

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela de Formación Profesional de
Ciencias Biológicas

**“AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS
PRODUCTORES DE CELULASAS ALCALINAS DE AGUAS
TERMALES Y SUELOS DE BOSQUES DE CONTAMANA”**

TESIS

Requisito para optar el título profesional de

BIÓLOGO

AUTOR:

BERNARDINA YOLANDA CORTEZ CAMACHO

IQUITOS-PERÚ

2015

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



Blga. Teresa de Jesús Morí del Águila, MSc.
Presidenta



Blgo. Jorge Luis Marapara del Águila, Dr.
Miembro

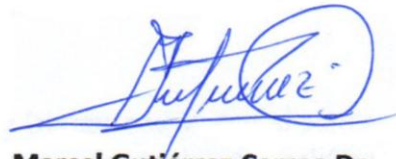


Blgo. Freddy Orlando Espinoza Campos, MSc.
Miembro

ASESORES



Microblgo. Alvaro Benjamin Tresierra Ayala Dr.



Blgo. Marcel Gutiérrez Correa Dr.



Blga. Gretty Katherina Villena Chavez Dra.



UNAP

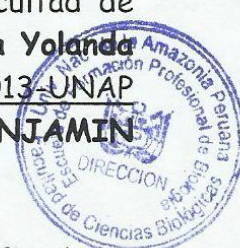
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Dirección de Escuela de Formación Profesional de Ciencias Biológicas

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Iquitos, 18 de diciembre de 2015



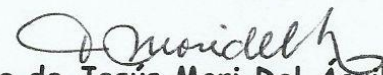
En la ciudad de Iquitos, a los dieciocho (18) días del mes de diciembre de 2015 y, siendo las 10.05 a.m horas; se reunió en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de Tesis que suscribe, designado con RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 087-2013-DEFP-B-UNAP, presidido e integrado por: Blga. **TERESA DE JESÚS MORI DEL ÁGUILA, M.Sc., (Presidente)**; Blgo. **JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr. (Miembro)**; Blgo. **FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Mgr., (Miembro)**; para escuchar, examinar y calificar la sustentación y defensa de la tesis titulada: **"AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS ALCALINAS DE AGUAS TERMALES Y SUELOS DE BOSQUES DE CONTAMANA"**, realizado por la bachiller de la Facultad de Ciencias Biológicas-Escuela de Formación Profesional de Ciencias Biológicas: **Bernardina Yolanda Cortez Camacho** de la Promoción II-2012, graduada de Bachiller con R.R. N° 0504-2013-UNAP de fecha 21 de febrero de 2013; reconociendo como asesor: Mblgo. **ÁLVARO BENJAMÍN TRESIERRA AYALA, Dr.**



Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos, aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 206-2012-FCB-UNAP; realizó la evaluación del desempeño de la bachiller, considerando los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por la bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dio como veredicto: APROBADO Muy Buena LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS, CALIFICADA COMO Muy Buena; quedando en consecuencia la candidata apta para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del Título Profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 11.35 a.m horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente Acta de Sustentación por triplicado.


Teresa de Jesús Mori Del Águila
PRESIDENTE


Jorge Luis Marapara del Águila
MIEMBRO


Freddy Orlando Espinoza Campos
MIEMBRO

DEDICATORIA

Este trabajo realizado se la dedico a mi mami Juana Irma Camacho, aunque ya no está presente en cuerpo, desde donde este ella me da fuerzas para continuar con mis anhelos y a mi papá Cesario Cortez por apoyarme e incentivar me en todo momento y demostrarme que puedo alcanzar mis sueños.

A mi hermano Cesar Cortez Camacho, a mi futuro esposo Roman Donat y a mi tía Irene Camacho Lira, por preocuparse por mi integridad, darme aliento y comprensión.

AGRADECIMIENTO

- Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios, por la salud y a todas las personas que de uno u otro modo han permitido culminar este logro anhelado.
- A mi estimado asesor, Dr. Marcel Gutiérrez Correa, por ser uno de los grandes maestros que sigue formando profesionales de excelencia, por brindarme el apoyo incondicional, sus enseñanzas y por permitirme formar parte del laboratorio de Micología y Biotecnología.
- A mí querida asesora Dra. Gretty Villena Chávez, por brindarme la confianza, apoyo, escucharme, comprenderme y permitir afianzar mis conocimientos en la realización del trabajo, a su vez ser un ejemplo modelo accediendo entrar al mundo de la investigación.
- A mi querido asesor Dr. Álvaro Tresierra Ayala, por ser un gran maestro, amigo y ser la persona que motivó a explorar el mundo de la microbiología, brindarme su confianza, su apoyo incondicional y experiencias en la culminación de este trabajo.
- A la Universidad Nacional Agraria la Molina y al Fondo para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCyT) por el financiamiento de la tesis. A la Sra María Pasmíño Pezo, que es como una madre para todos, por seguir aconsejando, comprendiendo y trabajando en equipo; a mis compañeros y

amigos con los que compartí experiencias, tristezas y alegrías en el laboratorio y porque demostraron ser un gran equipo de trabajo.

- A los integrantes del doctorando, en especial al Ing. Víctor Sarmiento Casavilca por apoyarme cuando más lo necesite, sus experiencias y consejos que lograron mis objetivos. A Sujay Paul, por ser un amigo, brindarme su apoyo y con ello compartir sus experiencias en Biología Molecular y Bioinformática, con la finalización del trabajo.
- A cada persona con la que me encontré en el camino, que influyó en mí para la realización de este trabajo.

INDICE

CONTENIDO

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	Fehler! Textmarke nicht definiert.
ASESORES	iii
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	vii
INDICE	viii
LISTA DE ILUSTRACIONES.....	x
LISTA DE CUADROS	xvii
RESUMEN	xviii
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	4
III. OBJETIVOS	12
1) Objetivo general	12
2) Objetivos específicos	12
IV. MATERIALES Y METODOS.....	13
1) Descripción del área de estudio	13
2) Materiales y equipos.....	14
3) Método	21
3.1 Recolección de muestras.....	21
3.2 Aislamiento primario.....	21

3.3	Tamizado secundario	23
4)	Identificación molecular	26
4.1.	Extracción de ADN.....	26
A.	Extracción de ADN de bacterias	26
B.	Extracción de ADN de hongos	28
4.2.	Amplificación de ADN mediante PCR.....	30
4.3.	Reacción de cadena de polimerasa (PCR)	31
4.4.	Secuenciamiento de ADN y análisis filogenético	33
5)	Evaluación de la temperatura de crecimiento de hongos.....	34
6)	Cuantificación de actividad celulolítica	35
6.1	Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	36
7)	Análisis Estadístico	39
V.	RESULTADOS.....	41
1)	Aislamiento primario de cepas productoras de celulasas neutroalcalinas	41
2)	Tamizado secundario de cepas productoras de celulasas neutroalcalinas.....	42
3)	Identificación molecular de las cepas seleccionadas.....	46
4)	Evaluación de temperatura de crecimiento de hongos	52
5)	Cuantificación de actividad celulolítica	53
VI.	DISCUSIÓN	79
VII.	CONCLUSIONES	83
VIII.	RECOMENDACIONES	84
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	85

X. ANEXOS.....	100
ANEXO 01: Sitios de muestreo del Circuito turístico Aguas Calientes	101
ANEXO 02: Fotografías de halos de hidrólisis.....	103
ANEXO 03: Tinción Gram, Tinción Dörner y observación en fresco	104
ANEXO 04: Gráficas de las secuencias del termociclador	110
ANEXO 05: Cromatograma procesado de Macrogen	111
ANEXO 06: Biomasa obtenida de hongos.....	112
ANEXO 07: Microplaca y curva usados en el método (DNS)	113
ANEXO 08: Preparación de reactivos y soluciones	114
ANEXO 09: Cálculos para la conversión a unidades enzimáticas	118

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 01: Hidrólisis enzimática de la celulosa. (Fuente, Sánchez et al [33])	5
Figura 02: Mapa de la provincia de Ucayali.....	13
Figura 03: Flujograma de trabajo para seleccionar e identificar cepas productoras de celulasas neutroalcalinas a partir de muestras de agua y sedimento de Aguas Calientes.	40
Figura 04: Microorganismos productores de celulasas neutroalcalinas aislados de muestras de agua y suelo de Aguas Calientes.....	44
Figura 05: (a) Gel de electroforesis de extracción ADN fúngico; (b) gel de electroforesis de extracción ADN bacteriana.....	47

Figura 06: (a) Gel de electroforesis de PCR fúngico, control + <i>A. niger</i> ; (b) gel de electroforesis de PCR bacteriana de muestras de agua.....	48
Figura 07: (a) Gel de electroforesis de PCR de bacterias de muestras de suelo; (b) gel de electroforesis de PCR de bacterias de muestras de agua y suelo, control + fue <i>E.coli</i>	48
Figura 08: Árbol filogenético de las cepas bacterianas de aguas termales en Aguas Calientes construido a partir de la secuencia del gen 16S rRNA	50
Figura 09: Árbol filogenético construido con la secuencia de regiones intergénicas ITS1 e ITS4 de las cepas fúngicas de suelo en Aguas Calientes.....	51
Figura 10: Variación de la biomasa de cepas fúngicas de celulasas neutroalcalinas en diferentes temperaturas de crecimiento.	52
Figura 11: Comparación de la biomasa de hongos productores de celulasas neutroalcalinas a 50°C.....	53
Figura 12: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de agua a diferentes pH e incubados a 50°C.....	54
Figura 13: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de agua a diferentes pH e incubados a 60°C.....	55
Figura 14: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de agua a diferentes pH e incubados a 70°C.....	56
Figura 15: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa y las cepas.....	58
Figura 16: El gráfico muestra el comportamiento de la actividad de cada cepa en función de la temperatura y el pH.....	58

Figura 17: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa a diferentes temperaturas.....	59
Figura 18: El gráfico muestra la actividad de cada temperatura en función de las cepas.....	60
Figura 19: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa a diferentes pH.	61
Figura 20: El gráfico muestra la actividad de cada pH en función de las cepas.	61
Figura 21: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 50°C.	62
Figura 22: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 60°C.	63
Figura 23: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 70°C.	64
Figura 24: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa entre las cepas..	66
Figura 25: El gráfico muestra la actividad de cada cepas entre la temperatura y pH.	67
Figura 26: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa entre la temperatura..	68
Figura 27: El gráfico muestra la actividad endoglucanasa de cada temperatura respecto a las cepas.....	69
Figura 28: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa entre los diferentes pH..	70

Figura 29: El gráfico muestra el comportamiento de la actividad endoglucanasa a cada pH en función de las cepas.	71
Figura 30: Comparación de la actividad endoglucanasa de los hongos aislados de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 50°C.	71
Figura 31: Comparación de la actividad endoglucanasa de los hongos aislados de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 60°C.	72
Figura 32: Comparación de la actividad endoglucanasa de los hongos aislados de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 70°C.	73
Figura 33: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa y las cepas fúngicas.	74
Figura 34: El gráfico muestra la actividad endoglucanasa de cada cepa y los diferentes pH y temperatura.	75
Figura 35: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa en función a la temperatura.	76
Figura 36: El gráfico muestra el comportamiento de la actividad endoglucanasa en cada temperatura en función de las cepas y pH.	76
Figura 37: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa y los diferentes pH.	77
Figura 38: El gráfico muestra la actividad endoglucanasa de cada cepa en función a los diferentes pH.	78
Figura 39: Ubicación geográfica de los puntos muestreados en Aguas Calientes con Google Earth.	101

Figura 40: (a) Suelo de Contamana, (b) colecta de suelo.	102
Figura 41: (a) Agua termal correspondiente al punto de muestreo (AC1), (b) toma de temperatura y pH, (c) colecta de agua.	102
Figura 42: (a) Agua termal correspondiente al punto de muestreo (AC3), (b) colecta de sedimento.....	102
Figura 43: (a) Fotografía del aislamiento primario de muestra de agua (AC1); (b) Fotografías del aislamiento primario de muestras de suelos.	103
Figura 44: Placas de vidrio a diferentes pH (7,4; 8,4; 9,4 y 10,4 respectivamente).	103
Figura 45: Algunas fotografías de las cepas bacterianas con Rojo Congo al 0,1%, se observa los halos de hidrólisis con CMC al 1%.	103
Figura 46: Observación microscópica en microfotografía en luz blanca a 1000X y coloración Gram de cepas de muestras de agua: a) LMB-AC1, b) LMB-AC2, c) LMB-AC3, d) LMB-AC6, e) LMB-AC7 y f) LMB-AC10.	105
Figura 47: Observación microscópica en microfotografía en luz blanca a 1000X y coloración Gram de cepas de muestras de suelo: a) LMB-SC2, b) LMB-SC3, c) LMB-SC4, d) LMB-SC5, e) LMB-SC8 y f) LMB-SC10.	106
Figura 48: Observación microscópica en microfotografía de tinción de esporas por la técnica de Dörner en luz blanca a 1000X de cepas aisladas de muestras de agua: a) LMB-AC1, b) LMB-AC2, c) LMB-AC3, d) LMB-AC6, e) LMB-AC7, f) LMB-AC10.	107

Figura 49: Observación microscópica de tinción de esporas por la técnica de Dörner en microfotografía en luz blanca a 1000X de cepas aisladas de suelo: a) LMB-SC2, b) LMB-SC3, c) LMB-SC4, d) LMB-SC5, e) LMB-SC8, f) LMB-SC10.	108
Figura 50: Observación microscópica en microfotografía en luz blanca a 400X de cepas fúngicas de muestras de suelo: a) LMB-HAC7, b) LMB-HAC8, c) LMB-HAC9, d) LMB-HAC10.....	109
Figura 51: Gráfica de la secuencia empleada en el termociclador de ADN bacterianas.	110
Figura 52: Gráfica de las secuencias empleadas en el termociclador de ADN fúngicas.....	110
Figura 53: Los cromatogramas 518F y 800R procesados de la empresa Macrogen. La secuencia pertenece a la cepa bacteriana LMB-AC1	111
Figura 54: Cepas de hongos en placas de PDA y su respectiva biomasa en papel filtro de peso seco: LMB-HAC7, LMB-HAC8, LMB-HAC9 y LMB-HAC10.....	112
Figura 55: Reacción de la actividad con el reactivo DNS en la microplaca de PCR de 96 pozos. La mejor cepa es LMB-AC3.....	113
Figura 56: Curva estándar de glucosa, elaborada con el método de DNS para microplacas (King et al [87]).	113

LISTA DE CUADROS

Cuadro 01: Número y porcentaje de los aislamientos totales de cepas productoras de celulasas neutroalcalinas con los diferentes métodos probados	41
Cuadro 02 : Número y porcentaje de cepas totales seleccionadas por presentar mayor halo de hidrólisis en carboximetilcelulosa	43
Cuadro 03: Diámetro de los halos de hidrólisis sobre CMC de las cepas bacterianas y fúngicas con actividad endoglucanasa a pH 7,4.....	45
Cuadro 04: Análisis de varianza para actividad - suma de cuadrados tipo III	56
Cuadro 05: Pruebas de múltiple rangos para actividad por cepa	57
Cuadro 06: Pruebas de múltiple rangos para actividad por temperatura	59
Cuadro 07: Pruebas de múltiple rangos para actividad por pH.....	60
Cuadro 08: Análisis de varianza para actividad endoglucanasa - suma de cuadrados tipo III.....	64
Cuadro 09: Pruebas de múltiple rangos para actividad (UI/ml) por cepa.....	65
Cuadro 10: Pruebas de múltiple rangos para actividad (UI/ml) por temperatura.....	67
Cuadro 11: Pruebas de múltiple rangos para actividad endoglucanasa por pH	69
Cuadro 12: Análisis de varianza para actividad - suma de cuadrados tipo III	73
Cuadro 13: Pruebas de múltiple rangos para actividad por cepa	74
Cuadro 14: Pruebas de múltiple rangos para actividad por temperatura	77
Cuadro 15: Pruebas de múltiple rangos para actividad por pH.....	75

Cuadro 16: Los datos recolectados in situ de las muestras con sus respectivas coordenadas, pH y temperatura.	101
Cuadro 17: Procedimiento de tinción Gram (diferenciar dos grandes grupo Gram+, Gram-).....	104

RESUMEN

En la actualidad existe una gran demanda de productos y procesos biotecnológicos, tales como aquellos catalizados por enzimas, que representan una alternativa a los procesos químicos convencionales [1]. Sin embargo, el desarrollo de nuevos productos y procesos está limitado a las enzimas que han sido estudiadas en microorganismos no extremófilos, lo que implica un estudio profundo de la diversidad microbiana extremófila.

En este contexto, el objetivo de la presente investigación fue aislar bacterias y hongos termófilos celulolíticos de aguas termales y suelos de Aguas Calientes, ubicado en Contamana, Iquitos-Perú. El aislamiento de las bacterias se realizó a partir de muestras filtradas, muestras directas y muestras enriquecidas con celulosa microgranular. Se utilizó medio de aislamiento con carboximetilcelulosa (0,5% y xilosa 0,5% como fuente de carbono) y a 70°C a pH 7,4; el mismo medio se usó en hongos a 40°C y pH 7,4. La selección se hizo sobre placas con carboximetilcelulosa mediante la tinción con Rojo Congo al 0,1%. Se aislaron 120 cepas inicialmente, 26 cepas fueron elegidas mostrando mayor halo de hidrólisis en CMC, de las cuales 22 correspondieron a bacterias y 4 a hongos. En hongos, la producción de biomasa varió en el rango de 37°C a 50°C, siendo las cepas LMB-HAC7 y LMB-HAC9 las que creció mayor biomasa a 50°C. En bacterias, el crecimiento se dio a 70°C para todas las cepas. En el ensayo semi-cuantitativo las cepas con mayor capacidad de

hidrólisis en bacterias fueron LMB-AC3, LMB-AC9, LMB-AC13 y LMB-SC5. En el caso de hongos fue la cepa LMB-HAC9.

Respecto a la actividad enzimática de endoglucanasa, las mayores actividades se obtuvieron en bacterias comparadas con las cepas de hongos. La cepa bacteriana LMB- AC3 mantuvo su actividad en el rango de pH entre 7,4 y 10,4 con un promedio de 6,8 UI/ml a 60°C. La cepa fúngica LMB-HAC9 obtuvo la mayor actividad a pH 7,4 con un promedio de 2,3 UI/ml a 60°C.

La identificación molecular fue confirmada por análisis de secuenciación de los productos de PCR usados con los primers universales 27_ f, 1492_ r para bacterias y para hongos ITS1 e ITS4, dando como resultado con un 99% de similitud a los géneros *Geobacillus*, *Bacillus* y *Aspergillus* respectivamente.

Los resultados obtenidos demuestran la presencia de microorganismos productores de celulasas alcalinas en Aguas calientes.

Palabras claves: Carboximetilcelulosa, Endoglucanasa, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Aspergillus*.

I. INTRODUCCION

El suelo es considerado como uno de los principales reservorios que poseen una inmensa diversidad microbiana, los principales polímeros vegetales sujetos a degradación microbiana en los hábitats del suelo incluyen a la celulosa, hemicelulosas y lignina [2,3,4], siendo la lignocelulosa el polímero más abundante en la naturaleza, constituido principalmente por celulosa [5]. Las características de la celulosa han sido diversamente investigadas [2, 3, 4, 6,7, 8,9].

La descomposición de la celulosa se da naturalmente por microorganismos como: protozoarios, bacterias [10, 11, 12,13] y hongos, [14,15] mediante la acción de varias enzimas no asociadas en complejos, como en los hongos filamentosos y en algunos actinomicetos o formando un complejo denominado "celulosoma", como en los clostridios y en bacterias del rumen [16, 17].

En las últimas décadas se descubrió que se pueden encontrar comunidades microbianas en condiciones más diversas, como condiciones extremas de temperatura, pH, presión y concentración de sal, disponibilidad de agua, alta radiación, metales pesados y compuestos tóxicos; por esta razón estos microorganismos son denominados extremófilos, las cuales producen enzimas que son de gran importancia biotecnológica [18, 19].

Los microorganismos celulolíticos desempeñan un papel relevante en la biosfera reciclando la celulosa, las cuales tienen aplicaciones potenciales, no solo de interés industrial, sino también cuentan con propiedades fisiológicas que facilitan su explotación con propósitos comerciales. Los hongos son los organismos más estudiados porque tienen la facilidad de colonizar rápidamente el sustrato produciendo diferentes complejos enzimáticos, entre ellos el complejo enzimático celulasa, que intervienen en la descomposición de la celulosa, constituido principalmente por tres tipos de enzima; endoglucanasas, exoglucanasas y beta-glucosidasas; estas actúan sinérgicamente en la degradación de la celulosa liberando moléculas de glucosa [20].

Las celulasas más comerciales tienen una actividad óptima en pH ácido [21], sin embargo, también encontraron enzimas con actividad óptima a pH neutro a alcalino, y éstos se están incorporando gradualmente en los procesos de tratamiento de fibra, especialmente en el pulido y lavado de procesamiento del drill de algodón de la industria textil [22, 23, 24], así como en la industria de detergentes [25]. Las celulasas pueden ser empleadas en diferentes industrias como alimentos, textiles, papel, con la finalidad obtener un producto con mejores propiedades y características, aumentando su valor agregado, reduciendo los costos y sin contaminar el ambiente [26]. Por lo que resulta atractivo escrutarlos en búsqueda de enzimas novedosas con mejores actividades [27].

Se han reportado varios estudios de enzimas celulasas en hongos; sin embargo, existe muy poca información sobre las celulasas extremófilas que podrían ser obtenidas mediante el aislamiento de microorganismos de ambientes extremos como aguas y sedimentos termales [28].

El Perú constituye una plataforma de ambientes extremos en su territorio, que requiere enorme esfuerzo y recursos para estudiar, investigar y desarrollar tecnologías. Una de ellas es Contamana que cuenta con aguas termales que son una de las pocas que no han sido disturbadas y para las cuales aún no hay estudios sobre diversidad microbiana y particularmente para este estudio, la selección de microorganismos termófilos productores de celulasas alcalinas a partir de aguas termales y suelos de bosques de selva.

La industria está demandando continuamente procesos más limpios y económicos, por lo que surge la importancia de cubrir esta necesidad. En virtud de ello, los objetivos del presente trabajo fueron aislar microorganismos productores de celulasas alcalinas a partir de aguas termales y suelos de bosques de Contamana.

II. REVISION DE LITERATURA

Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. La sustancia sobre la que actúa la enzima se llama sustrato. El sustrato se une a una región concreta de la enzima, denominada centro activo [29].

Existen diversos complejos enzimáticos lignocelulolíticos, tales como: celulasas (glucanasas, β -glucosidasas), hemicelulasas (xilanasas, acetil-esterasas, etc.) y ligninasas (lacasas, lignina peroxidadas, manganeso peroxidadas) [30]. Sin embargo, la actividad máxima de degradación de la celulosa no se da por enzimas individuales, sino por mezclas de tres o más enzimas [31].

