proteínas solubles y el sedimento para la medición de biomasa.

Se midió la actividad de la enzima endoglucanasa por el método descrito por Ghose (1987). Para ello a 0,5 ml del sobrenadante se añadió 1 ml de diferentes tampones a pH 4,8; 7,4 y 8,4 a 0,05 M de acetato de sodio, fosfato de sodio y barbital - HCl, respectivamente, y se incubó por 5 minutos a 70 °C, luego se agregó 1 ml de CMC al 1% (p/v) y se incubó dicho sistema a 70 °C durante 30 min. Se midió la liberación de azúcares reductores, expresada en UI ml<sup>-1</sup>, donde una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de glucosa por minuto (Miller, 1959).

Se optimizó la actividad enzimática de endoglucanasas de las cepas seleccionadas con mayor actividad enzimática, evaluándose en los diferentes tampones a 50 mM: acetato de sodio pH 4,4 y 5,4; fosfato de sodio pH 6,4 y 7,4; barbital - HCl pH 8,4 y glicina NaOH pH 9,4; y a diferentes temperaturas de 50 °C a 80 °C.

### Determinación de biomasa celular

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

### Cuantificación de proteínas solubles

Las muestras fueron previamente tratadas por el método descrito por Wessel y Fluegge (1984), para ello fueron centrifugadas para remover los sólidos y usar el sobrenadante, el cual se precipitó con TCA al 10 % (p/v) en una relación de 2:1 respectivamente, se incubó toda la noche a 4 °C y luego se centrifugó por 20 min a 6 000 rpm descartándose el sobrenadante y se disolvió el sedimento en 1 ml de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2 % en 0,1 M de NaOH.

La cuantificación de proteínas solubles fue realizada mediante el método de Lowry *et al.* (1951), utilizándose una solución de seroalbúmina bovina (1 mg ml<sup>-1</sup>) como estándar.

### Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN de las cepas seleccionadas fue extraído en base al método descrito por Sambrook y Russell (1989). Se usó 10 ml de un cultivo joven de 18 horas el cual fue centrifugado a 14 000 rpm por 10 min, al pellet obtenido se añadió 100 µl de TES (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8, sacarosa 25 %) sacarosa 25 %, 40 µl de lisozima (5 mg ml<sup>-1</sup>) y



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

Se descartó el sobrenadante y el sedimento seco fue eluido en 50 µl de TE (Tris 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada siguiendo el protocolo descrito por el kit GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega). Se usó 4 µl de Buffer

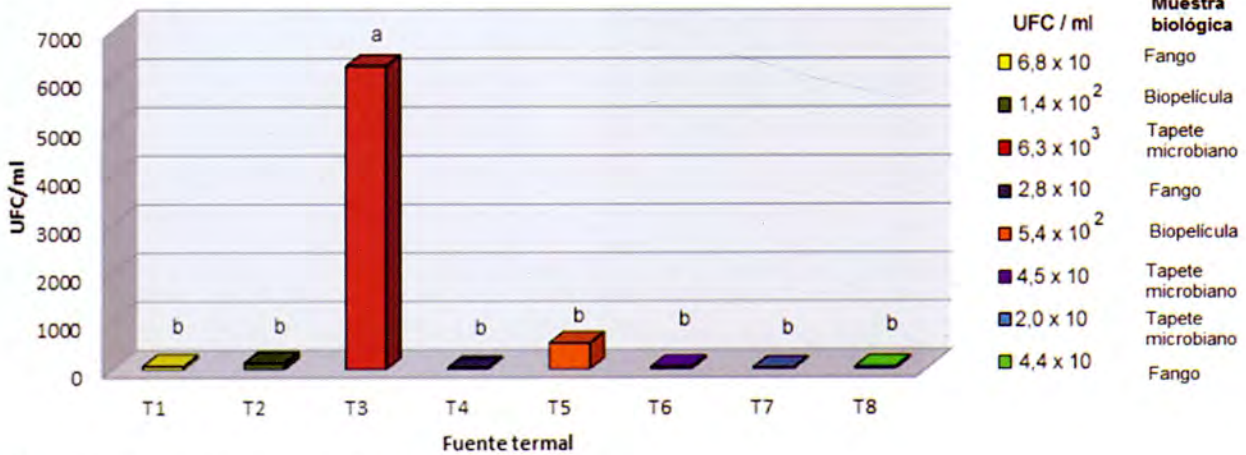
Green Flexi, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 1,2 µl de dNTPs 10 mM; 0,2 µl de Taq DNA polimerasa (5 u µl<sup>-1</sup>); 0,4 µl de cebadores ARNr 16S 10 µM (27F y 1492R), 3 µl de ADN 50 ng µl<sup>-1</sup> y 8,8 µl de agua Depc.