Las celulasas son enzimas complejas que se encargan de la degradación de la celulosa denominadas también glicosil hidrolasas o glicohidrolasas, pueden hidrolizar oligosacáridos o polisacáridos de glucosa, consta de dos unidades importantes una que rompe los enlaces de hidrogeno liberando de esta manera cadenas de glucosa susceptibles a una segunda hidrólisis, y la otra unidad que se encarga de hidrolizar estas cadenas hasta celobiosa y glucosa [32]. El mecanismo de acción de las celulasas se muestra en la figura 01.

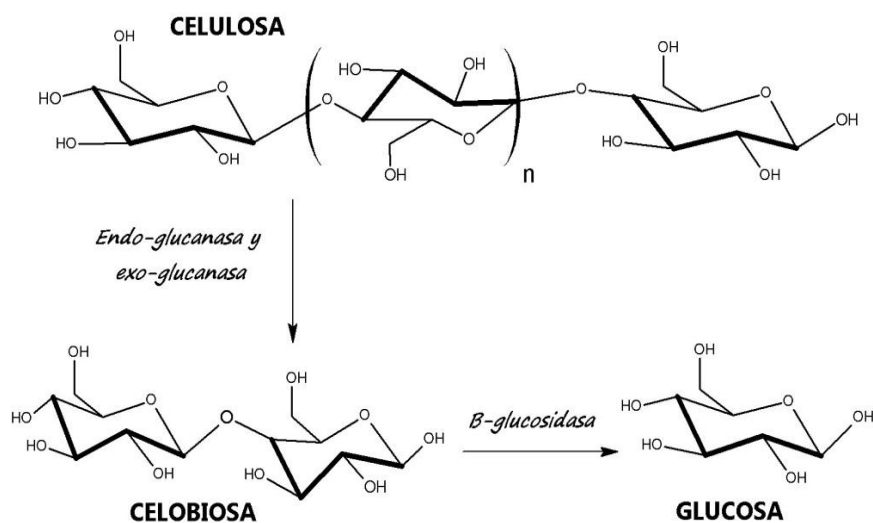


Figura 01: Hidrólisis enzimática de la celulosa. (Fuente, Sánchez et al [33])

La actividad enzimática de las celulasas puede evaluarse de dos formas: medición de la actividad individual de cada celulasa (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas); medición de la actividad total de las celulasas [34].

Actúan al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos accesibles de cadena de celulosa para producir oligosacáridos de varias longitudes endoglucanasa (1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasa, carboximetilcelulasas o CMCasa), exocelobiohidrolasa (1,4- β -D-glucan glucohidrolasa) y β -glucosidasa (β -D-glucosideglucohidrolasa) [35, 36, 37,38].

Su actividad es con frecuencia medida sobre celulosa soluble con alto grado de polimerización, como es el CMC (carboximetilcelulosa). La acción de las endoglucanasas sobre este sustrato celulósico se caracteriza por la disminución de la viscosidad realizando fracturas intramoleculares [34] y /o en el incremento de extremos reductores que se determinan por técnicas que permitan medir azúcares reductores [39]. Además, la tasa de hidrólisis está condicionada a la habilidad de las

endoglucanasas para actuar en las regiones amorfas de la matriz cristalina de la celulosa y crear nuevos extremos reductores en los cuales las exoglucanasas pueden actuar [40]. Por el cual, es recomendable que la actividad de las endoglucanasas sea medida por ambos métodos (Viscosidad y extremos reductores) [39].

Además, las actividades elevadas de endoglucanasas se correlacionan con la formación de un gran halo de hidrólisis de celulosa ablandada con respecto a la actividad enzimática [14]. Así dicha actividad puede ser fácilmente detectada en medios con CMC o celulosa con la adición de colorantes como el Rojo Congo, debido a que son adsorbidos sólo por largas cadenas de polisacáridos aun no hidrolizadas facilitando así la diferenciación entre microorganismos celulolíticos y no celulolíticos por la formación de zonas de aclaramiento [41,42]. Este método es semi-cuantitativo y muy adecuado cuando se requiere procesar un gran número de muestras [43].

La formación de productos de la hidrólisis frecuentemente se mide mediante el método del DNS ó el método de Nelson Somogy que es usado como método colorimétrico. Además, como reactivo sensible a los productos de reacción y poca interferencia con la celulasa [44], empleando glucosa como reactivo patrón para la obtención de la curva de calibrado del método. Este procedimiento se fundamenta en la reacción de los grupos reductores de los productos de la reacción catalítica, con el reactivo oxidante ácido dinitrosalicílico (DNS) [45].

La celulosa es rápidamente hidrolizada en la naturaleza por organismos aeróbicos del suelo, particularmente por los hongos que degradan la madera [46]. Los hongos tanto por su capacidad hidrolítica como por su distribución, son los organismos lignocelulolíticos por excelencia. Las enzimas más activas bajo condiciones de cultivo (agar papa dextrosa en cinco generaciones) son la endoglucanasa y la exoglucanasa, y la de menor actividad la β -glucosidasa [47]. Por ejemplo, se realizaron estudios en cepas de *Trichoderma curvata* 7CMC8 y *Streptomyces sp.* 8CMC2 que presentaron actividades enzimáticas de 2,72 y 2,49 UI/ml para la endo- β -1,4-glucanasa respectivamente [48].

Además, existen bacterias mesófilas degradadoras de la celulosa aerobias como *Cellulomonas sp.*, *Cytophaga sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Vibrio sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*; algunas anaeróbicas como lo son *Acetovibrio cellulolyticus*, *Butirivibrio sp.*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium cellulovorans*, *Ruminococcus albus*, *Rumimococcus flavefaciens* [17].

También, existen diversos estudios de la composición microbiana de fuentes termales donde se han encontrado variedad de cepas termófilas pertenecientes a los géneros *Brevibacillus*, *Thermus*, *Thermobifida*, *Thermomonospora*, *Paenibacillus*, *Cohnella*, *Clostridium Anoxybacillus*, *Microbispora*, *Moorella*, *Geobacillus*, etc., con temperaturas óptimas de crecimiento desde 40 a 94°C, aeróbicos y/o anaeróbicos con amplia diversidad metabólica [49] y producción de enzimas termoestables [50]. Actualmente, la enzima que *Thermus aquaticus* emplea para replicar su ADN,

llamada ADN polimerasa taq, es utilizada como componente esencial en las reacciones de PCR [51].

Existen estudios para determinar la diversidad microbiana en diferentes ecosistemas mediante el análisis molecular del ARNr16S en procariontes y ARNr18S en eucariotas; el microorganismo es identificado mediante comparaciones de sus secuencias con las secuencias de ARNr de los bancos de genes [52]. Asimismo, la técnica molecular más utilizada actualmente para propósitos taxonómicos involucra el gen que codifica para la subunidad del ARNr 16S. En nueva Zelanda, identificaron a *Geobacillus thermoleovorans*, usando secuenciación parcial del gen que codifica el ARNr 16S [53]. Además, otras identificaciones de bacterias termófilas como *G.stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* en leche en polvo. [54]. Para el caso de celulasas, identificaron una nueva especie como *Thermogladius cellulolyticus* [55]. Otros estudios recientes, identificaron, purificaron y caracterizado a *Bacillus mycooides* S122C como productor de celulasa [56].

El género *Geobacillus* ha evolucionado jugando un rol en el enorme ciclo global de carbono, ayudando a descomponer polisacáridos complejos encontrados en la biomasa de plantas muertas. En este, tiene un rol secundario acompañando a una comunidad grande de otros microbios cuando persisten condiciones termófilas [57]. La utilización de enzimas termoestables en procesos que involucran la transformación de polímeros en unidades simples ofrece ventajas con respecto al uso de enzimas mesófilas, ya que a elevadas temperaturas la solubilidad de los

sustratos poliméricos es más alta y además a temperaturas altas el riesgo de contaminación se reduce [58]. Las enzimas de los termófilos son capaces de catalizar reacciones a temperaturas elevadas, además presentan mayor estabilidad y vida más prolongada que los mesófilos. Esto ha incrementado estudios sobre la aplicación de los productos de microorganismos extremófilos en la biotecnología [59].

Cada una de las variedades de organismos celulolíticos es afectada en forma diferente por la temperatura. Los mesófilos dominan en temperaturas moderadas mientras que la microflora termófila puede degradar la celulosa por arriba de los 45°C [60]. Las celulasas de termófilos a temperaturas de 55°C y superiores, ofrecen ventajas de un aumento de la velocidad de reacción y un sistema enzimático estable [61, 62]. Aunque la mayoría de enzimas se inactiva a temperaturas comprendidas entre 55°C y 60°C, algunas de ellas son completamente estables y conservan su actividad a temperaturas muy superiores [63].

Los hongos termófilos son aquellos hongos con una temperatura óptima de crecimiento superior a 40°C. Sus enzimas extracelulares tienen temperaturas óptimas de actividad que están cerca o arriba del óptimo de crecimiento del organismo y, en general, son más termoestables que las enzimas de hongos mesofílicos. [64], En contraste, la estabilidad térmica de algunas enzimas intracelulares que han sido purificadas es comparable y en algunos casos, menor que la observada en hongos mesofílicos. Aunque hacen falta datos rigurosos,

parece ser que los eucariontes termófilos involucran varios mecanismos de estabilización enzimática o de optimización de su actividad, con diferentes mecanismos que operan para diferentes enzimas [28].

Algunas especies de hongos termofílicos encontramos a *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus fumigatus* y *Zigomycetes*. También, *Thermoascus aurantiacus*, que es un hongo moderadamente termófilo que produce varias enzimas degradando la pared de la célula de la planta, incluyendo endoglucanasas [65, 66] y tiene una alta estabilidad y óptima temperatura cerca de 70°C y bajo pH óptimo de 3-4,5 [67].

En medios con pH entre neutro y alcalino, muchos microorganismos son capaces de crecer y liberar las enzimas apropiadas para la hidrólisis del polisacárido [68]. Respecto a las celulasas alcalinas, existen reportes de hongos productores de estas enzimas como *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, que muestran actividad celulolítica (celulasa total y endoglucanasa) incluso a pH 9 [69]. Otros investigadores utilizaron cultivos de actinomicetos *Streptomyces sp* y hongos *C. rosea* que fueron cultivados en un medio con paredes celulares de claveles como sustrato, obteniendo la mayor actividad celulolítica y xilanolítica a pH 9 [70].

Actualmente las celulasas son ampliamente utilizadas en la industria textil para el ablandamiento de algodón y desteñido de mezclilla, en el mercado de los detergentes para el cuidado del color y anti-deposición. Dentro de la industria alimentaria, son empleadas para favorecer la extracción y filtración de jugos y en la industria de la pasta kraft y de papel se usan para la eliminación de tinta [71].

Entre las enzimas utilizadas como aditivos para detergentes, se enfoca el interés en las celulasas, del tipo endoglucanasas, las cuales marcaron un punto decisivo en la historia de los detergentes por tener la habilidad de no digerir las hebras principales de los tejidos, como el resto de las hidrolasas, sino que digieren la microfibrillas de éstos, dándoles un aspecto a nuevo más duradero y colores nítidos por más tiempo [72].

El primer producto usado en la industria como aditivo una celulasa extremófila en detergentes fue en el año 1997 [73]. Las celulasas y proteasas obtenidas de extremófilos, tienen gran aplicación en las industrias textiles, por lo que permiten remover las pelusas de la ropa [74]. Las endoglucanasas termoestables de *Penicillium citrinum* pueden tener eficacia potencial como aditivos a los detergentes para ropa [75].

Actualmente, las celulasas han adquirido notable importancia en la industria bioenergética para hidrolizar biomasa lignocelulósica con la finalidad de emplearse en la producción de etanol celulósico, por lo que ha aumentado la demanda de celulasas con altas actividades y estabilidad en diferentes condiciones de temperatura, pH, etc [76]. En la actualidad, las celulasas comerciales provienen de especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* [34]. Por lo tanto, los hongos termófilos son fuente potencial de enzimas con interés científico y/o comercial. Las propiedades de sus enzimas muestran diferencias no solo entre especies, sino entre cepas [64].

III. OBJETIVOS

1) Objetivo general

- Aislar microorganismos productores de celulasas alcalinas a partir de aguas termales y suelos de bosques de Contamana.

2) Objetivos específicos

- Aislar y tamizar cualitativamente hongos productores de endoglucanasas alcalinas.
- Aislar y tamizar cualitativamente bacterias productores de endoglucanasas alcalinas.
- Identificar molecularmente cepas por secuencias del gen 16S y secuencias ITS1 e ITS4.

IV. MATERIALES Y METODOS

1) Descripción del área de estudio

Aguas Calientes es un atractivo turístico de fuentes de aguas sulfurosas y ferrosas con temperaturas que varían entre los 40°C y 90°C ubicado a 22 km al noreste de Contamana, por trocha carrozable, entre las coordenadas Norte 9187191, Este 498345, altitud de 134 m.s.n.m ubicado en la provincia de Ucayali, Departamento de Loreto, Perú. La figura 02 muestra la localización de Contamana.

El estudio se realizó en la Universidad Nacional Agraria La Molina en los ambientes del Laboratorio de Micología y Biotecnología, ubicado en Av. La Molina s/n, Lima 12, Lima, Perú.



Figura 02: Mapa de la provincia de Ucayali.

2) Materiales y equipos

Materiales de vidrio

- Asa de vidrio triangular
- Cámara de Neubauer BOECO
- Espátula
- Kitasato PYREX
- Láminas porta y cubre objeto. PEARL
- Matraces de 50,125 y 250 ml BOECO
- Matraz volumétrico 200 ml SCHOTT & GEN MAINZ
- Mecheros
- Pipetas graduadas 1ml, 5ml FALCON
- Placas de vidrio Petri DURANG
- Probetas de diferentes volúmenes BOECO
- Sistema de filtración SIGMA
- Tubos de ensayo PYREX
- Tubos con tapa rosca PYREX
- Vaso de precipitado SCHOTT

Medios de Cultivo

- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Agar Nutritivo MERCK MILLIPORE
- Caldo Papa Dextrosa

- Caldo nutritivo MERCK MILLIPORE
- Caldo de producción [69]
- Medio de aislamiento [69]
- Medio de producción [69]

Reactivos

- Acetona J.T.BAKER
- Acetato de Amonio SIGMA
- Acetato de sodio SIGMA
- Acido acético glacial MERCK
- Acido bórico ERBA
- Acido clorhídrico J.T.BAKER
- Acido 3,5 dinitrosalicílico SIGMA
- Agar agar CRITERION
- Agarosa SIGMA
- Agua destilada AQUALITY H₂O
- Agua ultrapura
- Alcohol etílico
- Alcohol isoamílico o isoamilalcohol SIGMA
- Azul cristal violeta J.T.BAKER
- Bromuro de etidio SIGMA
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) SIGMA

- Carboximetilcelulosa (CMC) SIGMA
- Celulosa microgranular SIGMA
- Cloroformo J.T BAKER
- Cloruro de sodio MERCK
- Dextrosa CENTRAL DRUG HOUSE (CDH)
- EDTA GENBIOTECH
- Etanol absoluto SIGMA-ALDRICH
- Extracto de levadura MERCK
- Fenol RIEDEL-DE HAEN
- Fosfato monobásico MERCK
- Fosfato dibásico de potasio MERCK
- Fosfato dibásico de sodio MERCK
- Glicina SIGMA-ALDRICH
- Glucosa anhidra SIGMA
- Go Taq Flexi DNA Polymerase PROMEGA
- Hidróxido de sodio MERCK
- Isopropanol SIGMA
- Lauril sulfato o dodecilsulfato sódico (SDS) SIGMA-CHEMICAL CO
- Loading Dye 6x FERMENTAS
- Marcador de peso molecular Lambda/Hind GENBIOTECH
- Metabisulfito de sodio RIEDEL-DE HAEN
- Nitrógeno líquido UNALM

- Oxalato de amonio RIEDEL-DE HAEN
- Oxitetraciclina 100µg/ml
- Peptona MICROGEN
- Primers ITS1 y ITS4 MACROGEN
- Primers 27F y 1492R MACROGEN
- Proteinasa K SIGMA
- RNAasa SIGMA
- Rojo Congo EXIMPA
- Safranina J.T. BAKER
- Sales traza
- Solución de lugol (yodo, yoduro de potasio) J.T.BAKER
- Sulfato de magnesio heptahidratado SIGMA
- Sulfato de magnesio SIGMA
- Sulfato de amonio SCHARLAU
- Tartrato de sodio y potasio MERCK
- Tris base GENBIOTECH
- Tween 80 MERCK
- Xilosa SIGMA-ALDRICH

Equipos de laboratorio

- Agitador mecánico orbital SIGMA
- Agitador (Skaker) SHELLAB
- Autoclave KOSSODO

- Balanza analítica EXPLORER OHAUS
- Baño María PRECISION SCIENTIFIC CO
- Baño seco digital BENCHMARK SCIENTIFIC
- Bomba de vacío GAST
- Cámara de electroforesis CLEAVER SCIENTIFIC
- Cámara de flujo laminar (uso siembra) KRAUSS & HENKE
- Cámara de flujo laminar (uso molecular) LABCONCO
- Cámara fotográfica digital LUMIX
- Centrifuga refrigerada universal 320R HETTICH
- Cocina SURGE
- Congeladora de -20°C WHIRLPOOL
- Congeladora de -80°C SANYO
- Draga para el muestreo
- Desecador KARTELL
- Desionizador de agua SYNERGY UV. MILLIPORE
- Espectrofotómetro MILTON ROY SPECTRONIC 20D
- Espectrofotómetro Nanodrop 2000 THERMO SCIENTIFIC
- Espectrofotómetro de microplacas KAYTO
- GPS GARMIN
- Horno PRECISION SCIENTIFIC CO
- Horno peso seco PRECISION SCIENTIFIC CO
- Horno microondas PANASONIC

- Incubadora de 40°C PRECISION SCIENTIFIC CO
- Incubadora de 50 -70° C MMM
- Laptop TOSHIBA
- Medidor digital combo pH &T°C HANNA
- Microscopio NITLAB
- Microscopio con cámara (axiocam ERC5S) CARI ZEISS GMBH
- Mini centrífuga (spin down) LABNET INTERNATIONAL
- Mini centrífuga para microtubos GYROZEN
- Potenciómetro CORNING
- Refrigeradora ELECTROLUX
- Termociclador S1000 BIO-RAD
- Termómetro BOECO
- Transiluminador de luz UV MAESTROGEN
- Ultra iluminador ULTRA-LUM
- Vórtex NITLAB

Otros

- Algodón
- Asa bacteriológica
- Bolsas de polietileno
- Bombilla de succión ISOLAB
- Cajas para tips con filtro AXYGEN QUALITY
- Cinta de embalaje

- Digital timer
- Embudo Büchner
- Frascos ambar
- Gradillas
- Gorra
- Guantes de látex
- Magneto
- Mascarillas
- Membrana de filtro 0,22 μm MERCK MILLIPORE
- Microplacas PCR de 96 pocillos AXYGEN QUALITY
- Microtubos de 600 μl ; 1,5 -2,0 ml AXYGEN QUALITY
- Microtubos para PCR AXYGEN QUALITY
- Micropipetas de 1-10 μl , 10-200 μl , 100-1000 μl BOECO
- Mortero y pilon
- Papel filtro N°1 WHATMAN
- Placas ELISA de 96 pocillos
- Pissetas
- Pinzas de madera
- Puntas de micropipetas de 1-10 μl , 10-200 μl , 100-1000 μl AXYGEN
- Rack porta viales NEOLAB
- Rack porta microtubos AXYGEN
- Regla NEOLITE

- Sacabocado de 0,5mm
- Termómetro BOECO
- Termos THERMOS
- Tiras de pH ALDRICH
- Tubos de centrifuga de 15 ml y 50 ml AXYGEN QUALITY
- Viales de 5 ml CORNING

3) Método

3.1 Recolección de muestras

Las muestras de aguas, sedimentos y suelos fueron recolectadas en termos y bolsas de polietileno estériles respectivamente, se midió las coordenadas con un GPS, pH y la temperatura *in situ* de las muestras. Las muestras se obtuvieron aleatoriamente de cuatro puntos diferentes de muestreo a la temperatura y tipo de suelo de los bosques de Contamana. Se recolecto un 1 kg de suelo y se dividió en cinco partes de 200g.

Los datos obtenidos de los puntos de muestreos de aguas termales (AC), sedimento (SD) y suelos (S) que se usaron en la codificación de las cepas, con sus respectivas coordenadas de ubicación, temperatura y pH.

3.2 Aislamiento primario

Se realizó a partir de diferentes tipos de métodos: en muestra de agua, por aislamiento directo, por filtración (se uso el lavado de la membrana) y

por enriquecimiento con celulosa microgranular incubado durante siete días a 70°C; en muestra de suelo y sedimento por enriquecimiento y directo. Se prepararon diluciones seriadas de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . El inóculo fue 1 ml en las muestras de suelo, sedimento y en la muestra de agua fue 0,2 ml de cada dilución mediante el uso del asa de vidrio triangular sobre la superficie del medio de cultivo. Todas las diluciones se sembraron por duplicado. Se usó una cámara de flujo laminar para la siembra y evitar la contaminación en el medio de cultivo.

Se cultivaron en un medio de aislamiento para microorganismos celulolíticos [69] a pH neutro en placas petri; se modificó el aumento de CMC, xilosa y agar de los autores. En este caso, se usó el medio para bacterias y hongos. Este medio contiene, por litro, 10 g de carboximetilcelulosa (CMC), 5 g xilosa, 1 g de peptona, 1 g de extracto de levadura; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; sales trazas (5 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,6 mg de $MnSO_4 \cdot 2H_2O$; 1,4 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 2 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ y 20 g de agar. El pH del medio fue ajustado a 7,4 con cualquiera de las dos soluciones 1N de NaOH o 1N de HCl. Se esterilizó mediante una autoclave a 121°C, por 15 minutos.

En las muestras para aislar bacterias, la incubación se hizo a una temperatura de 70°C hasta por dos días. En las muestras para aislar hongos, se añadió al medio atemperado, el antibiótico oxitetraciclina (100

$\mu\text{g/ml}$) 1 ml en 100 ml de medio, se incubó a 40°C durante cinco días. Después de las incubaciones, se agregaron una sobrecapa (buffer glicina 0,05N a pH 9,4; CMC 0,5% y agar 2%) a las placas en las que crecieron bacterias y hongos, y se volvió a incubar pero a 50°C durante 24 horas, se seleccionaron a las que presentaban halos después del revelado con Rojo Congo 0,1% y lavado con NaCl 1N.

Las bacterias con diferencias en tamaño y aspecto fueron aisladas mediante agotamiento de inóculo de estrías, con este procedimiento se puede conseguir una buena separación y aislamiento de las colonias [77] y se verificó mediante la tinción Gram (ver Anexo 03, cuadro 17). Las cepas purificadas se conservaron en tubos con agar nutritivo. En el caso de hongos, con diferencias en aspecto, color y consistencia fueron aislados por tacos en placas con agar papa dextrosa (PDA). Las cepas puras se conservaron en tubos inclinados con PDA. Todas las cepas se refrigeraron a 4°C.

3.3 Tamizado secundario

En base a la selección primaria, se realizó un segundo tamiz que expresaron la actividad celulolítica de los hongos y bacterias previamente seleccionados a través de la presencia de halos de hidrólisis [41] o

formación de zonas de aclaramiento o pardeamiento alrededor de las colonias [42].