Las secuencias de los cebadores ARNr 16S utilizados para la reacción de PCR fueron: 27F-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y 1492R-GGTTACCTTGTTACGACTT.

Se usó el Termociclador S1000 (BioRad), programado para una desnaturalización inicial a 95 °C por 4 min y 40 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 1 min, hibridación a 55 °C por 1 min y polimerización a 72 °C por 1 min para el gen ARNr 16S. Se realizó una extensión a 72 °C por 5 min.

**Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos obtenidos se realizó el análisis de varianza (ANVA) empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad. La comparación de las medias entre los tratamientos se realizó con la prueba de significación de Duncan al 95 % de confiabilidad.



\* Letras iguales no difieren estadísticamente p < 0,05.

Figura N° 01. Recuento de UFC de las fuentes termales de Calientes.

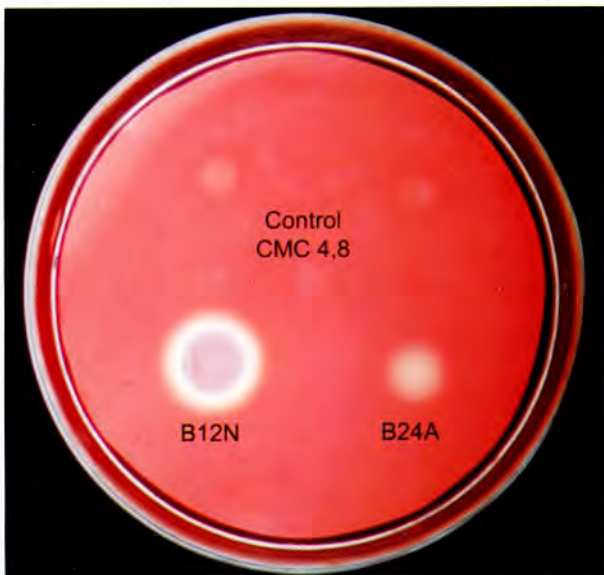


Figura N° 02. Actividad cualitativa de las celulasas evidenciada por zonas de hidrólisis desteñidas de las cepas B12N y B24A.

Para la optimización de los factores experimentales (pH y temperatura) de la actividad celulolítica termófila de las cepas seleccionadas, se usó el software Statgraphics Centurion XVI, realizándose el análisis de regresión.