Se uso el medio de producción para celulasas con algunas modificaciones de los autores [69] que contiene por litro: 5 g de carboximetilcelulosa (CMC), 5 g xilosa, 1 g de peptona, 1 g de extracto de levadura, 1 g de K_2HPO_4 ; 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,14g $(NH_4)_2SO_4$, 1 ml de sales traza y 20 g de agar, ajustado a pH 7,4.

Se realizó un método denominado “técnica del disco de agar”, en el caso de hongos, se trabajo el inóculo en medio sólido, esta técnica consistió en inocular pequeñas cantidades de esporas en la superficie de cada pozo solidificado de una placa ELISA estéril (96 pozos) que inicialmente contenía 150 μ l del medio de producción [69]. Se tapo e incubaron a $40^\circ C \pm 2$ por 72 horas.

En el caso de las bacterias, se trabajo el inóculo en medio sólido y en medio líquido (con algunas modificaciones) [78]. El inóculo se obtuvo de las cepas crecidas en caldo nutritivo durante 18 horas, se midió en el espectrofotómetro (MILTON ROY SPECTRONIC 20D) las absorbancias 0,1 de densidad óptica- $D.O_{(600nm)}$ equivalente a 1×10^6 bacterias y se inoculó 50 μ l a cada hoyo de la placa ELISA estéril (96 pozos), luego se agrego 200 μ l de medio de producción a la misma placa (base plano), se mezclo, se

tapo y se llevo a la incubadora a 70°C durante 24 horas. En medio líquido se uso el caldo de producción, los mismos componentes del medio de producción modificado, excepto agar [69] bajo las mismas condiciones de inóculo e incubación.

Después de la incubación de las cepas, el contenido del medio sólido de cada pocito de la placa ELISA fue retirado asépticamente con un sacabocado (0,5 mm de diámetro) de las placas ELISA, el taco fue colocado sobre el medio de tamiz solidificado en placas diseñadas de vidrio (300 cm²) con su respectivo control (solo medio) para cada ensayo [79]. El medio de tamiz en 100 ml contenía: 2% agar; 0,5% CMC disuelto en buffer fosfato (PBS) 0,05M (pH 7,4) y/o buffer ácido bórico-Borax 0,05M (pH 8,4) y/o buffer Glicina-NaOH 0,05M (pH 9,4 y pH 10,4). Las placas fueron herméticamente selladas y se incubaron en baño María a 50°C por 4 horas. En el caso del medio líquido, se perforaron pocillos con el sacabocado al medio de tamiz solidificado en placa, luego se inoculó 50 µl del cultivo y se llevo a la incubadora a 50°C durante cuatro días.

Transcurrido la incubación, se retiraron los tacos de agar, el medio de tamiz se coloreo con una solución de Rojo Congo al 0,1% (p/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente; luego para evidenciar las zonas de aclaramiento correspondientes a los halos de hidrólisis, el medio de tamiz se lavo repetidas veces con una solución de NaCl 1N. Se observó en el

Ultra iluminador (ULTRA-LUM) los halos de hidrólisis. El diámetro (mm.) de las zonas claras fue medido como una indicación de actividad celulolítica.

4) Identificación molecular

4.1. Extracción de ADN

En primer lugar, se realizó observaciones microscópicas a todas las cepas para verificar que no tengan presencia de contaminantes.

A. Extracción de ADN de bacterias

Cada matraz de 50 ml fue inoculado con el 10% de 0,1 D.O_(600nm) (1×10^6 bacterias) del cultivo en 25 ml de caldo nutritivo, se incubó durante 18 horas. Después de la incubación, se centrifugó a 13500 rpm en microtubos, se descartó el sobrenadante, luego se uso el pellet celular y se extrajo el ADN en base al protocolo descrito por Sambrook et al [80] modificado en algunos detalles. El siguiente protocolo modificado se da a continuación:

Protocolo de extracción de ADN

1. Se agregaron 3 ml de caldo cultivado en un microtubo de 1,5 ml (2 veces), se centrifugo por 10 min a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante.

2. Se resuspendió el pellet con 200 μ l de amortiguador de lisis (40Mm Tris-acetato pH 7,8; 20 mM acetato de sodio; 1 mM EDTA, 1% SDS).
3. Se añadieron 66 μ l de 5 M NaCl y se mezcló bien (para remover la mayor cantidad de proteínas y debris celular). Se calentó por 10 minutos a 65°C para mayor lisis celular.
4. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un microtubo nuevo.
5. Se añadió 1 volumen de cloroformo (el mismo volumen final del sobrenadante) y se movió invirtiendo el microtubo suavemente hasta ver una solución blanquizca. Se colocó en vórtex a 13500 rpm por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
6. Se centrifugó a 13000 rpm por 7 minutos, Se recuperó el sobrenadante de la fase superior procurando no tocar la interfase y se transfirió a un microtubo nuevo.
7. Se añadió 0,6 volumen de isopropanol (frio) para precipitar el ADN, se incubó en refrigeración por 20 minutos, luego se centrifugó 10 minutos a 13500 rpm. (se colocó a -20°C para precipitar mayor cantidad de ADN).
8. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 μ l de etanol al 70% para lavar el ADN, se centrifugó por 10 minutos a 13500 rpm.

9. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet blanco a temperatura ambiente hasta que sea transparente y se resuspendió entre 20- 40 μ l de agua ultra pura. (depende pellet).

10. Se conservó a -20°C .

B. Extracción de ADN de hongos

Se uso el cultivo de micelio libre sumergido con matraces de 125 ml, se inoculo 1,5 ml (suspensión de esporas con Tween 80 al 0,1%) [81] en 50 ml de caldo papa dextrosa y se incubó a 40°C por 72 horas con agitación constante a 140 rpm. La biomasa generada se filtró con papel filtro Whatman N° 1 con bomba al vacio, lavadas con agua destilada estéril hasta eliminar los residuos del medio, la biomasa se guardo en microtubos y conservados a -80°C . Posteriormente, se extrajo el ADN en base al protocolo original descrito por Möller et al [82] modificado en algunos detalles. El siguiente protocolo modificado se da a continuación:

Protocolo de extracción de ADN

1. Se pulverizó en un mortero con el pilón la biomasa agregando nitrógeno líquido, se peso 100 mg de la muestra y se colectó en un microtubo de 2 ml.
2. Se agregaron 500 μ l del tampón Tris EDTA SDS –TES (100 Mm Tris, pH 8, 10 Mm EDTA, 2% SDS) y 2,5 μ l de Proteinasa K (20,2 mg/ml), se mezcló en el vórtex y se incubó por 1 hora a 60°C .

3. Se adicionaron 140 μl de NaCl 5 M y 65 μl de CTAB 10%, se mezcló homogéneamente e incubada por 10 minutos a 65°C.
4. Se agrego 700 μl de SEVAG (Cloroformo: Isoamilalcohol, 24:1), se mezcló volteando suavemente el microtubo y se incubó por 30 minutos a refrigeración (0°C).
5. Se centrifugó a 13500 rpm durante 15 minutos (para separar el debris celular del contenido soluble). Se recuperó el sobrenadante de la fase superior procurando no tocar la interfase (~ 500 μl) y se transfirió a un nuevo microtubo de 1,5 ml.
6. Se adicionó 225 μl de acetato de amonio 5 M, se mezcló, se dejó reposar en hielo por 1 hora aproximadamente y se centrifugó a 13,500 rpm por 10 minutos.
7. El sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo, se añadió 0,55 volumen de isopropanol (~510 μl) para precipitar el ADN, se mezcló volteando suavemente el tubo y se centrifugó a 13500 rpm por 15 min.
8. Se descartó el sobrenadante, se agrego 500 μl de etanol al 70% frío para lavar el ADN y se centrifugó a 13500 rpm durante 5 minutos en dos oportunidades.
9. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente en la cámara de flujo laminar.

10. Se resuspendió entre 30 hasta 50 μl en agua ultra pura (dependiendo del pellet) y se conservó a -20°C .

Para evaluar la calidad del ADN extraído, se realizó una electroforesis en minigel de agarosa (1% con 1 μl de bromuro de etidio (10000X) en 100 ml; buffer de corrida TAE 1X); para descartar la presencia de contaminantes. Después de visualizar las bandas de ADN usando un transiluminador luz UV (MAESTROGEN), si fuese necesario se adicionaba RNAsa (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a la muestra, colocando en baño maría a 37°C por 15 minutos, 1-4 μl dependiendo del pellet y después se guardaba a -20°C .

La concentración de ADN extraído se estimó mediante la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro UV (SmartSpec Plus- BioRad) en relación a 260, 230 y 280 nm. Se midió al equivalente de 1 unidad de absorbancia a 260 nm en 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN. El grado de pureza del ADN extraído se determinó de la relación 260/280 nm cuyo rango aceptable es de 1,8-2,0 [80].

4.2. Amplificación de ADN mediante PCR

Las muestras de ADN purificadas de las cepas productoras de celulasas, fueron usadas como ADN molde para amplificar mediante PCR genes

que codifican para 16S específico para bacterias y del espacio interno transcrito (ITS) para hongos. La amplificación se hizo con oligonucleótidos universales 27_f y 1492_r para bacterias; ITS1 e ITS4 para hongos. Las secuencias utilizadas fueron:

Lugar	Nombre del primer	Dirección	Secuencia 5'...3'	Referencia
ITS	ITS1	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al [83]
	ITS4	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al [83]
16S	27	Forward	AGAGTTTGATCCTGGCTAAG	Reysenbach et al [84]
	1492	Reverse	GGTACCTTGTTACGACTT	Reysenbach et al [84]

4.3. Reacción de cadena de polimerasa (PCR)

Consiste en amplificar exponencialmente fragmentos de un gen de la cadena doble del ADN debido a la acción enzimática del ADN polimerasa. Se preparó un volumen final de 20 µl para cada reacción con la enzima *Go taq* ADN polimerasa (PROMEGA), los cebadores o primers, dNTP's, buffer flexi, MgCl₂ y ADN. La concentración y volumen

final usados para ADN fúngico y ADN bacteriano se muestran respectivamente a continuación:

Componentes	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer 5X	4	1X
MgCl ₂ 25mM	2	2.5
dNTP's 10mM	1	0.5
ITS1 10μM	0.4	0.2 μM
ITS4 10μM	0.4	0.2μM
<i>Go taq</i> 5U/μL	0.2	1.0U
DNA 25ng/μL	2	
H ₂ O	10	
Volumen final	20 μl	

Componentes	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer 5X	4	1X
MgCl ₂ (25mM)	2	2.5
dNTP's (10mM)	1.2	0.6
Cebador_F (10μM)	0.6	0.3 μM
Cebador_R (10μM)	0.6	0.3 μM
<i>Go taq</i> (5U/μl)	0.2	1.0U
DNA 50ng/μl	4	
H ₂ O	7.4	
Volumen final	20 μl	

La reacción de cadena de polimerasa (PCR) se realizó en el Termociclador S1000 (BioRad), las secuencias empleadas se muestra a continuación:

Gen	Desnaturalización inicial	Ciclo	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final	-
ITS	95°C, 5 min	35	95°C, 60s	55°C, 60s	72°C,1:30 min	72°C,5min	12°C,α
16S	95°C, 5 min	30	95°C, 60s	55°C, 60s	72°C,1:30 min	72°C,7min	12°C,α

La confirmación de los productos amplificados de ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (1% con 1 µl bromuro de etidio (10000X) por 100 ml) .Se añadió TAE 1X como buffer de corrida a la cámara de electroforesis, se tomo 1,3 µl del marcador de peso molecular (lambda/Hind DNA Ladder) que fue colocado en el primer pocillo del gel. Se mezcló 5µl de cada producto de PCR con 0,5 µl de “loading Dye” (6x azul, FERMENTAS). Además, se uso como control positivo en bacterias a *Escherichia coli*, en hongos a *Aspergillus niger* y como control negativo se uso agua ultra pura en ambos casos. La corrida se realizó con un voltaje de 100 voltios. Se observó el gel en el transluminador luz UV (MAESTROGEN).

4.4. Secuenciamiento de ADN y análisis filogenético

Los productos de PCR amplificados se secuenciaron con la empresa Macrogen Corea Inc. con los primers universales internos en bacterias: 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'), 800R (5'-TACCAGGGTAT

CTAATCC-3') y en hongos fueron: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') y ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5').

Las secuencias fueron editadas usando los programas de Bioedit, luego fueron comparadas con la base de datos del NCBI GenBank (The National Center for Biotechnology Information U.S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando BLASTN. Consecutivamente, las secuencias del presente trabajo editadas y obtenidas del NCBI fueron alineadas usando el programa CLUSTAL W [85] y se elaboro el árbol filogenético con el programa MEGA4 usando la metodología de Neighbor-joining con 1000 Bootstraps y Kimura 2-parametros [86].

5) Evaluación de la temperatura de crecimiento de hongos

Los hongos fueron cultivados a diferentes temperaturas de 35, 40, 45 y 50°C para evaluar la producción de biomasa. Primeramente, en condiciones estériles, se obtuvo el inóculo cosechando esporas a partir de cultivos en PDA en matraces con 3 días de crecimiento a 40°C utilizando 10 ml de solución de Tween 80 al 0,1%. Se realizó el recuento tomando una alícuota (100 µl) a una cámara Neubauer para el conteo de esporas hasta obtener la concentración final (1×10^6 esporas/ml). Estas suspensiones fueron utilizadas como inóculo [81].

En el cultivo sumergido, cada matraz de 125 ml conteniendo 50 ml de caldo papa dextrosa fue inoculado con 1,5 ml de suspensión de esporas (3%, v/v) [81]. Luego, fueron incubados a las diferentes temperaturas mencionadas anteriormente en un baño agitado (shaker) a 175 rpm durante 4 días. Se utilizaron dos repeticiones por cepa para cada temperatura.

La biomasa se determinó por diferencia de peso seco. El contenido de cada matraz se filtró por succión con ayuda de la bomba de vacío con el papel filtro pesado y secado (Whatman N°1; Whatman International Ltd, Kent, UK) sobre el embudo büchner; adicionando agua destilada estéril en los lavados de la biomasa hasta eliminar restos del medio. Después, el papel filtro fue secado al horno a 80°C para obtener un peso constante durante 4 días. Luego, se pesaron nuevamente y fueron tomados como datos.

6) Cuantificación de actividad celulolítica

Primeramente, se preparó el caldo de producción con algunas modificaciones de los autores [69] que contiene (g/L): 5 gr Carboximetilcelulosa (CMC), 5 gr Xilosa, 1 gr extracto de levadura, 1 gr peptona, 1 gr Sulfato de magnesio ($MgSO_4$), 1 gr fosfato dibásico de potasio

(K₂ HPO₄), 1 ml elementos traza; 0,14 gr sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄, agua destilada y enrasar a pH 7,4.

En los cultivos para bacterias, a cada matraz de 50 ml se agregaron 20 ml de caldo de producción, se inocularon 2 ml equivalente al 10% del caldo y fueron incubados a 70°C por 24 horas. En los cultivos para hongos, a cada matraz de 125 ml se agregaron 50 ml de caldo de producción. Se inocularon 1,5 ml de la suspensión de esporas.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, para ambos casos, se colocó en tubos de 50 ml y se procedió a centrifugar a 14000 rpm en la centrifuga refrigerada (320R HETTICH) por 15 minutos para sedimentar la masa celular. El sobrenadante se colocó en otro tubo o en microtubos de 1,5-2 ml y se congelaron hasta el momento del ensayo para ser usados como fuente de enzima en la determinación de actividad endoglucanasas (CMCasa).

6.1 Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Es una técnica colorimétrica que emplea ácido 3,5-dinitrosalicílico para la detección de azúcares reductores presentes en una muestra. Esta técnica sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos por hidrólisis de celulosa durante la reacción enzimática [45] dentro del rango de la curva estándar usada para la calibración del ensayo (Ver anexo 7, figura 56).

Una unidad internacional (UI) de endoglucanasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto a las condiciones de ensayo. En los ensayos de endoglucanasas, se trabajó en microplacas de PCR 96 pocillos (AXYGEN QUALITY) utilizando como base el protocolo descrito por King et al [87]. El protocolo modificado se da a continuación:

–Se preparó el sustrato mezclando CMC al 1% con el buffer a diferentes pH (buffer fosfato 0,05M a pH 7,4; buffer ácido bórico-Borax 0,05M a pH 8,4; buffer Glicina-NaOH 0,05M a pH 9,4 y pH 10,4).

–La curva estándar se preparó usando un stock de la solución glucosa anhidra (SIGMA) con el buffer fosfato 0,05M a pH 7,4 a una concentración de 3 mg/ml. En los pocillos se diluyeron hasta obtener concentraciones de 0; 0,5; 0,75; 1; 1,5 y 2 mg/ml por triplicado. La cual están registrados en la siguiente tabla:

N° dilución	Volumen de stock de glucosa en μl	Volumen de buffer en μl	Conc. Final [mg/ml]
Blanco BR	0	180	0
1	15	165	0,5
2	22,5	157,5	0,75
3	30	150	1
4	45	135	1,5
5	60	120	2

–Se retiraron 60 μl de cada concentración, se colocaron en otra microplaca, luego se añadieron 120 μl de DNS en cada pocillo, se tapó y se colocó en baño maría a 100°C por 5 minutos. Inmediatamente se retiró y colocó en un recipiente con agua helada. Se extrajeron 36 μl de la reacción colocándose en una placa ELISA (base plana) que contenía 160 μl de agua destilada en cada pozo. Se mezcló y se llevaron al espectrofotómetro de microplacas (KAYTO); la lectura se realizó a una absorbancia de 540 nm. La curva de calibración se construyó con diferentes concentraciones y la absorbancia medida en cada una de ellas.

–La muestras (sobrenadantes) obtenidas de cada cepa fueron incubados con buffers a diferentes pH*(7,4; 8,4; 9,4 y 10,4), con el sustrato correspondiente al pH durante dos horas a temperaturas de 50, 60 y 70°C. Se muestra las cantidades de volumen a continuación:

	Blanco DNS (μl)	Blanco sustrato (μl)	Blanco muestra (μl)	Muestra (μl)
Buffer*	180	90	90	-
Sustrato(CMC)	-	90	-	90
Muestra	-	-	90	90

–Se tomaron 60 μ l del producto de incubación colocándose en otra microplaca, se añadieron 120 μ l del reactivo de DNS, se mezcló y se cerró herméticamente. Se incubó en un baño maría a 100°C por 5 minutos. Inmediatamente, se retiró y colocó en un recipiente con agua helada (o colocada en la nevera). Se extrajo 36 μ l de la reacción colocándose en una placa ELISA (base plana) que contenía 160 μ l de agua destilada en cada pozo, se mezcló y se llevaron al espectrofotómetro de microplacas (KAYTO); la lectura se hizo a una absorbancia de 540 nm de longitud de onda. Se obtuvo tres mediciones por muestra.

7) Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente con el software Statgraphics Centurion XVII (Stat Point Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE.UU). Se utilizó la prueba paramétrica de ANOVA, Duncan y Tuckey para comparar las medias entre los parámetros analizados. Se consideraron con un nivel de significancia los valores de p menores a 0,05. Además, se usó el programa Microsoft Excel para presentar los gráficos con desviación estándar.

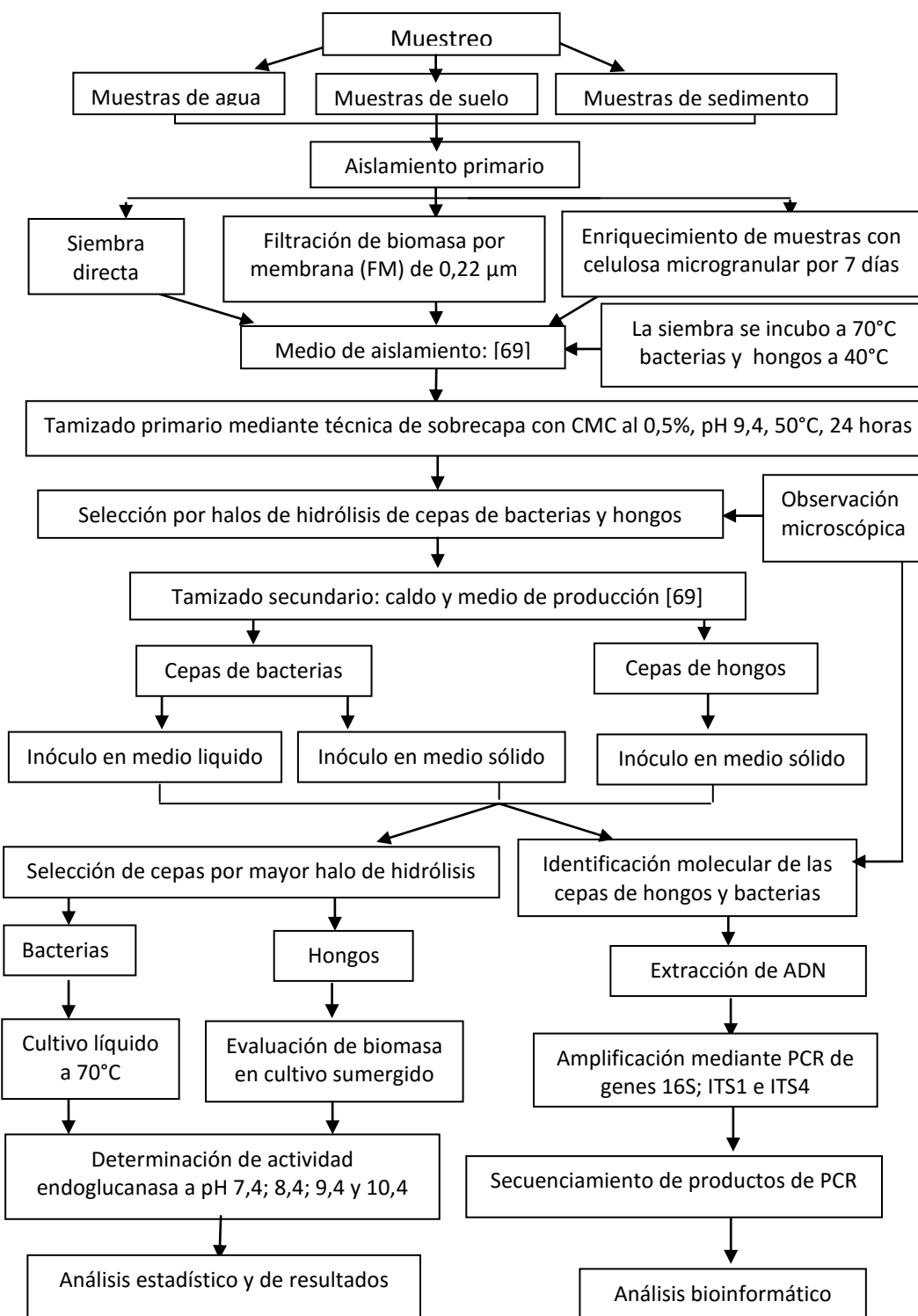


Figura 03: Flujograma de trabajo para seleccionar e identificar cepas productoras de celulasas neutroalcalinas a partir de muestras de agua y sedimento de Aguas Calientes.