**RESULTADOS**

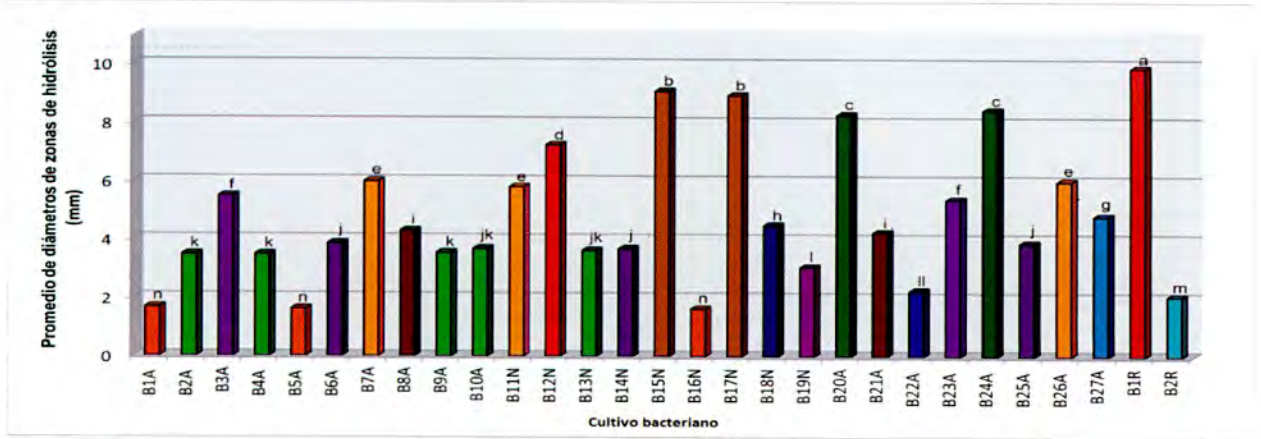
**Aislamiento**

Las muestras de las 8 fuentes termales mostraron variabilidad de cultivos bacterianos y heterogeneidad de población (Figura 01). Se aislaron 31 cultivos bacterianos, donde el 61,29 % fueron Gram positivo y el 38,71 % Gram negativo y la mayoría presentaron colonias cremosas circulares de color crema o beige.

**Actividad cualitativa de celulasas**

La actividad cualitativa de las celulasas de los 31 cultivos aislados, usando CMC como sustrato a pH 4,8; 7,4; 8,4 y 9,4; se evidenció por las zonas de hidrólisis representadas por áreas desteñidas que indican la acción del rompimiento de los enlaces β-1, 4 de la celulosa y presencia





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

Figura N° 03. Diámetro de zona de hidrólisis de celulasas de los cultivos bacterianos aislados.

de endoglucanasas (Figura N°02).

Existe diferencia estadísticamente significativa entre la media de la variable de diámetro de las zonas de hidrólisis de celulasas, a diferentes valores de pH, entre un nivel de cultivo bacteriano y otro, con un nivel de confianza del 95 % (Figura N°03).

Se pre-seleccionaron 6 cultivos, para su posterior análisis, las cuales mostraron altos promedios superiores a 7 mm, debido a su actividad en casi todos los valores de pH evaluados, indicando estabilidad de la enzima.

**Actividad cuantitativa de celulasas**

De los cultivos pre-seleccionados fueron seleccionadas las cepas B12N y B20A, las cuales presentaron mayor actividad de endoglucanasas.

Los efectos de los factores pH y temperatura en la actividad termófila enzimática, indicaron variabilidad significativa con un nivel de confianza del 95 %. Se observó que los factores incluidos en el modelo están explicando el 58,42 % de la variabilidad de la actividad enzimática para la cepa B12N y el 76 % para la cepa B20A (Tabla N°01, Tabla

N°02).

Se obtuvo las siguientes funciones de respuesta (ecuación de regresión) a utilizar que se han ajustado a los datos para maximizar los factores de pH y temperatura (T):

$$AE (B12N) = - 5,96512 + 0,36398 \text{ pH} + 0,161724 \text{ T} - 0,0309982 \text{ pH}^2 - 0,0011987 \text{ T}^2$$

$$AE (B20A) = - 2,96175 + 0,11356 \text{ pH} + 0,096595 \text{ T} - 0,008899 \text{ pH}^2 - 0,0008123 \text{ T}^2$$

De las ecuaciones obtenidas se obtuvo para la cepa B12N el valor óptimo de pH 5,9 y temperatura 67,5 °C, dando un valor maximizado de actividad enzimática de endoglucanasas de 0,56 UI ml<sup>-1</sup> (Figura N° 04). Mientras que para la cepa B20A se obtuvo el valor óptimo de pH 6,4 y temperatura 59,5 °C, dando un valor maximizado de 0,27 UI ml<sup>-1</sup> (Figura N° 05).

Tabla N° 01. Análisis de varianza para la actividad de endoglucanasas de la cepa B12N

Fuente	S.C.	G.I.	C.M.	Razón F	Valor P
pH	0,10757	1	0,1076	17,01	0,0002
T	0,09290	1	0,0929	14,69	0,0004
pH <sup>2</sup>	0,13453	1	0,1345	21,27	0,0000
T <sup>2</sup>	0,12573	1	0,1257	19,88	0,0001
Error total	0,28457	45	0,0063		

Tabla N° 02. Análisis de varianza para la actividad enzimática de endoglucanasas de la cepa B20A

Fuente	S.C.	G.I.	C.M.	Razón F	Valor P
pH	0,018019	1	0,01802	11,26	0,0013
T	0,127990	1	0,12799	79,99	0,0000
pH <sup>2</sup>	0,035485	1	0,03549	22,18	0,0000
T <sup>2</sup>	0,184736	1	0,18474	115,45	0,0000
Error total	0,107211	67	0,00160		

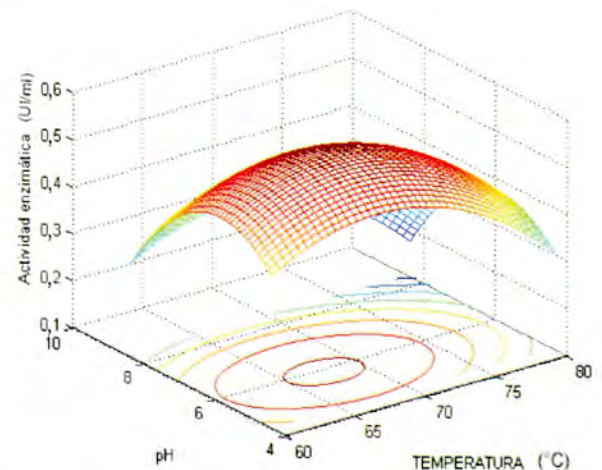


Figura N° 04. Superficie respuesta estimada de la optimización de la actividad enzimática de endoglucanasas de la cepa B12N.



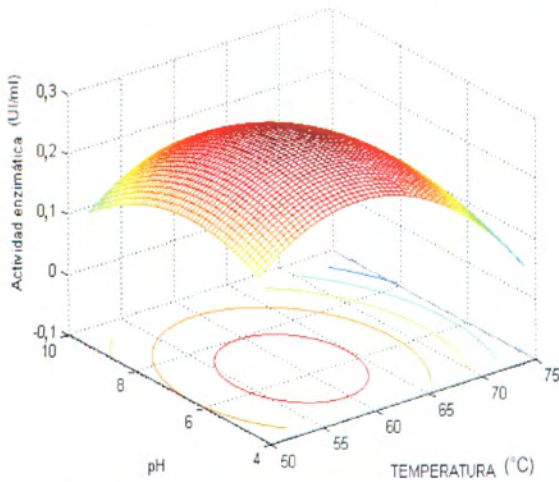


Figura N° 05. Superficie respuesta estimada de la actividad enzimática de endoglucanasas de la cepa B20A.

Tabla N° 03. Parámetros de productividad de endoglucanasas de las cepas B12N y B20A

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

\* AEP: Actividad específica, AEB: Rendimiento.

### Determinación de biomasa celular y cuantificación de proteínas solubles

#### Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN extraído de la cepa B12N presentó 28 576,764 pb, de la cepa B20A 24 385,68 pb, y del control 24 385,68 pb (Figura N° 06).

Se visualizó el producto de PCR amplificado y purificado mediante electroforesis, donde el ADN de la cepa B20A presentó 1 481,817 pb, el de la cepa B12N presentó 1 521,013 pb y del control 1 501,287 pb, valores que coinciden con el tamaño del ARNr 16S (Figura N° 07).

#### Análisis del secuenciamiento del ARNr 16S

El resultado del secuenciamiento del gen ARNr 16S informa sobre la identidad de la bacteria con la depositada en la base de datos de GenBank (búsqueda en

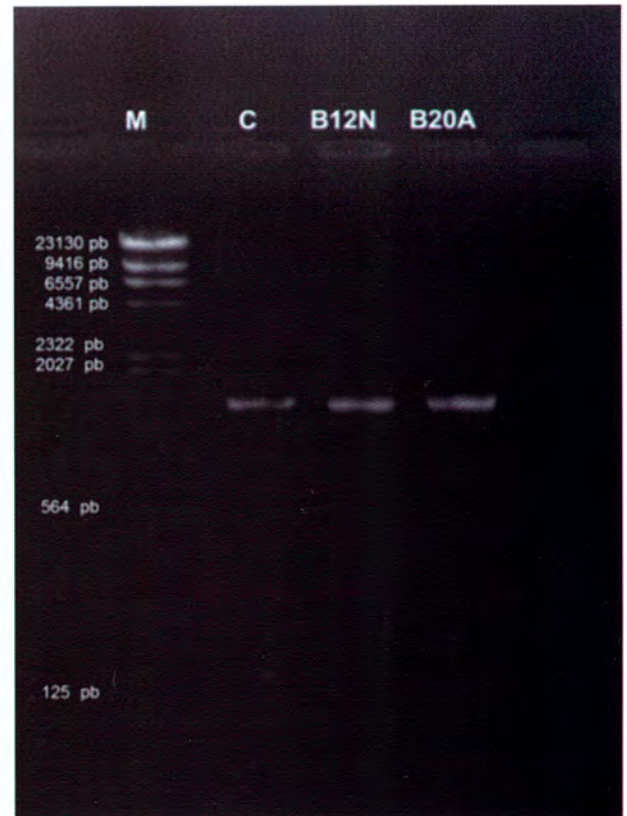
Tabla N° 04. Similitud de secuencias de ARNr 16S para las cepas B12N y B20A en BLASTN