V. RESULTADOS

1) Aislamiento primario de cepas productoras de celulasas neutroalcalinas

Inicialmente, se obtuvieron un total de 120 aislamientos a partir de las aguas termales, suelos y sedimentos. Los puntos de muestreo se codificaron para muestras de aguas como AC-1, AC-2, AC-3, AC-4, para muestras de suelos como S-1, S-2, S-3, S-4 y para muestras de sedimento solo se aisló en el punto SD-4. Las imágenes del muestreo se aprecian en el anexo 01 (cuadro 16 y figura 39-42).

Cuadro 01: Número y porcentaje de los aislamientos totales de cepas productoras de celulasas neutroalcalinas con los diferentes métodos probados.

Muestra	Método	1		2		3		4	
		N° de aislado	%	N° de aislado	%	N° de aislado	%	N° de aislado	%
Agua (AC)	D*	13	30,2	10	26,3	2	10,5	3	15
	F**	10	23,3	7	18,4	0	0	2	10
	E***	4	9,3	4	10,5	5	26,3	6	30
Suelo(S)	D*	7	16,3	6	15,8	4	21,1	1	5
	E***	9	20,9	11	28,9	8	42,1	7	35
Sedimento (SD)	D*	0	0	0	0	0	0	0	0
	E***	0	0	0	0	0	0	1	5
Total		43	100	38	100	19	100	20	100

D*Directo, F** Filtración con membrana, E***Enriquecimiento

En el cuadro 01, se reportó la muestra, el método de aislamiento y el número de aislamientos totales (bacterias y hongos) de cada punto de muestreo

analizado. Los resultados muestran diferencias en el número de aislamientos conseguidos de acuerdo al método utilizado. Así mismo, el mayor número de aislamientos correspondiente al 30,2% se obtuvo del plaqueo directo (muestra AC-1) y el menor número con 0% del método filtración con membrana (muestra AC-3) a partir de muestras de agua. En muestras de suelo, el mayor número fue 28,9% con 11 aislados por enriquecimiento (muestra S-2) y el menor número se obtuvo 5% con 1 aislado por plaqueo directo (muestra S-4). Por otro lado, el punto de muestreo 1 generó 43 aislados siendo la mayor cantidad de cepas totales entre las muestras de agua y suelo (Ver figura 43 del anexo 02).

2) Tamizado secundario de cepas productoras de celulasas neutroalcalinas

Se trabajo con las 120 cepas provenientes del aislamiento primario (bacterias y hongos) y se tamizaron aquellas que presentaron mayor halo de hidrólisis. El procesamiento de las muestras en medio sólido con la técnica del disco de agar dio resultados rápidamente a comparación con el medio líquido. Como se muestra en la figura 44 del anexo 02.

Cuadro 02: Número y porcentaje de cepas totales con mayor halo de hidrólisis en carboximetilcelulosa

Muestra	Método	1		2		3		4	
		N° cepa	%	N° cepa	%	N° cepa	%	N° cepa	%
Agua (AC)	Directo	4	22,2	0	0	0	0	1	33,3
	Filtración con membrana	6	33,3	0	0	0	0	0	0
	Enriquecimiento	1	5,5	1	50	0	0	0	0
Suelo (S)	Directo	2	11	0	0	1	33,3	1	33,3
	Enriquecimiento	5	28	1	50	2	66,7	1	33,3
Total		18	100	2	100	3	100	3	100

En el cuadro 02 se muestra el número y porcentaje de las cepas totales seleccionadas por presentar mayor halo de hidrólisis en el medio sólido con carboximetilcelulosa (CMC 1%). El mayor número de cepas se obtuvo con 33,3% de 6 cepas por filtración con membrana (muestra AC-1) y el menor número de cepas seleccionadas fue 0% para los demás puntos de muestreo en las muestras de agua. Además, en muestras de suelo, el mayor número se obtuvo con 28% de 5 cepas seleccionadas por enriquecimiento (muestra S-1) y el menor número fue 0% por plaqueo directo (muestra S-2). Por otra parte, la mayor cantidad de cepas seleccionadas con mayor halo fueron 18 del punto de

muestreo 1. Sin embargo, en muestra de sedimento no hubo cepa con halo de hidrólisis significativa. Los resultados se muestran en la figura 45.

El número de cepas de bacterias y hongos obtenidas después del aislamiento primario y tamizado secundario se muestra en la figura 04.

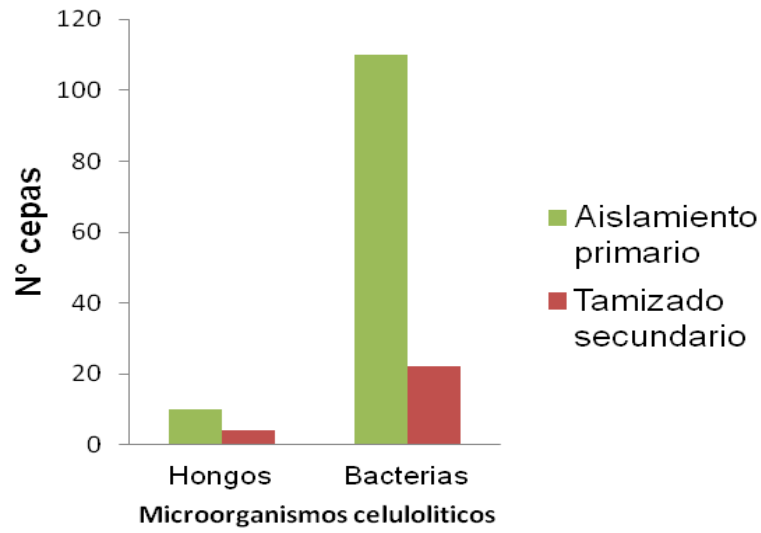


Figura 04: Microorganismos productores de celulasas neutroalcalinas aislados de muestras de agua y suelo de Aguas Calientes.

En total fueron 26 microorganismos celulolíticos seleccionados por su capacidad hidrolítica, de los cuales 22 pertenecen a bacterias y 4 pertenecen a hongos. El aislamiento primario produjo en su mayoría cepas bacterianas con un número de 110 aislamientos, con temperatura de crecimiento de 70°C contrariamente a los aislamientos fúngicos que crecieron a 40°C con 10 aislamientos. Se midieron los diámetros de los halos de hidrólisis de las cepas

seleccionadas. Los halos mayores a 8 mm se tomaron como indicación de actividad celulolítica.

En el cuadro 03, se muestra los diámetros de los halos de hidrólisis de las cepas codificadas de acuerdo a las muestras aisladas. Por consiguiente, todas las cepas seleccionadas en bacterias y hongos presentaron actividad celulolítica.

Cuadro 03: Diámetro de los halos de hidrólisis sobre CMC de las cepas bacterianas y fúngicas con actividad endoglucanasa a pH 7,4

	CEPA	ENDOGLUCANASA (mm)
BACTERIA	LMB-AC1	10±0,00
	LMB-AC2	9,57±0,51
	LMB-AC3	20±0,00
	LMB-AC4	10,47±0,15
	LMB-AC5	10±0,00
	LMB-AC6	12±0,50
	LMB-AC7	19,27±1,27
	LMB-AC8	10,40±0,36
	LMB-AC9	20,20±0,20
	LMB-AC10	16±2,00
	LMB-AC11	17,53±0,72
	LMB-AC12	19,67±0,58
	LMB-AC13	23,17±0,15
	LMB-SC1	10,57±0,38
	LMB-SC2	13,07±0,12
	LMB-SC3	18,43±0,45
	LMB-SC4	15,27±0,46
	LMB-SC5	20,10±0,10
	LMB-SC7	9,23±0,21
	LMB-SC8	11,50±1,32
	LMB-SC9	10,33±2,52
	LMB-SC10	10±0,00

HONGO	LMB-HAC7	12,27±0,25
	LMB-HAC8	9,37±0,35
	LMB-HAC9	12,30±0,26
	LMB-HAC10	10,50±0,10

3) Identificación molecular de las cepas seleccionadas

Se realizó la evaluación microscópica de las cepas bacterianas, fúngicas y se verificaron que no estuvieran contaminadas.

Para las cepas de bacterias, se realizó la tinción Gram, y se encontraron principalmente bacilos Gram positivos, formadores de endosporas. Además, se verificó con la técnica de Dörner la presencia de endosporas. Por otra parte, en hongos se realizaron observación en muestras frescas. Se pueden apreciar fotos en el anexo 03 (figuras 46-50).

En la extracción de ADN, se obtuvo buena calidad de ADN bacteriano y de ADN fúngico. Se verificó la presencia de las bandas en el gel de agarosa 1%. Además, de un grado de pureza aceptable dentro del rango establecido. Las imágenes de los geles de electroforesis se aprecian en la figura 05.

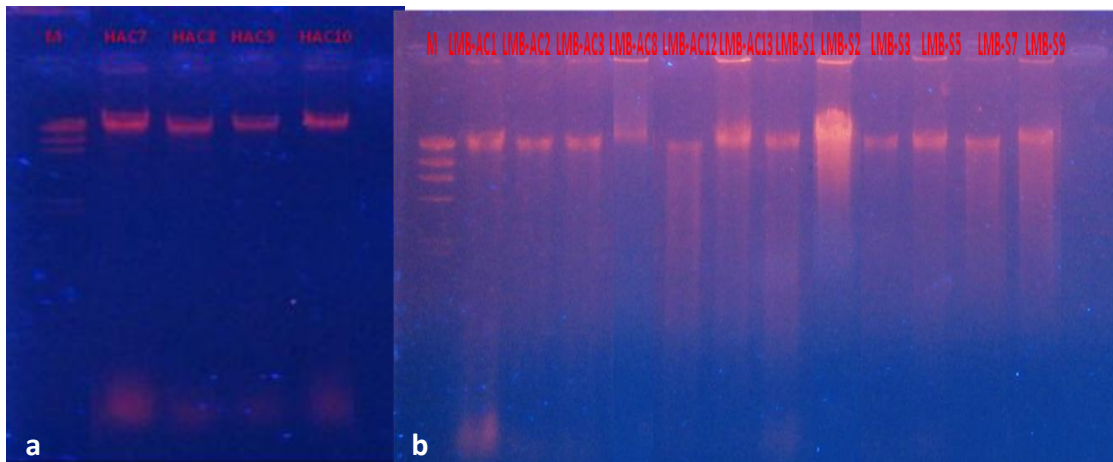


Figura 05: (a) Gel de electroforesis de extracción ADN fúngico; (b) gel de electroforesis de extracción ADN bacteriana.

En relación a la amplificación del ADN bacteriano y ADN fúngico, se consiguió la amplificación de genes esperados mediante el empleo de cebadores universales. Así mismo, se evidenció los productos de la reacción en gel de agarosa al 1% observándose bandas únicas que demuestran que la amplificación fue específica. Las gráficas de las secuencias usadas en el termociclador se encuentran en el anexo 04 (ver figura 51 y figura 52). Las imágenes de los gels de electroforesis de productos de PCR se aprecian en las figuras 06 y 07.

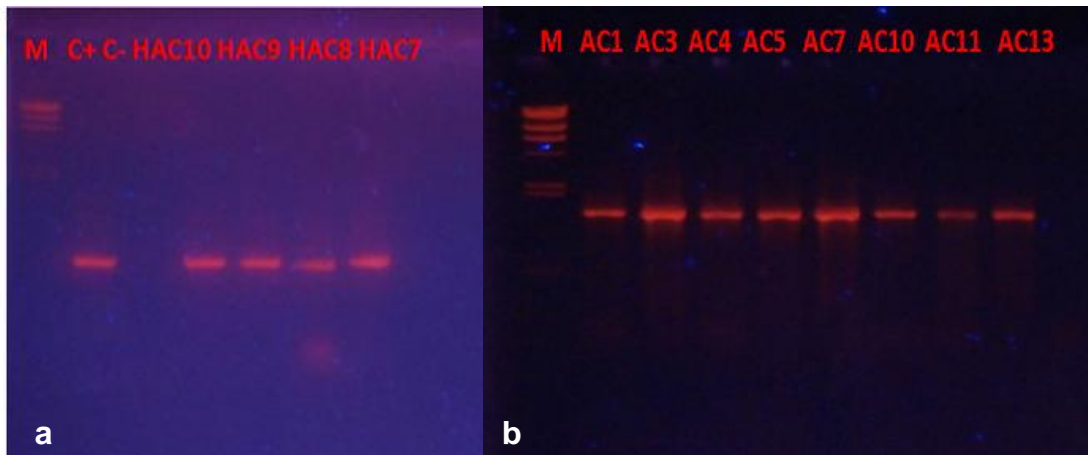


Figura 06: (a) Gel de electroforesis de PCR fúngico, control + *A. niger*; (b) Gel de electroforesis de PCR bacteriana de muestras de agua.

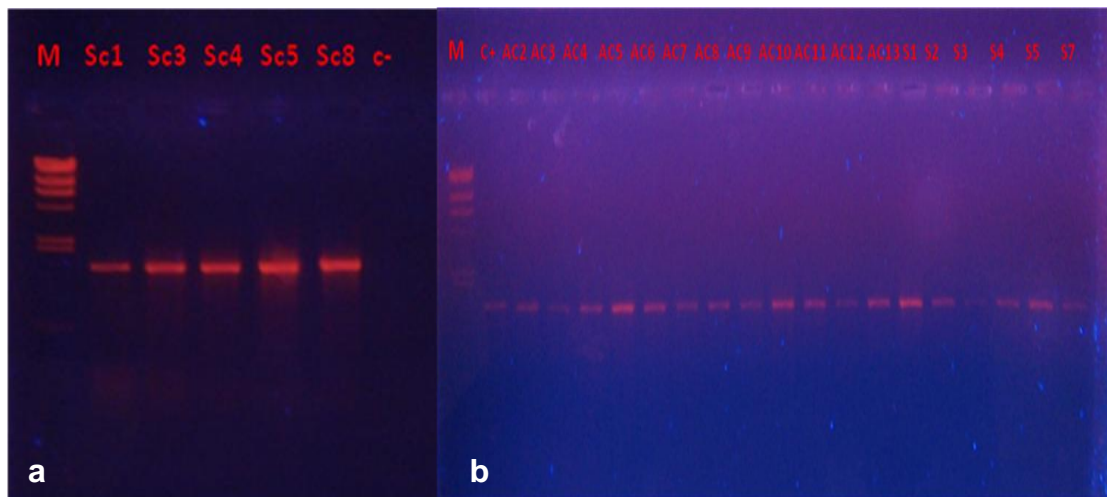


Figura 07: (a) Gel de electroforesis de PCR de bacterias de muestras de suelo; (b) gel de electroforesis de PCR de bacterias de muestras de agua y suelo, control + fue *E.coli*.

Posteriormente, los productos amplificados de PCR de las 26 cepas fueron enviados a la empresa Macrogen Corea Inc. Según, los cromatogramas recibidos (Ver anexo 05, figura 53), se editaron las secuencias y se construyeron los arboles filogenéticos.

En la figura 08, del árbol filogenético se infiere que las cepas bacterianas aisladas tienen similitud entre ellas, formándose un grupo. Sin embargo, mantiene similitud con las diferentes especies de *Geobacillus* y *Bacillus*, con una cobertura de entre 99-100%, y homología al 99%. Para el alineamiento se trabajo con secuencias completas de 16S rRNA ribosomal obtenidas de Blast-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

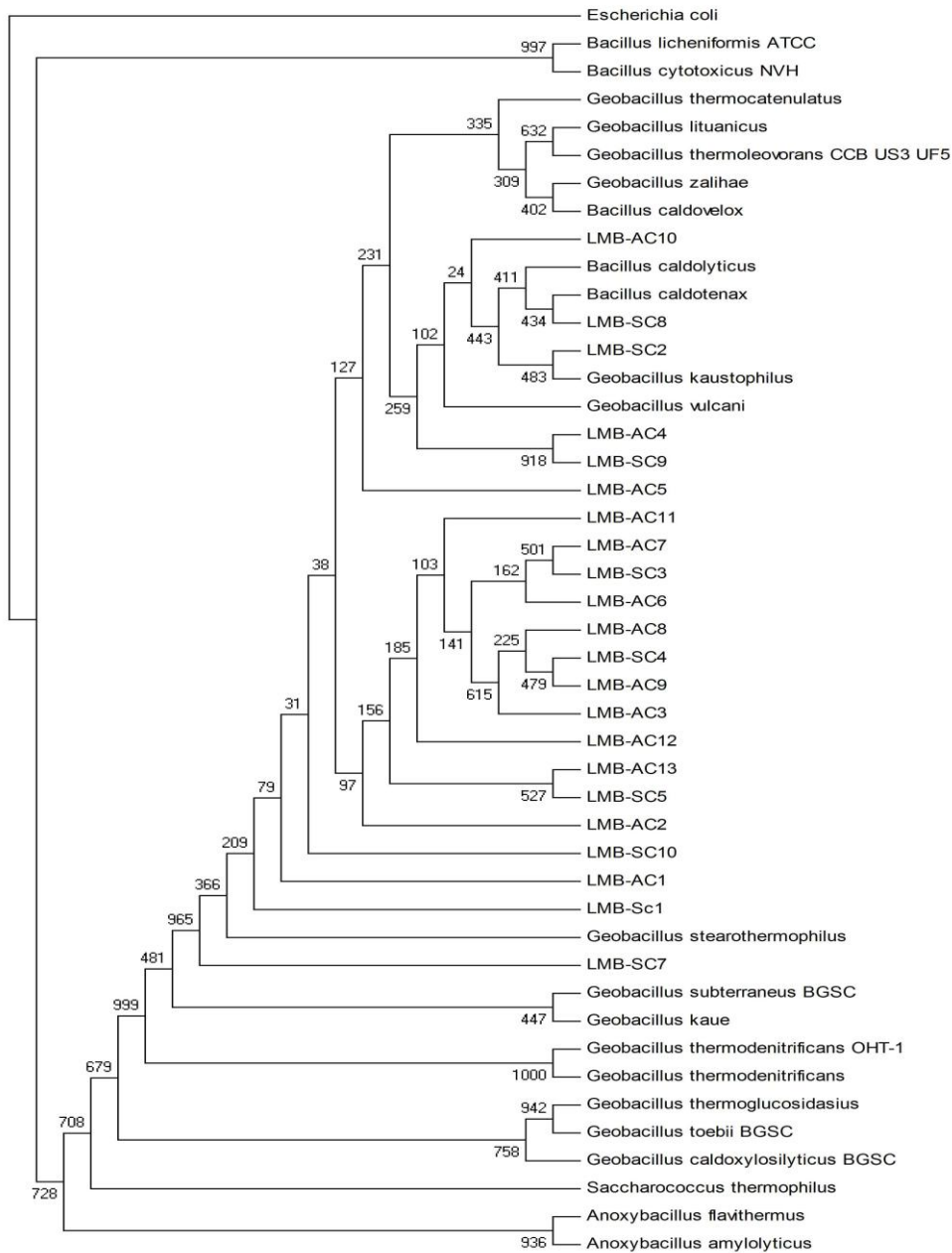


Figura 08: Árbol filogenético de las cepas bacterianas de aguas termales en Aguas Calientes construido a partir de la secuencia del gen 16S rRNA con especies relacionadas obtenidas en el BLASTN. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se uso el método Neighbour-joining con 1000 bootstraps y *Escherichia coli* CICC 10305 fue empleada como fuera del grupo (Outgroup).

En la figura 09, se deduce del árbol filogenético que las cepas fúngicas aisladas tienen similitud con el género *Aspergillus*. Asimismo, se obtuvo una cobertura y homología de identificación con el 100%, siendo LMB-HAC8 similar con la especie *A. tubingensis*, LMB-HAC9 con *A. niger*, LMB-HAC10 y LMB-HAC7 con *A. fumigatus*.

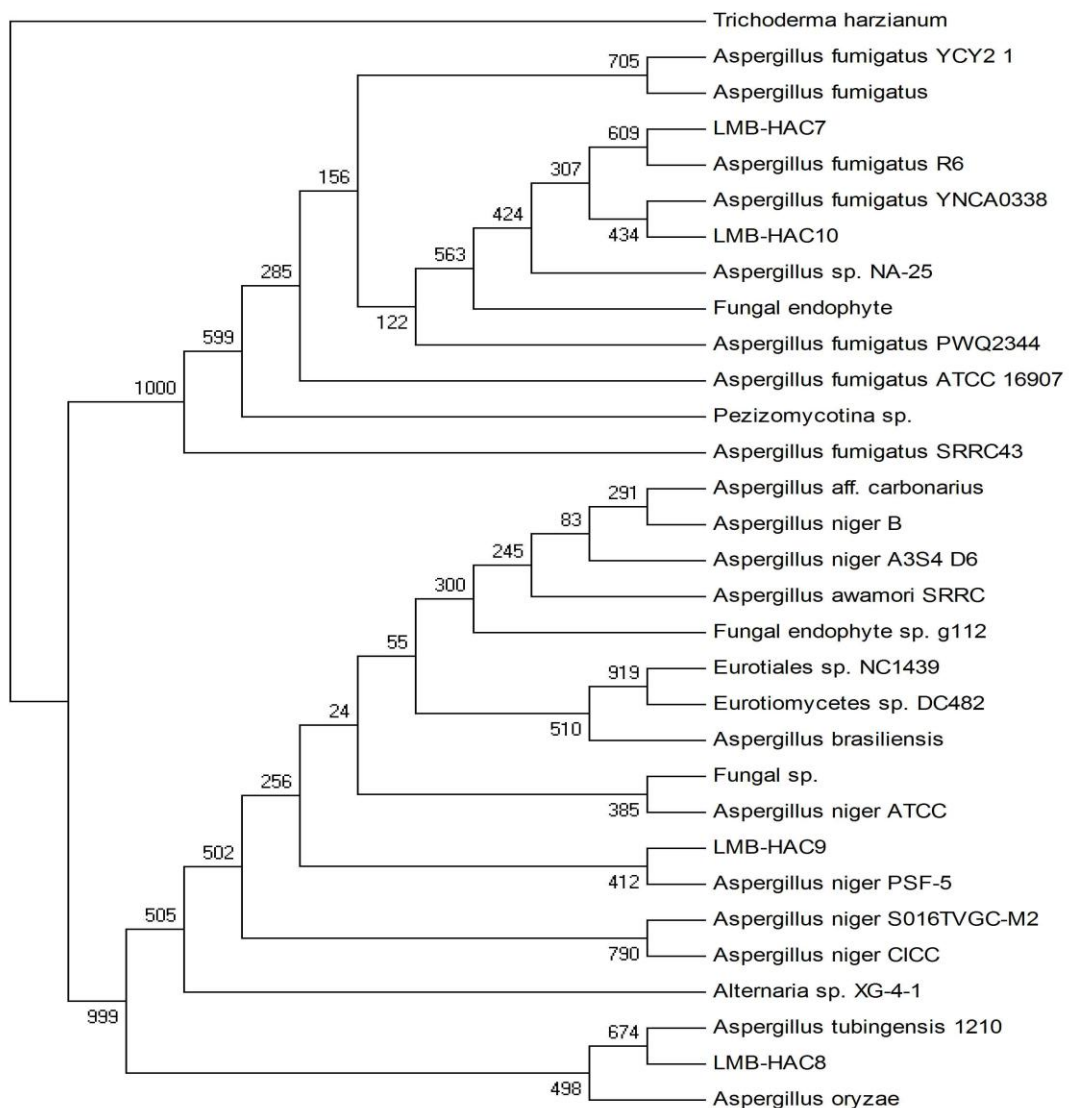


Figura 09: Árbol filogenético construido con la secuencia de regiones intergénicas ITS1 e ITS4 de las cepas fúngicas de suelo en Aguas Calientes: LMB-HAC7, LMB-

HAC8, LMB-HAC9, LMB-HAC10 con especies relacionadas obtenidas en el BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se uso el método Neighbour-joining con 1000 bootstraps. *Trichoderma cf. harzianum* CBS 100.527 fue empleado como grupo externo (Outgroup).

4) Evaluación de temperatura de crecimiento de hongos

Se evaluó el crecimiento de los hongos seleccionados a diferentes temperaturas. La producción de biomasa obtenida durante cuatro días de incubación se determinó por diferencia de peso seco. Las biomásas filtradas y cepas en placas se muestran en la figura 54 (Ver anexo 06).

Como se muestra en la figura 10 se obtuvo la mayor biomasa a LMB-HAC7 (7,4 g/l) y LMB-HAC9 con 6,1 g/l a una temperatura de 50°C; LMB-HAC8 con 4,9 g/l a 35°C; y LMB-HAC10 con 6,4 g/l a 45°C.

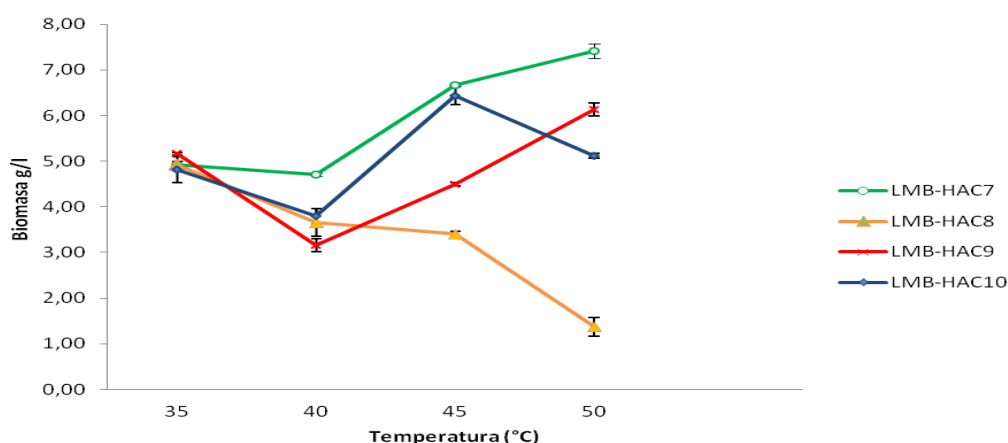


Figura 10: Variación de la biomasa de cepas fúngicas de celulasas neutroalcalinas en diferentes temperaturas de crecimiento.

En la figura 11, se compara la biomasa obtenida de cultivos líquidos durante la incubación de 4 días a pH 7,4. La cepa LMB-HAC7 con 2,8 g/l produjo mayor biomasa seguida de LMB-HAC9 con 2,2 g/l.

La cepa LMB-HAC8 con 2,0 g/l y LMB-HAC10 con 1,9 g/l produjeron menor biomasa en este ensayo.

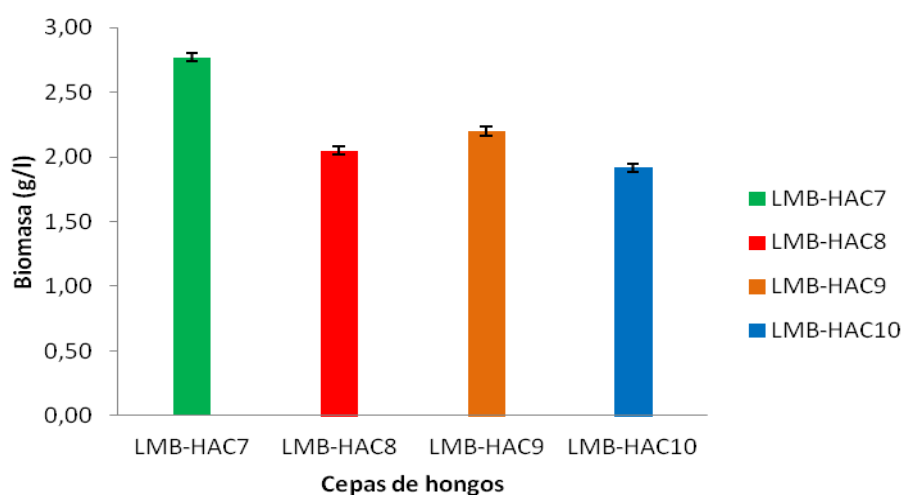


Figura 11: Comparación de la biomasa de hongos productores de celulasas neutroalcalinas a 50°C.

5) Cuantificación de actividad celulolítica

Como se muestra en la figura 12, la mayor actividad endoglucanasa se obtuvo la cepa LMB-AC10 con 9,6 UI/ml a pH7,4 y con 4,5 UI/ml a pH8,4. Por otro parte, la cepa LMB-AC8 obtuvo su mayor actividad a pH 9,4 con 3,1 UI/ml; y LMB-AC5 con 2,6 UI/ml a pH 10,4.

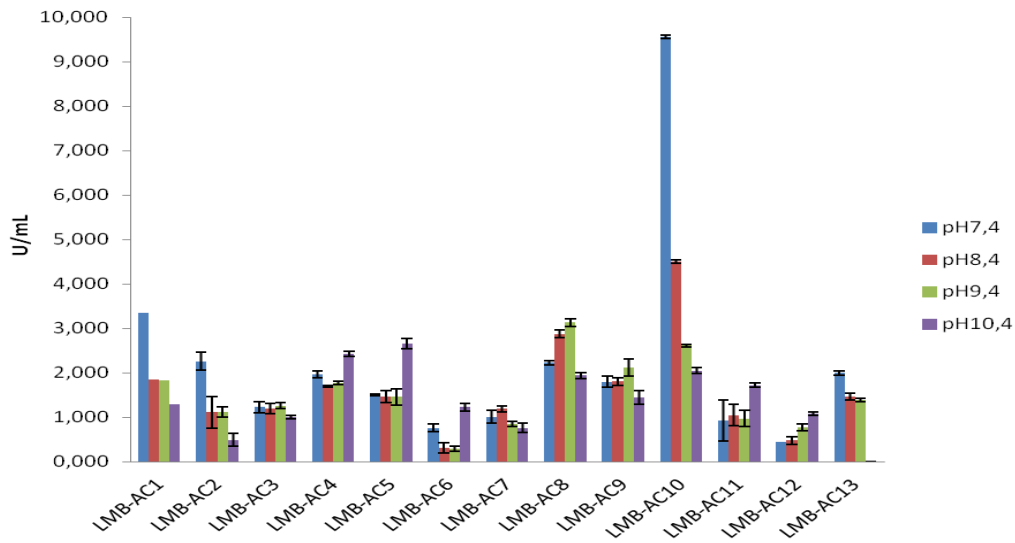


Figura 12: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de agua a diferentes pH e incubados a 50°C.

Como se demuestra en la figura 13, la máxima actividad endoglucanasa corresponde a la cepa LMB-AC6 con 6,9 UI/ml a pH 7,4. Sin embargo, la cepa LMB-AC3 con 6,5 UI/ml a pH 7,4; con 6,6 UI/ml a pH 8,4; con 6,6 UI/ml a pH 9,4 demostró su actividad constante y un aumento a pH 10,4 con 7,6 UI/ml siendo productora de celulasa neutroalcalina. Como se muestra en la figura 55 (Ver anexo 07).

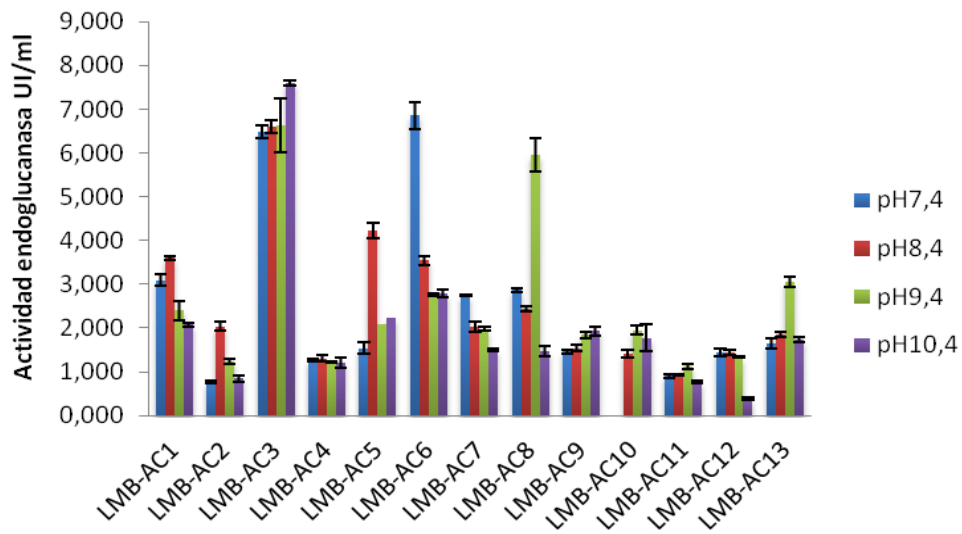


Figura 13: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de agua a diferentes pH e incubados a 60°C.

De la figura14, se infiere que la actividad endoglucanasa en la cepa LMB-AC7 obtuvo el máximo desempeño a un pH 7,4 con 3,3 UI/ml, con 3,2 UI/ml a pH8,4 con 4,3 UI/ml a pH 9,4 y a pH 10,4 con 2,2 UI/ml. Sin embargo, la cepa LMB-AC1 obtuvo la máxima actividad a pH 10,4 con 2,5 UI/ml.

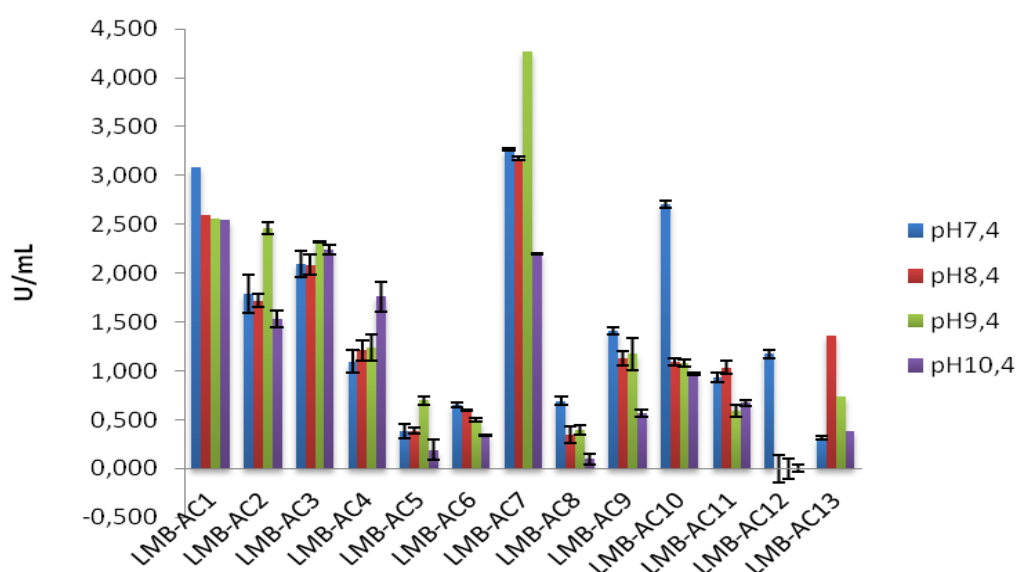


Figura 14: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de agua a diferentes pH e incubados a 70°C.

En el cuadro 04, muestra que el valor-p es menor a 0,05 de las tres variables en estudio. Estos tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad endoglucanasa con un 95% de nivel de confianza.

Cuadro 04: Análisis de Varianza para ACTIVIDAD - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cepa	219,377	12	18,2814	11,80	0,0000
B:pH	18,5704	3	6,19013	3,99	0,0080
C:Temperatura	93,3794	2	46,6897	30,13	0,0000
RESIDUOS	697,365	450	1,5497		
TOTAL (CORREGIDO)	1028,69	467			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

En el cuadro 05, la prueba DUNCAN indica que la mejor cepa es LMB-AC3 por obtener un valor mayor en la variable actividad. Estadísticamente se formaron seis grupos homogéneos, es decir, existe diferencias significativas. Tal como se muestra en la figura 15.

Cuadro 05: Pruebas de Múltiple Rangos para Actividad por Cepa

<i>Cepa</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMB-AC12	36	0,712464	0,207478	X
LMB-AC11	36	0,970179	0,207478	XX
LMB-AC13	36	1,32933	0,207478	XX
LMB-AC2	36	1,44691	0,207478	XXX
LMB-AC4	36	1,51253	0,207478	XXX
LMB-AC9	36	1,51796	0,207478	XXX
LMB-AC5	36	1,5698	0,207478	XXX
LMB-AC6	36	1,72039	0,207478	XX
LMB-AC8	36	2,03637	0,207478	XX
LMB-AC7	36	2,08235	0,207478	XX
LMB-AC10	36	2,47686	0,207478	X
LMB-AC1	36	2,5201	0,207478	X
LMB-AC3	36	3,39481	0,207478	X

Método: 95.0 porcentaje Duncan

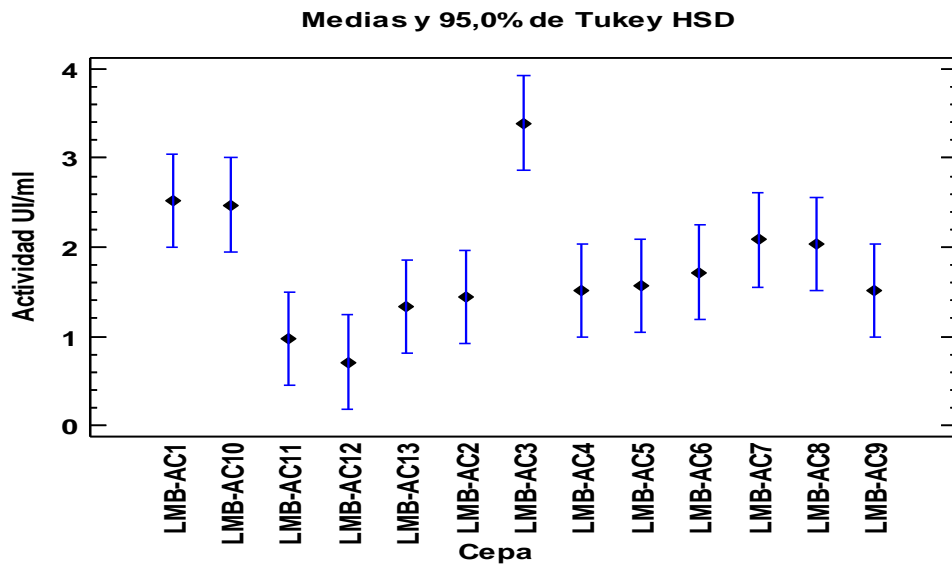


Figura 15: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa y las cepas. La mayor actividad endoglucanasa la obtuvo LMB-AC3. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS

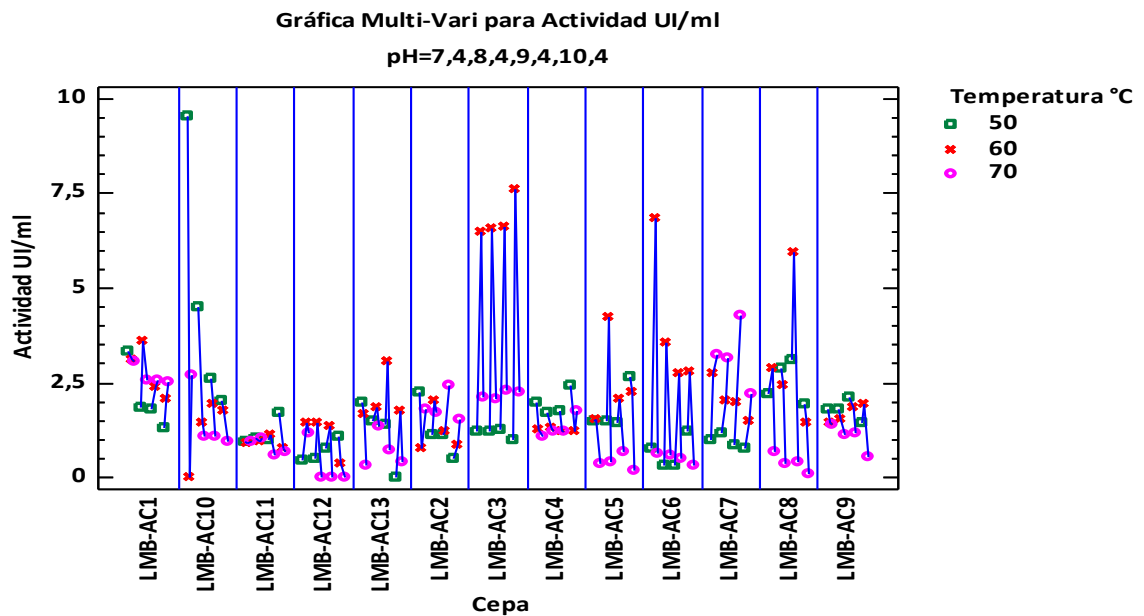


Figura 16: El gráfico muestra el comportamiento de la actividad de cada cepa en función de la temperatura y el pH.

En el cuadro 06, la prueba de DUNCAN muestra significancia entre los tres grupos de temperaturas, siendo la óptima temperatura 60°C, seguido de 50°C y a 70°C se produce menor actividad. Así, como se muestra en la figura 17.

Cuadro 06: Pruebas de Múltiple Rangos para Actividad por Temperatura

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
70°C	156	1,30396	0,0996693	X
50°C	156	1,68749	0,0996693	X
60°C	156	2,38317	0,0996693	X

Método: 95.0 porcentaje Duncan

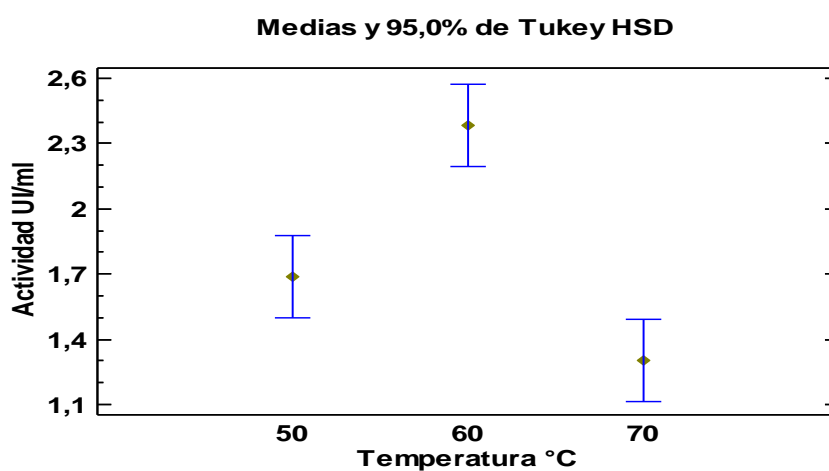


Figura 17: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa a diferentes temperaturas. La mejor temperatura para trabajar la actividad endoglucanasa es 60°C. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS.

Gráfica Multi-Vari para Actividad UI/ml

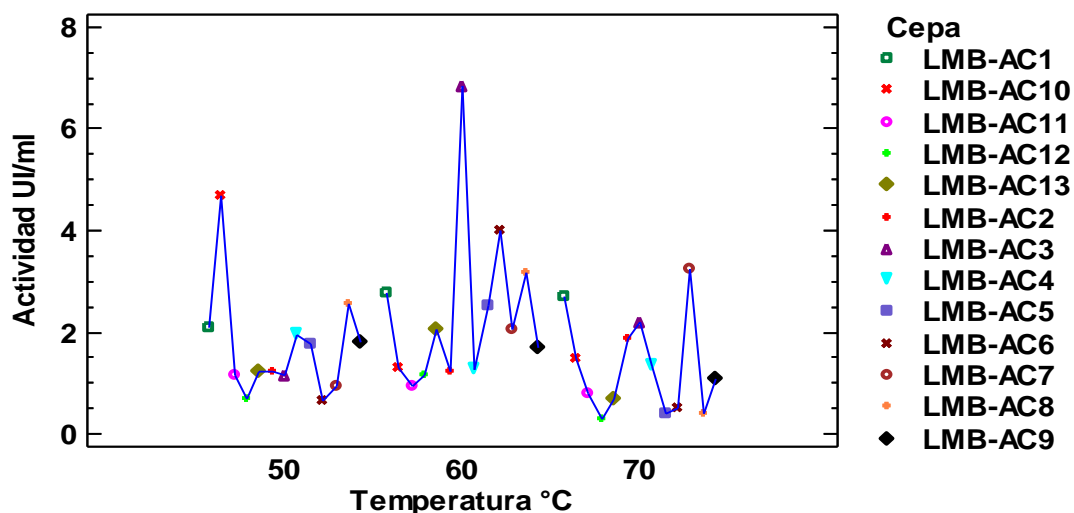


Figura 18: El gráfico muestra la actividad de cada temperatura en función de las cepas.

En el cuadro 07, la prueba DUNCAN reporta que existen dos grupos homogéneos en el variable pH, no existiendo diferencias estadísticamente significativas al pH 7,4; 8,4 y 9,4; pero el pH 10,4 si es significativo presentando una baja actividad.

Cuadro 07: Pruebas de Múltiple Rangos para Actividad por pH

pH	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10,4	117	1,48532	0,115088	X
8,4	117	1,81313	0,115088	X
9,4	117	1,82437	0,115088	X
7,4	117	2,04334	0,115088	X

Método: 95.0 porcentaje Duncan

En la figura 19, se muestra que el mejor pH con respecto a la actividad endoglucanasa de las cepas es a pH 7,4; pero estadísticamente no hay diferencia significativa a pH 8,4 y 9,4.

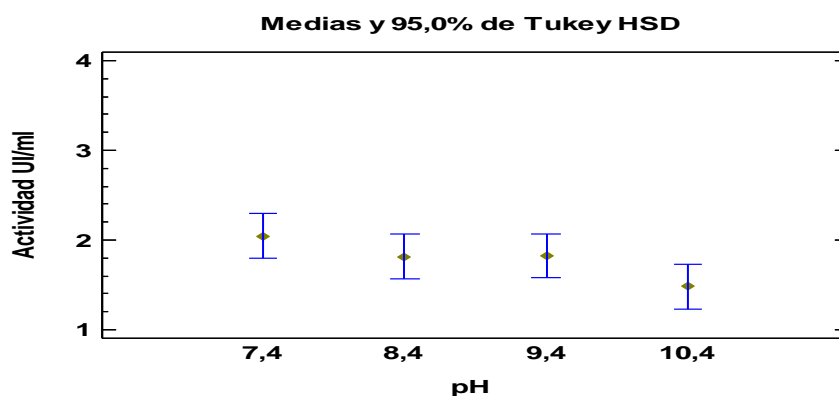


Figura 19: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa a diferentes pH.