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



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

Figura N° 06. Electroforesis del ADN de las cepas B12N y B20A.



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

Figura N° 07. Electroforesis de PCR de las cepas B12N y B20A.



BLAST), que mayor similitud presenta con la bacteria problema, indicando el porcentaje de identidad y el porcentaje de la secuencia que ha sido comparada.

## DISCUSIÓN

### Aislamiento

La muestra extraída de la fuente termal T<sub>3</sub> permitió el mayor número de UFC con  $6,3 \times 10^3$  UFC ml<sup>-1</sup> en el medio de aislamiento selectivo con CMC, posiblemente sus características fisicoquímicas son favorables para el desarrollo de microorganismos productores de celulasas, como la temperatura de 70 °C y pH neutro, que facilitan que bacterias esporógenas y actinomicetos incrementen su actividad y por ende su población (Granados & Valderrama, 2003). Además la naturaleza de la muestra tipo tapetes microbianos se caracteriza por presentar altas densidades de población de microorganismos y es utilizada con éxito para recuperar nuevos organismos. Los tapetes microbianos además de presentar en su mayoría comunidades fotoautótrofas, también poseen comunidades quimioorganotrofas característico de los microorganismos con celulasas (Nord & Wald, 1995; De Beer & Kühl, 2001).

De los 31 cultivos bacterianos aislados hay una predominancia de bacterias Gram positivas con 61,29 %, sin embargo Valdez (2011) reportó predominancia de bacterias Gram negativas en los géiseres evaluados de Calientes, esto debido a que según Debord (1925) las bacterias termófilas suelen presentar una coloración Gram variable, donde ciertos organismos termófilos que forman esporas son Gram negativos a las 24 h y Gram positivas a las 8 h, debido a su metabolismo muy acelerado.

### Actividad cualitativa

Se sabe que las celulasas bacterianas tienen actividades bastantes altas y más termoestables comparadas con las celulasas fúngicas (Swaroop et al., 2004), teniendo en cuenta esta ventaja, se pre-seleccionaron 6 cultivos con actividad de celulasas, con halos de hidrólisis significativos, indicando su habilidad para producir celulasas, dado que el colorante Rojo Congo presenta fuertes interacciones con polisacáridos unidos por enlaces β-1,4 así como significativas interacciones con β-1,3 - D - glucanos, al producirse la hidrólisis de estos compuestos, las interacciones entre el colorante y los polisacáridos se pierden, notándose áreas desteñidas correspondientes al área en el que la bacteria secretó las celulasas.

### Actividad cuantitativa de endoglucanasas

Al optimizar los factores de pH y temperatura, de los cuales, según Nataraja et al. (2010), depende la mayor actividad enzimática de endoglucanasas. Se obtuvo para la cepa B12N de una gradiente de temperaturas entre 60 y 80 °C con pH de entre 4,4 y 8,4 que el pH óptimo es 5,9 y la temperatura 67,5 °C, registrando una actividad máxima de 0,56 UI ml<sup>-1</sup>, valor mayor al registrado por Montoya (2012) quien reporta una actividad de 0,34 UI ml<sup>-1</sup> a un valor óptimo a 65 °C y un pH de 6 para una cepa de *Bacillus* sp. BH19.