El gráfico muestra al pH 7,4 como el mejor. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS.

En la figura 20, el gráfico muestra la actividad de endoglucanasa de las cepas en los diferentes pH estudiados. La cepa LMB-AC10 tuvo alta actividad a pH 7,4.

Gráfica Multi-Vari para Actividad UI/ml

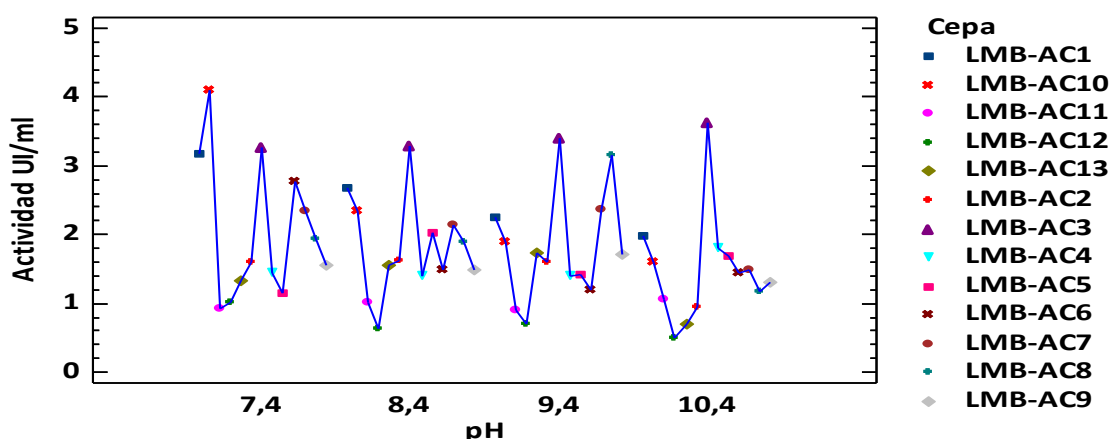


Figura 20: El gráfico muestra la actividad de cada pH en función de las cepas.

En la figura 21, se deduce que la mayor actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de suelo se obtuvo en el pH 7,4. Las cepas LMB-SC5 y LMB-SC8 con 4,5 UI/ml. Además, que la cepa LMB-SC8 mantuvo la mayor actividad a pH 8,4 con 3,6 UI/ml.

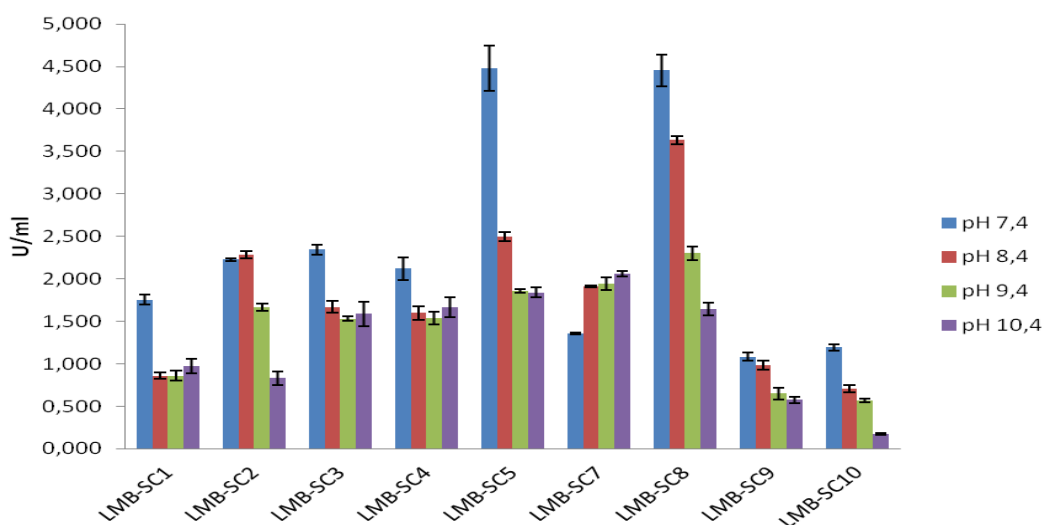


Figura 21: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 50°C.

En la figura 22, se deduce que existen diferencias entre las cepas con respecto al pH. La cepa con mayor actividad endoglucanasa es LMB-SC4 con 5,2 UI/ml a pH 7,4 con 4,2 UI/ml a pH 8,4 con 4,1 UI/ml a pH 9,4 y pH 10,4 con 2,9 UI/ml, considerándose la mejor cepa en este estudio.

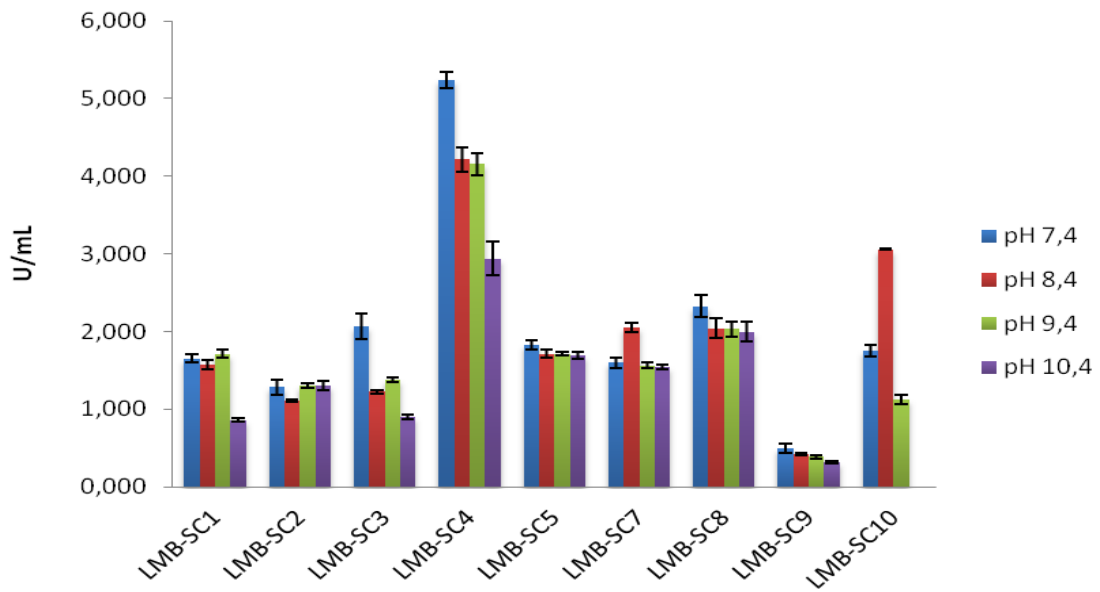


Figura 22: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 60°C.

Como se demuestra en la figura 23, la cepa con mayor actividad en pH 7,4 es LMB-SC5 con 2,8 UI/ml; en pH 8,4 es LMB-SC3 con 2,4 UI/ml; en pH 9,4 es LMB-SC2 con 3,6 UI/ml y en pH 10,4 con 1,5 UI/ml es LMB-SC8. En conclusión, influye el pH en la actividad de cada cepa.

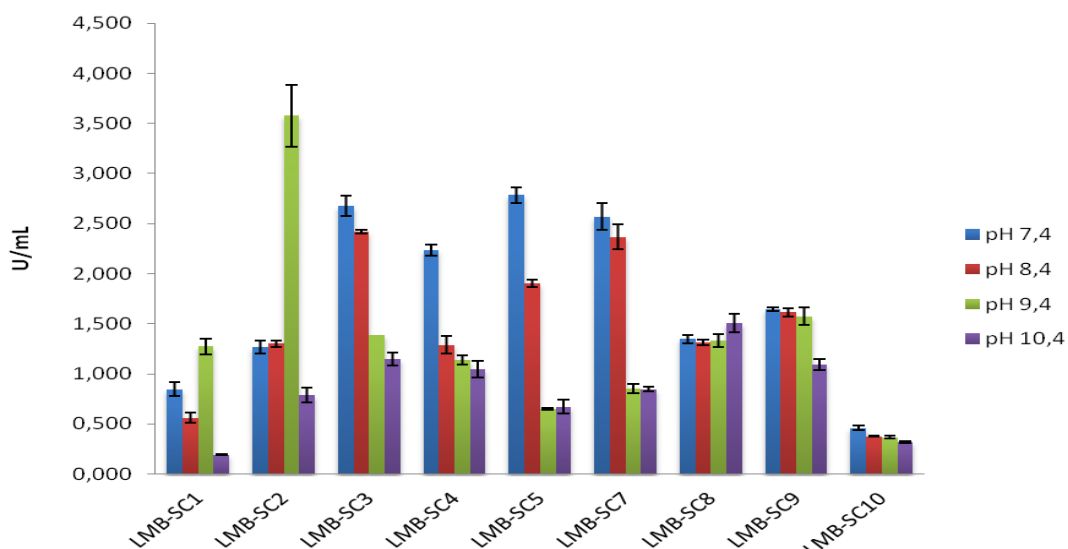


Figura 23: Comparación de la actividad endoglucanasa de las bacterias aisladas de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 70°C.

En el cuadro 08, según la tabla ANOVA se muestran que los tres valores-P son menores a 0,05; por lo tanto, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre actividad endoglucanasa con un 95,0% de nivel de confianza.

Cuadro 08: Análisis de Varianza para ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CEPA	89,6647	8	11,2081	21,11	0,0000
B:pH	35,7795	3	11,9265	22,46	0,0000
C:TEMPERATURA	9,7661	2	4,88305	9,20	0,0001
RESIDUOS	164,593	310	0,530946		
TOTAL (CORREGIDO)	299,804	323			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En el cuadro 09, la prueba DUNCAN muestra la conformación de 5 grupos homogéneos, siendo las mejores cepas LMB-SC4 y LMB-SC8. Estadísticamente las cepas que produjeron menor actividad fueron LMB-SC10, LMB-SC9 y LMB-SC1. Como se muestra en la siguiente figura 24.

Cuadro 09: Pruebas de Múltiple Rangos para ACTIVIDAD (UI/ml) por Cepa

<i>CEPA</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMB-SC10	36	0,842417	0,121443	X
LMB-SC9	36	0,902	0,121443	X
LMB-SC1	36	1,08781	0,121443	X
LMB-SC2	36	1,57811	0,121443	X
LMB-SC3	36	1,69386	0,121443	XX
LMB-SC7	36	1,722	0,121443	XX
LMB-SC5	36	1,96872	0,121443	XX
LMB-SC8	36	2,16056	0,121443	XX
LMB-SC4	36	2,43239	0,121443	X

Método: 95.0 porcentaje Duncan

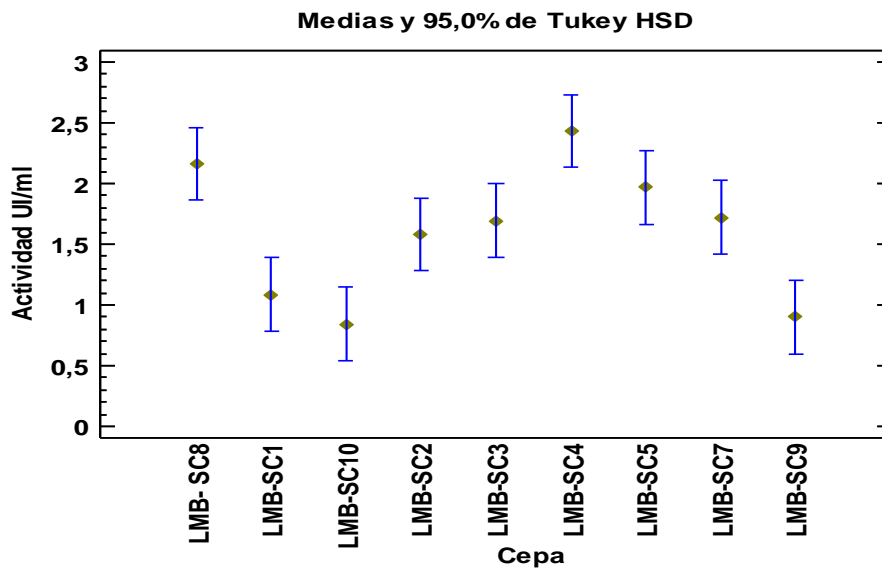


Figura 24: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa entre las cepas.

Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS.

En la figura 25, se muestra el comportamiento de la actividad de cada cepa en función de la temperatura y el pH. La cepa LMB-SC4 mostró alta actividad a pH 7,4 con 60°C. Por otro lado, la cepa LMB-SC8 y LMB-SC5 demostraron máxima actividad a pH 7,4 con 50°C. Sin embargo, la cepa LMB-SC2 obtuvo mayor actividad a pH 9,4 a 70°C.

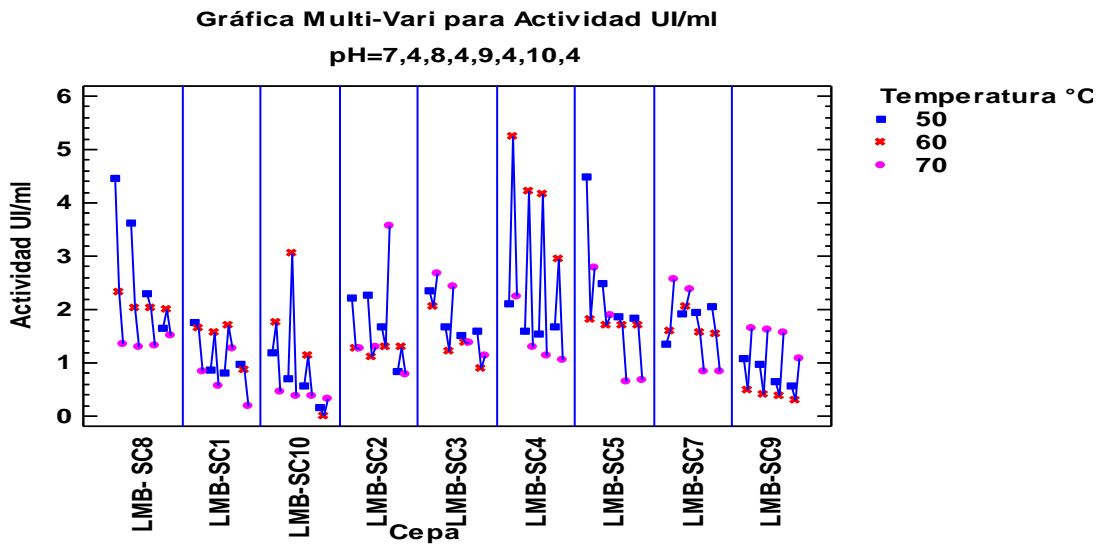


Figura 25: El gráfico muestra la actividad de cada cepa entre la temperatura y pH.

Como se muestra en el cuadro 10, la prueba DUNCAN muestra la conformación de 2 grupos homogéneos, siendo las mejores temperaturas a 60 y 50°C. Estadísticamente, la que produce baja actividad es a una temperatura de 70°C. Como se presenta en la figura 26.

Cuadro 10: Pruebas de Múltiple Rangos para ACTIVIDAD (UI/ml) por

TEMPERATURA

TEMPERATURA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
70°C	108	1,35384	0,0701154	X
50°C	108	1,70478	0,0701154	X
60°C	108	1,73733	0,0701154	X

Método: 95,0 porcentaje Duncan

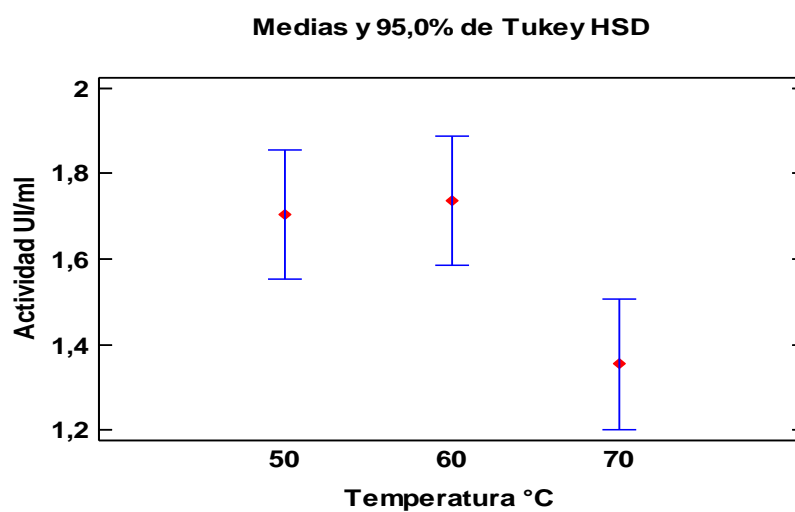


Figura 26: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa entre la temperatura. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS.

En la figura 27, el gráfico muestra el comportamiento de la actividad endoglucanasa para cada temperatura en relación con la cepa y pH. La cepa LMB-SC4 obtuvo mayor actividad a 60°C. Se deduce diferencias en el comportamiento que tiene cada cepa bacteriana frente a las temperaturas estudiadas.

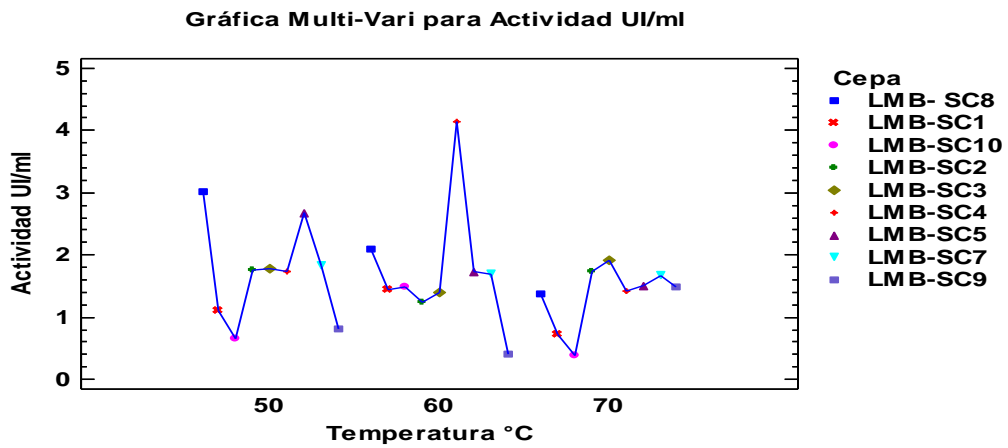


Figura 27: El gráfico muestra la actividad endoglucanasa de cada temperatura respecto a las cepas.

En el cuadro 11, se muestra que se forma cuatro grupos homogéneos, siendo el mejor a pH 7,4 y el pH que menor actividad tuvo es pH 10,4. Tal como se muestra en la figura 28.

Cuadro 11: Pruebas de Múltiple Rangos para ACTIVIDAD endoglucanasa por pH

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
pH 10,4	81	1,13002	0,0809623	X
pH 9,4	81	1,49573	0,0809623	X
pH 8,4	81	1,72921	0,0809623	X
pH 7,4	81	2,03964	0,0809623	X

Método: 95,0 porcentaje Duncan

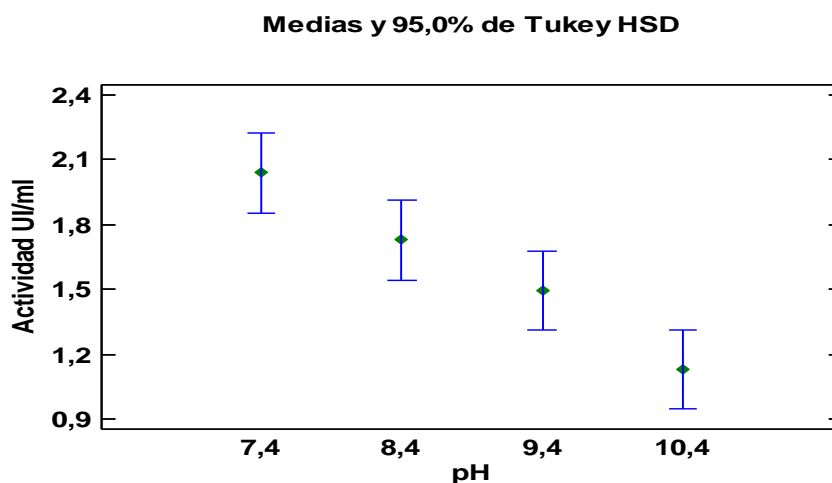


Figura 28: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa entre los diferentes pH. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS.

En la figura 29, el gráfico muestra la actividad de cada pH en función de las cepas. Se deduce que existe variación de la actividad de cada cepa bacteriana frente a los cuatro pH estudiados. Por consiguiente, tuvieron similitud de la actividad endoglucanasa, la cepa LMB-SC8 y LMB-SC5 a 50°C con pH7,4. La mejor cepa fue LMB-SC4 en comparación de las otras obteniendo máximo valor en los cuatro pH en estudio.

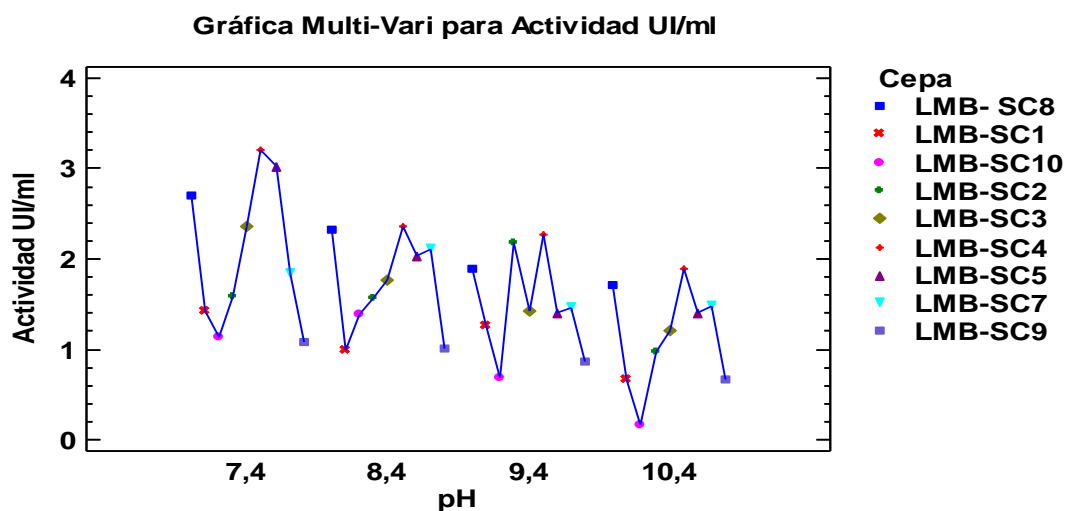


Figura 29: El gráfico muestra el comportamiento de la actividad endoglucanasa a cada pH en función de las cepas.