Para la cepa B20A se observó de una gradiente entre 50 y 75 °C con un pH entre 4,4 y 9,4 que el pH óptimo

es 6,4 y la temperatura 59,5 °C, dando una actividad máxima de 0,27 UI ml<sup>-1</sup>, valores similares a los reportados por Montoya (2012) y Li et al. (2008), en la cepa de *Bacillus* sp. BH62 y *Bacillus subtilis*, sin embargo la cepa B20A presenta ventaja sobre las estudiadas por presentar una temperatura óptima superior en 14 y 10 °C respectivamente.

Por lo tanto de acuerdo a la temperatura óptima para su actividad enzimática, se puede considerar a las enzimas termoestables, tal como Rastogi et al. (2010) consideró endoglucanasas termoestables a 70 °C y un pH óptimo de 5 en cepas de *Geobacillus* y *Bacillus* aisladas de muestra de compost; Bischoff et al. (2006) encontraron endoglucanasas termoestables a 65 °C a un pH 6 en *Bacillus licheniformis*. Dichas enzimas son de importancia en bioprocesamientos, por las posibilidades de almacenamiento prolongado (a temperatura ambiente), el aumento de la tolerancia a disolventes orgánicos, la reducción del riesgo de contaminación, así como las pérdidas de baja actividad durante el procesamiento, incluso a las temperaturas elevadas a menudo utilizadas en el pre-tratamiento de la materia prima (Kristjansson, 1989; Pernilla et al., 2007).

### Determinación de biomasa y cuantificación de proteínas solubles

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

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

Otro de los parámetros a tener en cuenta en la selección de microorganismos celulolíticos es la actividad enzimática en función a la biomasa (AEB), de donde se observó ventajas en las cepas termófilas seleccionadas, con un rendimiento bastante promisorio, ya que al generarse una baja biomasa se produce valores significativos de actividad enzimática obteniéndose valores de 11,2 UI mg<sup>-1</sup> y 4,5 UI mg<sup>-1</sup> para las cepas B12N y B20A respectivamente, superando a lo reportado por Ramírez y Coha (2003) quienes obtuvieron 1,18 y 0,90 UI mg<sup>-1</sup> de biomasa para *Streptomyces* sp. 28CMC2 y *Thermomonospora curvata* 7CMC8.

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



### Análisis del secuenciamiento del ARNr 16S

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

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

### CONCLUSIONES

Las fuentes termales de Calientes, Candarave - Tacna, muestran un gran potencial ya que poseen bacterias con celulasas de interés industrial, donde el 77,42 % de los 31 cultivos bacterianos aislados presentan zonas de hidrólisis en CMC.

Se logró determinar cuantitativamente y optimizar los factores (temperatura y pH) de los que depende la actividad de endoglucanasas, obteniéndose 0,56 UI ml<sup>-1</sup> a 67,5 °C y un pH 6 y 0,27 UI ml<sup>-1</sup> a 59,5 °C y un pH 6,4; para las cepas B12N y B20A respectivamente.

La temperatura óptima para la mayor actividad enzimática registrada fue superior a la temperatura de crecimiento, por lo tanto las enzimas aisladas son consideradas termoestables.

La producción de biomasa de las cepas seleccionadas no fue en su totalidad directamente proporcional al nivel de producción de endoglucanasas, indicando su independencia con el crecimiento bacteriano, por lo tanto podrían ser enzimas adaptativas.

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

### AGRADECIMIENTO

Al Laboratorio de Micología y Biotecnología (LMB) de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. & Sani, R. (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, 128 pp. 751-759.
- Bischoff, K., Rooney, A., Li, X., Liu, S. & Hughes, S., (2006). Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Journal of Biotechnology Lett*, 28(21) pp. 1761-5.
- Cruz, V., Frich, V. & Matsuda, K. (2010). Geochemical characterization of thermal waters in the Calientes geothermal field, Tacna, South of Peru. *Proceedings world geothermal congress 2010*, Indonesia. p.1.
- De Beer, D. & Kühl, M. (2001). *Interfacial microbial mats and biofilms*. In: Boudreau, B. Jorgensen, B. (Eds.), *The Benthic Boundary Layer*, Oxford University Press, New York, pp. 374-394.
- Debord, G. (1925). Reaction to Gram's stain by certain spore-forming bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 22 pp. 397-398.
- Ghose, T. (1987). *Measurement of cellulase activities*. Pure and Applied Chemistry, 59 (2) pp. 257-268.
- Granados, L. & Valderrama, J. (2003). *Evaluación de la actividad proteolítica y amilolítica de actinomicetes termofílicos aislados a partir de pilas de compost*. Tesis de pregrado en Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Hernández A., García E. & Romero H. (1999). Celulosomas: sistemas multienzimáticos. *Revista Sociedad Química de México* 43 (3-4) pp. 137-142.
- Hongpattarakere T. (2002). Hyperthermostable cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their biotechnological applications. *Songklanakarinn Journal Science & Technology*. 24(3) pp. 481-491.
- Kristjansson, JK. (1989). *Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes*. Trends in Biotechnology, 7 pp. 349-353.
- Kublanov, I., Perevalova, A., Slobodkina, G., Lebedinsky, A., Bidzhieva, S., Kolganova, T., Kaliberda, E., Rumsh, L., Haertle, T. & Bonch - Osmolovskaya, E. (2009) *Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia)*. Applied and Environmental Microbiology, 75(1) pp. 286-291.
- Li, W., Zhang, W., Yang, M., & Chen, Y., (2008). Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biotechnology*, 40 (2) pp. 195-201.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. & Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 pp. 265-275.
- Lymar, E., Li, B. & Renganathan, V. (1995). *Purification and Characterization of a cellulose-binding β-glucosidase from cellulose degrading cultures of Phanaerochaete chrysosporium*. Applied Environmental Microbiology, 8 pp. 2976-2980.
- Lynd, L., Weimer, P., Zyl, W. & Pretorius, I. (2002). *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology*. USA. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66(3) pp. 506- 577.
- Mandels, M. & Reese, E. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal of Bacteriology*, 73(2) pp. 269-278.
- Martínez, A., Speranza, M., Ruiz Dueñas, F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martínez, M., Gutiérrez, A. & Del Río, J. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of fungal attack of lignin. *International Microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 8(3) pp. 195-204.



- Meza, V., Moreno, P., Tengerdy, R. & Gutiérrez, M. (1995). Transfer of a benomyl resistance marker by heat-inactivated *Trichoderma reesei* protoplasts. *Biotechnology Letters*, 17(8) pp. 827-832.
- Miller, L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 pp. 426-428.
- Montoya, R. (2012). Selección de cepas de *Bacillus sp. potenciales para la producción de hidrolasas*. Centro Nacional de Pesquia en Energia e Materiais. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.
- Nataraja, S., Chetan, D. & Krishnappa, M. (2010). Effect of temperature on cellulose enzyme activity in crude extracts isolated from solid wastes microbes. *International Journal of Microbiology Research*, 2 (2) pp. 44-47.
- Nord, S. & DM, Ward. (1995). Diverse *Thermus* species inhabit a single hot spring microbial mat. *Systematic and Applied Microbiology*, 18 pp. 274-278.
- Pérez, J., Muñoz, J., De la Rubia, T. & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5(2) pp. 53-63.
- Pernilla, T., Gashaw, M. & Nordberg, E. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Journal of Microbial Cell Factories*, pp. 6-9.
- Ramírez, P. & Cocha, J. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*, 10(1) pp. 67-77.
- Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikar, A., Bischoff, K., Hughes, S., Christopher, L. & Sani, R. (2010). Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Journal of Bioresource Technology*, 101(22), pp. 8798-8806.
- Sambrook, J. & Russell, D. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. (1994). *Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44 pp. 846-849.
- Swaroopa, D. Thirumale, S. & Nand, K. (2004). Production of cellulose by *Clostridium papyrosolvans* CFR-703. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 pp. 629-632.
- Teather, R. & Wood, P. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43 (4) pp.777-780.
- Valdez, Y. (2011). Caracterización molecular y determinación de la diversidad microbiana para bacterias y arqueas hipertermófilas de los géiseres de Calientes, Candarave, Tacna- Perú. Tesis de pregrado en Biología. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna.
- Wessel, D. & Fluegge, U. (1984). *Analytical Biochemistry*, 138 pp. 141-143.
- Zhang, Y., Himmel, M. & Mielenz, J. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24 pp. 452- 481.

**Correspondencia:**

Helena Beatriz Zapata Málaga: hbzapata@gmail.com

Roberto Castellanos C.: robertocastellanoscabrera@yahoo.es

Fecha de Recepción: 17/10/2014

Fecha de Aceptación: 03/12/2014