Como se muestra en la figura 30, se deriva que existen diferencias de actividad endoglucanasa de las cepas fúngicas. La mayor actividad producida fue la cepa LMB-HAC9 con 1,4 UI/ml a un pH 7,4. Sin embargo, su actividad se mantiene mayor frente a las otras cepas hasta el pH 9,4 con 0,6 UI/ml. Las cepas LMB-HAC7 y LMB-HAC9 no produjeron actividad a pH 10,4.

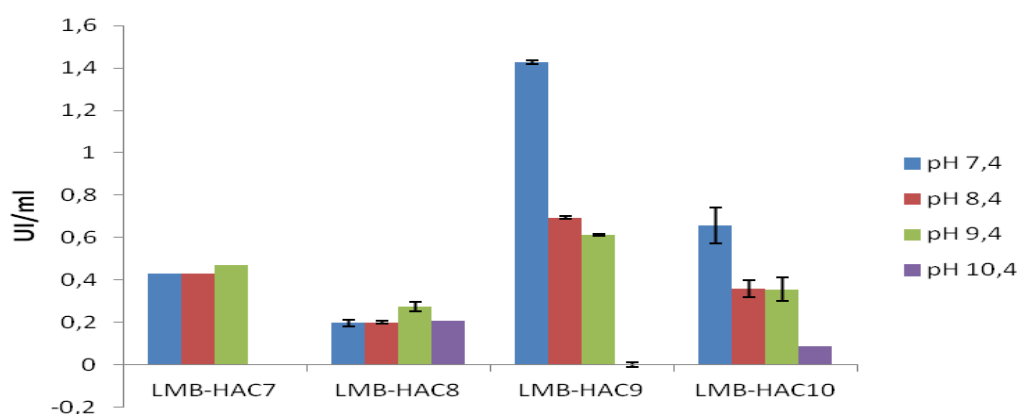


Figura 30: Comparación de la actividad endoglucanasa de los hongos aislados de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 50°C.

En la figura 31, se muestra que la mejor cepa es LMB-HAC9 con mayor actividad endoglucanasa de 2,3 UI/ml a pH 7,4. Por otra parte, a los pH 8,4; 9,4 y 10,4 las cepas tuvieron una baja actividad menor a 1 UI/ml.

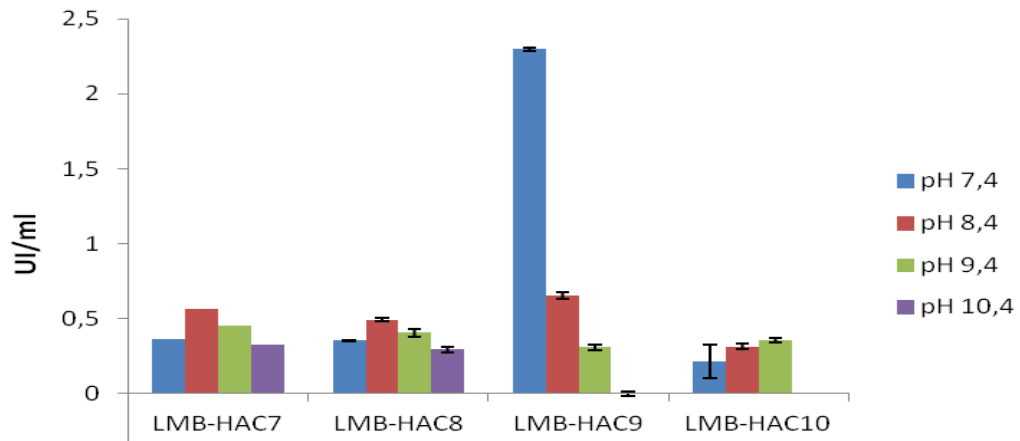


Figura 31: Comparación de la actividad endoglucanasa de los hongos aislados de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 60°C.

En la figura 32, se muestra que la mejor cepa con mayor actividad es LMB-HAC9 comparando con las demás cepas con 0,8 UI/ml a pH 7,4 y con 0,9 UI/ml a pH9,4. Todas las cepas no mostraron actividad a pH 10,4; excepto, la cepa LMB-HAC10 que tuvo una baja actividad con 0,2 UI/ml.

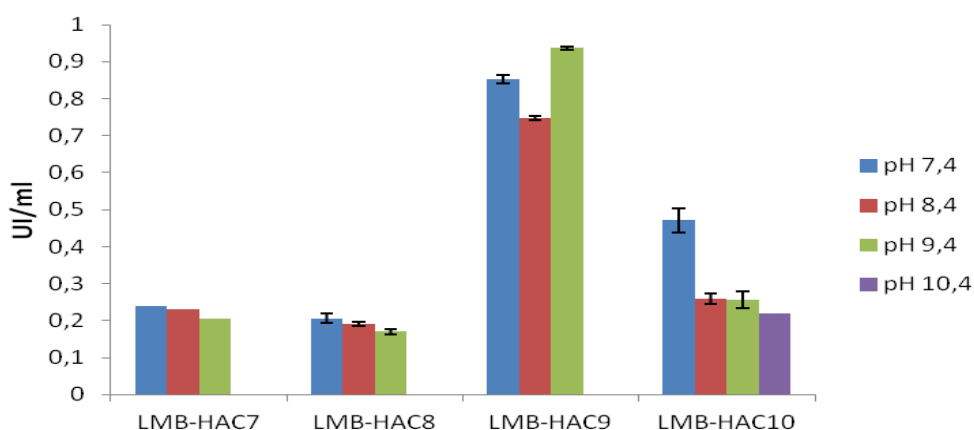


Figura 32: Comparación de la actividad endoglucanasa de los hongos aislados de muestras de suelo a diferentes pH e incubados a 70°C.

En el cuadro 12, indica que las variables cepa, pH y temperatura, son estadísticamente significativas para la variable actividad endoglucanasa en estudio, debido a que el valor-p es menor a 0,05.

Cuadro 12: Análisis de Varianza para ACTIVIDAD - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CEPA	4,97531	3	1,65844	20,44	0,0000
B:pH	5,51236	3	1,83745	22,64	0,0000
C:TEMPERATURA	0,55915	2	0,279575	3,45	0,0347
RESIDUOS	10,9541	135	0,0811419		
TOTAL (CORREGIDO)	22,001	143			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

En el cuadro 13, la prueba DUNCAN indica que la cepa LMB-HAC9 es la mejor por obtener un valor mayor en la variable actividad endoglucanasa. Existen dos grupos homogéneos, siendo la cepa LMB-HAC8, LMB-HAC10 y LMB-HAC7 estadísticamente lo mismo y la cepa LMB-HAC9 formando otro grupo, además se reporta que es la mejor cepa para producir actividad endoglucanasa. Como se demuestra en la figura 33.

Cuadro 13: Pruebas de Múltiple Rangos para ACTIVIDAD por CEPA

CEPA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
LMB-HAC8	36	0,250111	0,0880679	X
LMB-HAC10	36	0,296083	0,0880679	X
LMB-HAC7	36	0,310028	0,0880679	X
LMB-HAC9	36	0,711611	0,0880679	X

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Medias y 95,0% de Tukey HSD

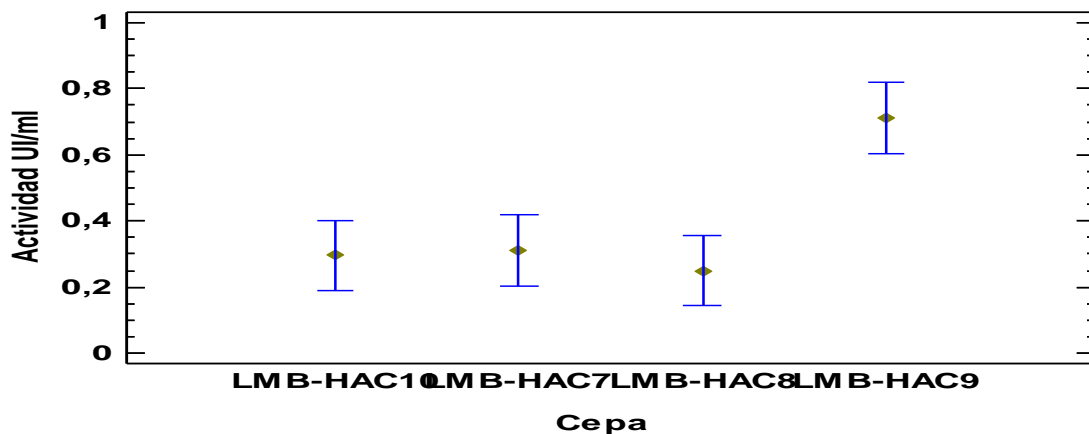


Figura 33: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa y las cepas fúngicas. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS.

En la figura 34, el gráfico muestra el comportamiento de cada cepa con respecto a los pH y temperatura en estudio, además se observa que las cepas LMB-HAC10, LMB-HAC7 y LMB-HAC8, estadísticamente son lo mismo. La mejor cepa en este estudio es LMB-HAC9 trabajado al pH de 7,4.

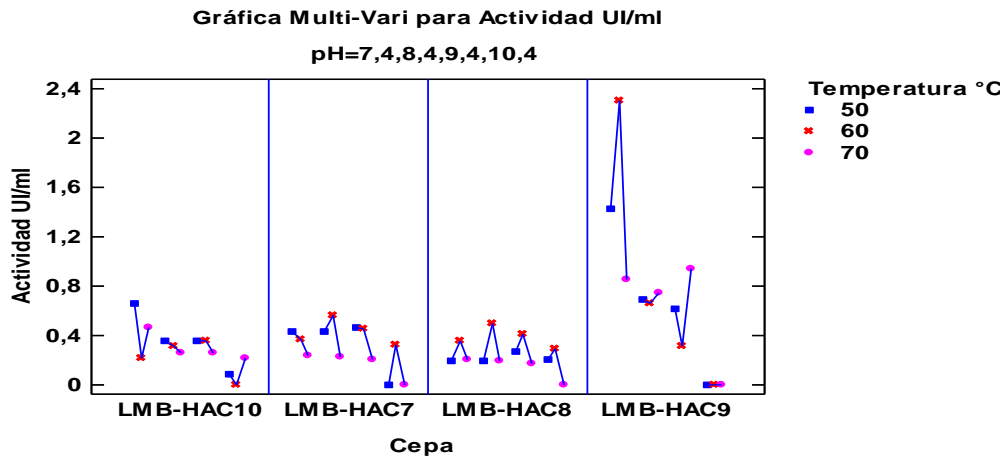


Figura 34: El gráfico muestra la actividad endoglucanasa de cada cepa y los diferentes pH y temperatura.

En el cuadro 14, la prueba de DUNCAN indica que a temperatura de 60°C hay mayor producción de actividad de las cepas fúngicas. Estadísticamente, conforman dos grupos homogéneos. El de menor actividad es a 70°C. Como se muestra en la figura 35.

Cuadro 14: Pruebas de Múltiple Rangos para ACTIVIDAD por TEMPERATURA

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupo homogéneo
70	48	0,311625	0,0411151	X
50	48	0,40075	0,0411151	XX
60	48	0,4635	0,0411151	X

Método: 95,0 porcentaje Duncan

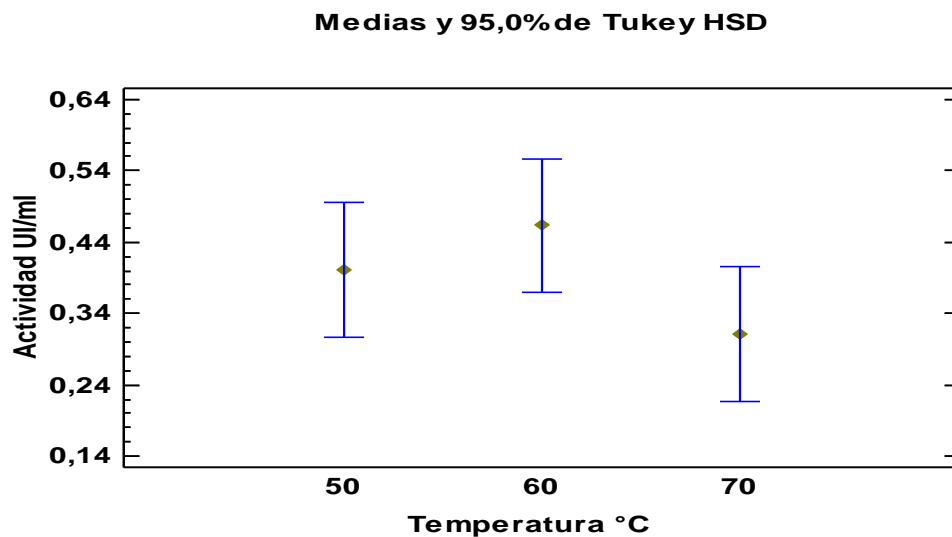


Figura 35: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa en función a la temperatura. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS.

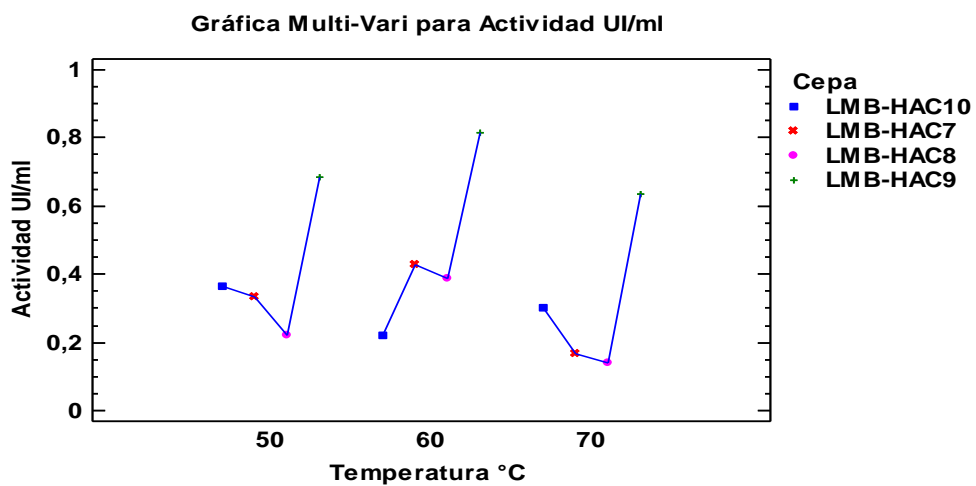


Figura 36: El gráfico muestra el comportamiento de la actividad endoglucanasa en cada temperatura en función de las cepas y pH.

En el cuadro 15, la prueba DUNCAN reporta que en la variable pH existen dos grupos homogéneos. El pH 7,4; 8,4 y 9,4; estadísticamente son los mismos, y el pH 10,4 es otro grupo, pero este presenta baja actividad. Como se muestra en la siguiente figura 37.

Cuadro 15: Pruebas de Múltiple Rangos para ACTIVIDAD por pH

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
10,4	12	0,0943333	0,0880679	X
9,4	12	0,401333	0,0880679	X
8,4	12	0,42875	0,0880679	X
7,4	12	0,643167	0,0880679	X

Método: 95,0 porcentaje Duncan

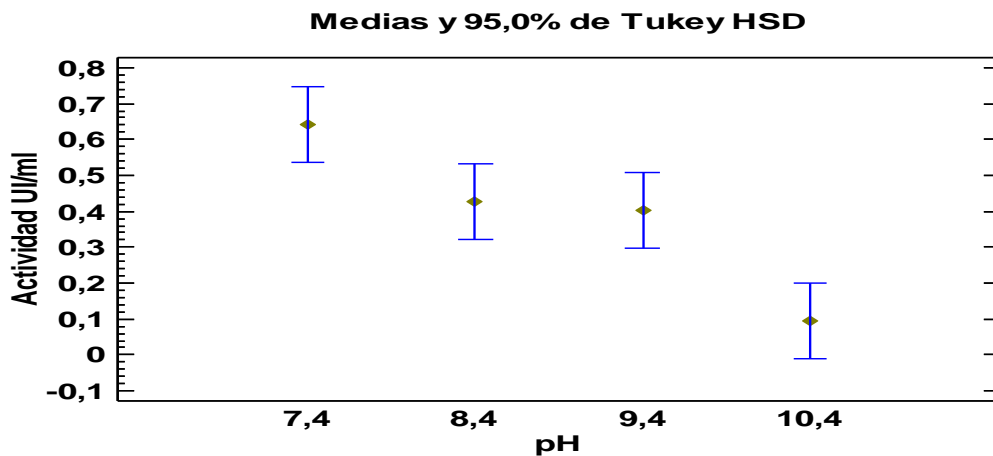


Figura 37: Comparación de medias de la actividad endoglucanasa y los diferentes pH. Los valores son promedios de tres repeticiones \pm DS.

En la siguiente figura 38, el gráfico muestra la actividad de endoglucanasa de las cepas agrupados en los diferentes pH. En el pH 10,4 las cepas fúngicas presentaron baja actividad endoglucanasa menor a 0,4 UI/ml.

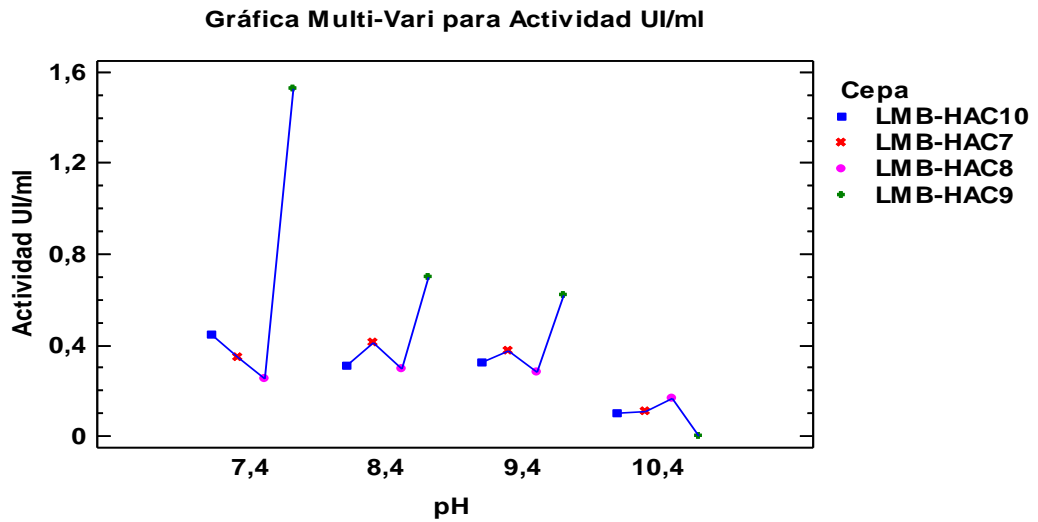


Figura 38: El gráfico muestra la actividad endoglucanasa de cada cepa en función a los diferentes pH.

VI. DISCUSION

Aislamiento primario de cepas productoras de celulasas neutroalcalinas

La utilización de la celulosa microcristalina como sustrato obtuvo cepas que producen actividad endoglucanasa [88]. Otros emplearon celulosa y asparagina [78]; además, mencionan que sustratos celulósicos insolubles como el papel filtro son efectivos sustratos en el caso de algunos hongos [89]. Sin embargo, existen otros efectivos sustratos como en el caso de este estudio, que se emplearon como fuente de carbono carboximetilcelulosa y xilosa, obteniendo cepas con actividad enzimática de tipo endoglucanasa en bacterias y hongos.

En estudios de los suelos indican que existe mucho más efecto estimulador de celulasas en suelo negro que en suelos rojos [90]; siendo este el caso para las muestras de suelo en este estudio. Por otra parte, reportan que en los manantiales termales con pH alcalino tienen poca diversidad microbiana, predominando bacilos gram positivos como el género *Bacillus* [91]. De forma similar en este estudio, las cepas evaluadas a 70°C y pH neutro en muestras de aguas predominaron bacilos gram positivos siendo bacterias esporógenas a condiciones adversas. Por el contrario, carece de presencia de hongos en estas muestras, debido a que las esporas de estos no son resistentes al mismo grado a las altas temperaturas que las esporas de las bacterias encontradas en este estudio. Además, que no son típicos hábitats de hongos.

Tamizado secundario de cepas productoras de celulasas neutroalcalinas

La técnica de zona clara en medio de carboximetilcelulosa exhibe cualitativamente la habilidad de las cepas para producir celulasas [41]. Por esta razón, esta técnica es adecuada, para este trabajo y otros relacionados al tema. Sin embargo, en la técnica del “disco de agar” es aplicable por su sensibilidad y la rapidez para un mayor número de muestras. En relación con el pH, en hongos el pH 5,3 es el óptimo y a temperatura de 50°C [92]. Por el contrario en este estudio, se obtuvo a pH7,4 con los halos de hidrólisis en bacterias y hongos a ensayo de 50°C. Sin embargo, no ocurrió lo mismo a un pH más alcalino.

Identificación molecular

En el alineamiento de las secuencias del gen 16S rRNA con GenBank, las cepas productoras de endoglucanasa, de las cuales 13 de muestras de agua y 9 de suelo, presentaron un 99% de identidad con el género *Bacillus* a las cepas LMB-SC2, LMB-AC10 y el género *Geobacillus* para el resto de las cepas. Asimismo, identificaron a especies de *Geobacillus* como *Bacillus* termófilo aeróbico [93]. Otros autores reportaron a una bacteria termófila *Geobacillus* sp.70PC53 con alta actividad y estabilidad de endoglucanasa [94]. Asimismo, otras especies de este género son conocidos por su producción de celulasas [95] Por otra parte, en la identificación de hongos en el alineamiento de las secuencias de las regiones del espacio intergénico ITS1 e ITS4 se obtuvo un 99% de similitud con el género *Aspergillus*. Cabe señalar que otros autores mencionan a especies de este género como productores de

enzima celulasa de tipo endoglucanasa [69], [96] ; en cual se concuerda con este estudio.

Evaluación de la temperatura de crecimiento en hongos

El pellet o biomasa influye considerablemente tanto en la velocidad de crecimiento como en la producción de celulasas [81], además se mencionan evidencia de un incremento de la densidad celular desde las 72 horas [97]. Sin embargo, en este trabajo se obtuvieron bajas densidades celulares al cabo de las 72 horas, que puede ser debido a la alta temperatura en comparación a los autores mencionados.

Cuantificación de actividad celulolítica

La optimización de los factores de pH y temperatura óptima son de gran importancia para producción de la actividad enzimática de endoglucanasa. La cepa B12N aislado de aguas termales identificado como *Geobacillus sp.JC106*, con pH óptimo de 5,9 y temperatura a 67,5°C registraron una actividad máxima de 0,56 UI/ml y la cepa B20A identificado como *Bacillus licheniformis* registraron actividad máxima de 0,27 UI/ml, a pH 6,4 y a una temperatura 59,5°C [98]. Por el contrario, valores mayores a estos se ha reportado en este estudio, la cepa LMB-AC10 reporto 9,6 UI/ml a pH 7,4 y a una temperatura de 50°C, asimismo, se obtuvo una máxima actividad de 6,6 UI/ml con la cepa LMB-AC3 a 60°C entre el rango de pH de 7,4 y 10,4; por último, la cepa LMB-AC7 presentó una actividad máxima de 4,3 UI/ml con pH 9,4 y a una temperatura de 70°C. Sin embargo, estas cepas presentan ventajas sobre las mencionadas en relación al pH y a las diferentes temperaturas.

Por otro lado, podemos decir que la temperatura óptima donde se produce la actividad enzimática ocasiona mayor cantidad de glucosa. De ahí, podemos decir que a temperaturas inferiores o superiores a la óptima, la enzima produciría menor glucosa. Además, otros mencionan que la actividad enzimática ocurre durante la primera hora de reacción hasta dos horas y media, y que pasado ese tiempo la formación de glucosa no ocurre [92].

La demanda de esta enzima, por las industrias se debe a su importancia en la reducción de contaminantes, termoestabilidad, entre otros, siendo beneficiosa alternativa a los productos químicos, dando un enfoque favorable al medio ambiente, ya que se trata de agentes biológicos biodegradables.

VII. CONCLUSIONES

- En Aguas Calientes-Contamana se encontró en muestras de agua presencia de bacterias más no de hongos. Sin embargo, en los suelos está presente ambos tipos de microorganismos siendo en su mayoría bacterias.
- Las cepas de bacterias y hongos con mayor actividad endoglucanasa se manifestaron con mayor eficiencia a pH7,4 y a temperatura de 60°C.
- La totalidad de las cepas estudiadas son 22 bacterias y 4 hongos.
- Se determinó la temperatura óptima con mayor producción de biomasa de hongos a tres distintas temperaturas.
- Se identificó molecularmente que las cepas bacterianas pertenecen al género *Geobacillus* y *Bacillus*. En caso de los hongos, pertenecen al género *Aspergillus*.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios para determinar su actividad específica y productividad de la enzima investigando con otros sustratos.
- Seguir la continuación de la investigación de celulasas neutro alcalinas, en especial de las que mayores actividades presentaron, optimizando mejor su producción y posterior ser utilizado en la industria textil.
- Realizar estudios de identificación de especies de las cepas que posean mayor capacidad celulolítica.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. FERRER, M. (2005). Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables. *Actualidad SEM*, Vol 38:11-17.Madrid.
2. ATLAS, R. M & BARTHA, R. (1981). Biogeochemical cycling, the carbon cycle. In: *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. Addison-Wesley Publishing Company.pp.349-380.
3. LADISCH, M. R., LIN, K. W., VOLOCH, M & TSAO, G. T. (1983).Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microbial Technol*, vol 5: 82-102.
4. MARCHAL, R., REBELLER, M., FAYOLLE, F., POURQUIE, J & VANDECASTEELE, J-P. (1985). Acetone butanol fermentation of hydrolysates obtained by enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic residues. In: W. Palz, J. Coombs and D.O. Hall. *Energy From Biomass*. Third Ed. London: ELSEV APPL SCI, pp.692-696.
5. SINGH, A & HAYASHI, K. (1995) Microbial Cellulase. Protein Architecture, Molecular properties and Biosynthesis. *Adv In Appl Microbiol*, Vol 40: 1-44.
6. FAN, L .T., LEE, Y-H & BEARMORE, D. H. (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*, Vol XXII: 177-199.

7. PHILLIPS, J. A.(1985) It need not be “feedstock or food”. *Chemistry Technology*, Vol 16(6): 377-384.
8. GUTIERREZ-CORREA, M. (1986). Producción de etanol y proteína. En: I Simposium Nacional de Biotecnología. CONCYTEC. Lima. pp.45.
9. LEHNINGER, A. L. (1987). Bioquímica. Ediciones Omega, S.A. 2da edición. Barcelona.
10. HAN, Y.W & CALLIHAN, C. D. (1974).Cellulose Fermentation: Effect of substrate pretreatment on microbial growth. *Appl Microbiol*, Vol 27(1) :159-165.
11. CRAWFORD, D. L & MCCOY, E. (1972). Cellulases of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermodiastaticus*. *Appl. Microbiol*, Vol 24(1): 150-152.
12. STUTZENBERGER, F. J. (1972). Cellulolytic activity of *Thermonospora curvata*: nutritional requirements for cellulose production. *Applied Microbiology*, Vol 24(1): 77-82.
13. OKEKE, B. C & PATERSON, A. (1992). Simultaneous production and induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes in a *Streptomyces sp.* *World J Microb Biotech*, Vol 8: 483-487.
14. CERONI, A Y GUTIERREZ-CORREA, M. (1988). Producción de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres. Boletín de Lima. *Rev Cult Cient* . Vol 55 (10) : 13-20.

15. CASTELLANOS, P., LANCHO, A., RENGIFO, M y VILCHES, L. (1999). Biosíntesis de celulasa: Aislamiento de cepas celulolíticas. En: VIII Reunión Científica del ICBAR. UMSM.Lima. p.67.
16. MURASHIMA, K., KOSUGI, A y DOI, R.H. (2002). Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *J Bacteriol*, Vol 184 (18): 5088-5095.
17. LYND, L.R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W.H. y PRETORIUS, I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*. Vol 66 (3): 506-577.
18. SATYANARAYANA, T., RAGHUKUMAR, C & SHIVAJI, S. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Curr Sci India*. Vol 89 (1): 78 – 90.
19. VAN DEN BURG, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol*. Vol 6: 213 – 218.
20. HERNANDEZ, S. A., GARCIA, H. E Y RODRIGUEZ, R. A. (1999). Celulosomas: sistemas multienzimáticos. *J Mex Chem Soc*, Vol 43 (3, 4): 137-142.
21. KARAPINAR, E & SARIISIK, M. O.(2004). Scouring of cotton with cellulases, pectinases and proteases. *Fibres Text in East Eur*, Vol 12(3): 79–82.
22. ANISH, R., RAHMAN, M. S., & RAO, M. (2007). Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. In: Biopolishing of Denims. *Biotechnol Bioeng*, Vol 96(1): 48–56.
23. ARAUJO, R., CASAL, M., & CAVACO-PAULO, A. (2008). Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatal Biotransfor*, Vol 26(5): 332–349.

24. FUJINAMI, S & FUJISAWA, M. (2010). Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes-past, present and future. *Environ Technol*, Vol 31(8-9): 845–856.
25. ITO, S. (1997). Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: enzymatic properties, genetics and application to detergents. *Extremophiles*, Vol 1: 61–66.
26. OVANDO-CHACON, SL & WALISZEWSKI, KN. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Univ Cienc* , Vol 21(42): 111-120.
27. MORAL, V. S. T., OLVERA, C. C., SACHMAN, R. B., VINUESA, P., MONTOR, A. J.J. (2011). Aislamiento, caracterización e identificación de cepas bacterianas productoras de amilasas y celulasas de suelos de alto rendimiento de la Cuenca del Papaloapan. En: XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
28. MAHESHWARI, R., BHARADWAJ, G & BHAT, M. K. (2000) .Thermophilic Fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev* ,Vol 64(3): 461–488.
29. GONZÁLEZ, J. M.; (2010) Enzimas. En: Curso de Macromoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad del País Vasco. Barrio Sarriena. España.p.1-11 (http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb_old/pdf/11_enzimas.pdf)

30. GRAMINHA, E. B. N., GONÇALVES, A. Z. L., PIROTA, R. D. P. B., BALSALOBRE, M. A. A., DA-SILVA, R & GÓMEZ, E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Anim Feed Sci Technol*, Vol 144 (1-2): 1-22.
31. NIDETZKY, B., STEINER, W., HAYN, M & CLAEYSSSENS, M. (1994). Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem J*, Vol 3: 705-710.
32. GONZALEZ, G. E. (2004). Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas in vitro. [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona.
33. SÁNCHEZ, R. J., MARTÍNEZ-H, J. L., SEGURA, C. E. P., CONTRERAS, E. J. C., MEDINA, M. M. A., AGUILAR, C. N y ILINA, A. (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Quim Nova*, Vol 37(3): 504-512.
34. PERCIVAL, Z. Y-H., HIMMEL, M. E., MIELENZ, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*, Vol 24: 452-481.
35. CAI, YI. J., CHAPMAN, S.J., BUSWELL, J.A & CHANG, S-T. (1999). Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Appl Environ Microbiol*, Vol 65(2): 553-559.

36. BHAT, MK & BHAT S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol Adv*, Vol 15 (3-4): 583-620.
37. GOEDEGEBUUR, F., FOWLER, T., PHILLIPS, J., VAN DER KLEY, P., VAN SOLINGEN, P., DANKMEYER, L et al. (2002) .Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. *Curr Genet* , Vol 41, 89-98.
38. BALDRIAN, P & VALASKOVA, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev*, Vol 32: 501-521.
39. LYND, L., VAN ZYL, W., MACBRIDE, J & LASER, M. (2005).Consolidated bioprocessing of cellulosic on cellulosic biomass: an update. *Curr opin Biotech*, Vol 16: 577-583.
40. MALHERBE, S & CLOETE, T. E. (2002). Lignocellulose Biodegradation: Fundamentals and applications. *Rev Env Sci Biotechnol*, Vol 1: 105-114.
41. TEATHER, R. M & WOOD, P. J. (1982). Use of Congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol*, Vol 43 (4): 777–780.
42. HENDRICKS, C., DOYLE, J., HUGLEY, B. (1995). A New Solid Medium for Enumerating Cellulose-Utilizing Bacteria in Soil. *Appl Environ Microbiol*, Vol 61(5): 2016–2019.
43. TEN, L., IM, W-T., KIM, M-K., KANG, M.S & LEE, S-T. (2004). Development of a plate technique for screening of Polysaccharide-degrading microorganisms

- by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. *J Microbiol Meth.* Vol 56: 375-382.
44. PERCIVAL, Z. Y.-H & LYND, L.R.A. (2006). A Functionally Based Model for Hydrolysis of Cellulose by Fungal Cellulase. *Biotechnol Bioeng*, Vol 94(5): 888-989.
45. MILLER, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* , Vol 31 (3): 426-428.
46. CARRERA, J.E. (2003). Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Vol 1 (1): 1-7.
47. CARLILE, M.J., WATKINSON, S.C & GOODAY, G.W. (2001). The fungi .Second edition. Edition. London: Academic Press. England.
48. RAMÍREZ, P Y COHA, J. M. (2003). Degradación de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Rev Perú Biol*, Vol 10(1): 67-77. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM, versión Online ISSN 1727-9933.
49. MEHTA, D., SATYANARAYANA, T. (2013). Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes. In: Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles ed. Satyanarayana, T., Littlechild, J. and Kawarabayasi, Y. Second edition India.pp.1-60. Dordrecht: Springer.

50. BHALLA, A., BANSAL, N., KUMAR, S., BISCHOFF, K. M., SANI, R. K. (2013). Improved lignocelluloses conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technol*, Vol 128: 751–759.
51. BROCK, T.D. (1997). Microbiology in Yellowstone at first focused on the basic science and ecology but gradually has expanded in scope. *ASM News*, Vol 64 (3): 137-140.
52. AMANN, R. I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, Vol 59(1): 143-69.
53. FLINT, S.H., WARD, L.J.H., WALKER, K.M.R. (2001). Functional grouping of thermophilic *Bacillus* strain using amplification profiles of the 16S-23S internal spacer region. *System Appl Microbiol*, Vol 24: 539-548.
54. RONIMUS, R.S., PARKER, L.E., TURNER, N., POUDEL, S., RUCKERT, A & MORGAN, H. W. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *Int J of Food Microbiol*, Vol 85: 45-61.
55. DELCHER, A. L., HARMON, D., KASIF, S., WHITE, O & SALZBERG, S.L. (1999). Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res*, Vol 27 (23): 4636–4641.
56. BALASUBRAMANIAN, N., TOUBARRO, D., TEIXEIRA, M & SIMÕES NELSON. (2012). Purification and Biochemical Characterization of a Novel Thermostable CarboxymethylCellulase from Azorean Isolate *Bacillus mycoides*S122C. *Appl Biochem Biotechnol* , Vol 168: 2191–2204.

57. ZEIGLER, D. R. (2014). The *Geobacillus* paradox: Why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?. *Rev Microbiol*, Vol 160: 1-11.
58. GUPTA, R., GUPTA, N & RATHI, P. (2004). Bacterial lipase: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol 64: 763-781.
59. POSADA, Y., PACHON, L., AGUDELO, A., ALVAREZ, E., DIAZ, C., FARDEAU, M .L., et al. (2004). Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias aminolíticas de un manantial termomineral de Paipa. Boyacá. *Rev Colomb Biotecnol*, Vol VI (2): 90-100.
60. ALEXANDER, M. (1980) Introducción a la microbiología del suelo. Segunda edición. Editorial AGT S.A. México D.F. pp. 162-177.
61. BELLAMY, W. D. (1977). Cellulose and lignocelluloses digestion by thermophilic Actinomycetes for single cell protein production *Dev. Indust. Microbiol*, Vol 18: 249-254.
62. ROSENBERG, S. L. (1975). Temperature and pH for 21 species of thermophilic and thermo tolerant fungi. *Canadian J of Microbiol*, Vol 21: 1535- 1540.
63. PERETO, (2010); Citado por: APOLINAR, E. M. I. Aislamiento y purificación de bacterias de aguamiel con capacidad de producción de la enzima celulasa. [Tesis para obtener el grado de bachiller] En ciencia y tecnología de alimentos, México, 2014.

64. COONEY, DG & EMERSON, R. (1964). Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. WH Freeman and Co. San Francisco and Londres.
65. SHEPHERD, M.G., TONG, C.C & COLE, A.L. (1981). Substrate specificity and mode of action of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem.J.* Vol 193: 67-74.
66. KHANDKE, K. M., VITHAYATHIL, P.J & MURTHY, S.K. (1989). Purification of Xylanase, B-Glucosidase, Endocellulase, and Exocellulase from a Thermophilic Fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Arch Biochem Biophys*, Vol 274(2): 491-500.
67. LO, LEGGIO. L & LARSEN, S. (2002). The 1.62 Å structure of *Thermoascus aurantiacus* endoglucanase: completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5. FEBS Published by Elsevier Science Letters Vol 523: 103-108.
68. WHITAKER, R.J., GROGAN, DW & TAYLOS, JW. (1994). Geographic barriers isolate endemic population of hyperthermophilic Archaea. *Science*, Vol 2003 (301): 976-978.
69. VEGA K., VILLENA, G. K., SARMIENTO, V. H., LUDEÑA, Y., VERA, N & GUTIÉRREZ-CORREA, M. (2012). Production of Alkaline Cellulase by Fungi Isolated from an Undisturbed Rain Forest of Peru. *Biotechnol Research Int.* Article ID 934325, 7 pages, doi:10.1155/2012/934325.

70. MIKÁN, VENEGAS. J. F Y CASTELLANOS, SUAREZ. D. E (2004). Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Rev. Colomb Biotecnol*, Vol VI (1): 58-71.
71. KIRK, OLE., TORBEN VEDEL BORCHERT & CLAUS CRONE FUGLSANG.(2002). Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotech*, Vol 13 (4): 345-351.
72. SHIRAI, T., ISHIDA, H., NODA, J., YAMANE, T., OZAKI, K., HAKAMADA, Y& ITO, S. (2001). Cristal Structure of Alkaline Cellulase K: Insight into the Alkaline Adaption of an Industrial Enzyme. *J Mol Biol*, Vol 310: 1079-1087.
73. PENNISI, E. (1997). In Industry, Extremophiles Begin to Make their Mark. *Science*, Vol 276:705-706.
74. GALANTE, Y.M., FORMANTICI, C. (2003). Enzyme Application in Detergency and in manufacturing industries. *Curr Org Chem*, Vol 7: 1399-1422.
75. DUTTA, T., R. SAHOO, R., SENGUPTA, S.R., SOUGATA, A., BHATTACHARJEE, & S, GHOSH. (2008). Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. *J of Indus Microbiol Biotechnol*, Vol 35: 275-282.
76. SUN, Y & CHENG, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, Vol 83: 1-11.
77. DULBECCO., DAVIS., EISEN & GINSBERG. (1990). Microbiology. Fourth Edition. J. B. Lippincott Company.

78. MAGNELLI, P. E., MARTINEZ, A Y MERCURI, O. A. (1997). Método simple para determinar actividad celulolítica en hongos. *Rev Argent Microbiol*, Vol 29:210-214.
79. MEZA, V., MORENO, P., TENDERDY, R.P. & GUTIERREZ-CORREA, M. (1995). Transfer of a benomyl resistance marker by heat-inactivated *Trichoderma reesei* protoplasts. *Biotechnology Letters*, Vol 17 (8): 827-832.
80. SAMBROOK, J & RUSSELL, D. (2001). Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3^{er} edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York: Press.pp.5.8, 5.76.
81. IZARRA, M. L., SANTAYANA, M. L., VILLENA, G. K. & GUTIÉRREZ-CORREA, M. (2010). Influencia de la concentración de inóculo en la morfología para la producción de celulasa y xilanasas por *Aspergillus niger*. *Rev Colomb Biotecnol*, Vol 12(2): 139-150.
82. MOLLER, E.M, BAHNWEG, G., SANDERMANN, H & GEIGER, H.H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, Vol 20 (22): 6115-6116.
83. WHITE, TJ., BRUNS, T., LEE, S., et al. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, Shinsky TJ, White TJ, eds). Academic Press Inc, New York. pp.315–322.
84. REYSENBACH, A-L., LONGNECKER, K., KIRSHTEIN, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-

- Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol*, Vol 66 (9): 3798–3806.
85. THOMPSON, JD., HIGGINS, DG., GIBSON, TJ. (1994). Clustal W— improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, Vol 22:4673–4680.
86. TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M & KUMAR, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis. (MEGA) Software versión 4.0 *Mol Biol Evol*. Vol 24(8): 1596-1599.
87. KING, B. C., DONNELLY, M. K., BERGSTROM, G. C., WALKER, L. P., GIBSON, D. M. (2009). An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnol Bioeng* Vol 102: 1033-1044.
88. NAKANDAKARI, J. (1988). Aislamiento, selección y estudios preliminares de hongos secretores de celulasas. [Tesis para optar el grado de Bachiller en Biología]. Lima, UPCH.
89. ABRHA, B & GASHE, B.A. (1992). Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. *World J. Microbiol. Biotech.* Vol 8: 164-166.
90. SRINIVASULU, M., RANGASWAMY, V. (2006). Activities of invertase and cellulase as influenced by the application of tridemorph and captan to groundnut (*Arachishypogaea*) soil. *Afr. J. Biotechnol.* Vol 5(2): 175-180.

91. DE LA ROSA JORGE, M., DEL CARMEN Y MOSSO., ROMEO, M.A. (2000). Libro: Panorama actual de las aguas minerales y minero medicinales en España. Instituto tecnológico geominero de España. p. 153.
92. PAREDES, MEDINA .D., ALVAREZ, NUÑEZ. M., SILVA, ORDOÑES.M. (2010). Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de Banano. *Revista tecnológica ESPOL-RTE*, Vol 23 (1): 81-88.
93. T.N.NAZINA, T.P.TOUROVA, A.B. POLTARAUS, E.V. NOVIKOVA, A.A. GRIGORYAN, A.E. IVANOVA, A.M.LYSENKO et al. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli, descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. Nov., so. Nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. Nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to geobacillus as the new combinations *G.stearothermophilus*, *G.thermocatenulatus*, *G.thermoleovorans*, *G.kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Inter J of System Evolution Microbiol*, Vol 51: 433-446, printed in Great Britain.
94. NG, I SON., LI, C. W ., YEH, Y. F., CHEN , P. T., CHIR, J. L., MA, C.H., YU, S.M., HO, T.D & TONG, C.G. (2009). A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. 70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures. *Extremophiles*, Vol 13: 425-435.

95. ASSAREH, R., ZAHIRI, H. S., NOGHABI, K.A., AMINZADEH, S & KLANIKI, G. B. (2012). Characterization of the newly isolated *Geobacillus sp.T1*, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresource Technol* , Vol 120: 99-105.
96. VILLENA, G. K & GUTIÉRREZ-CORREA, M. (2012). Kinetic analysis of *Aspergillus niger* cellulase and xylanase production in biofilm and submerged fermentation. *J of Microbiol Biotechnol Res*, Vol 2: 805-814.
97. VILLENA, G.K & GUTIÉRREZ-CORREA, M. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Rev Peruana Biol*, Vol 10(1): 78-87.
98. ZAPATA, H & CASTELLANOS, R.(2014) .Aislamiento e identificación de bacterias celulolíticas termófilas de geiseres naturales de Candarave-Tacna. *Ciencia & Desarrollo*. (Tacna) ISSN 2304-8891, Vol 18:29-36.

X. ANEXOS

ANEXO 01: Sitios de muestreo del Circuito turístico Aguas Calientes

Calientes

TIPO DE MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO	NORTE UTM	ESTE UTM	ALTITUD (msnm)	pH	T° C
AGUA	AC-1	9204332	505203	221	6,32	>60
	AC-2	9204358	505135	230	6,31	50
	AC-3	9204386	505161	248	7	<60
	AC-4	9204270	505239	199	6,02	<60
SEDIMENTO	SD-4	9204270	505239	230	8,5	47,6
SUELO	S-1	9204344	505185	202	5,5	28
	S-2	9204406	504984	234	5,7	28,9
	S-3	9204370	505028	253	6,01	27,2
	S-4	9204377	505036	259	5,8	28,3

Cuadro 16: Los datos recolectados in situ de las muestras con sus respectivas coordenadas, pH y temperatura.

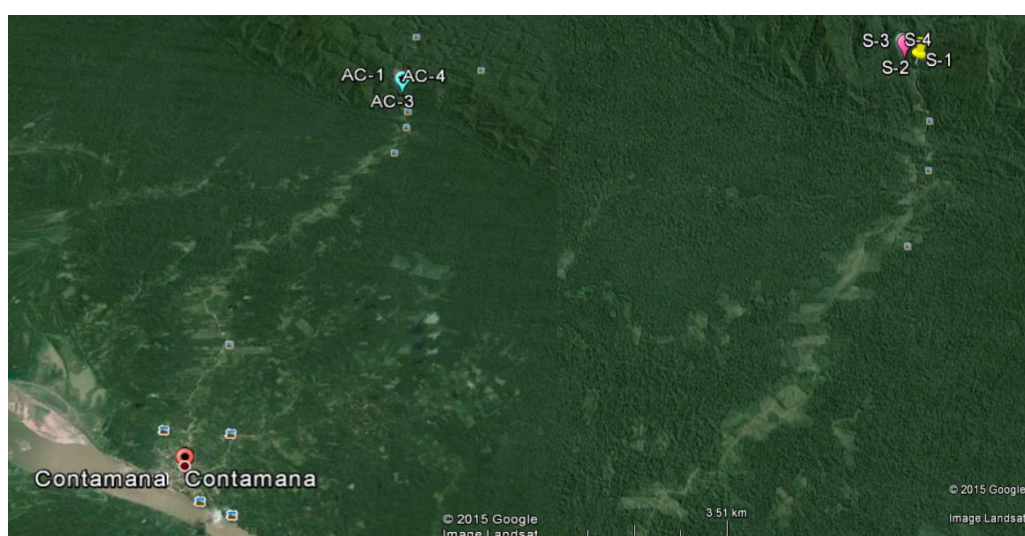


Figura 39: Ubicación geográfica de los puntos muestreados en Aguas Calientes con Google Earth.



Figura 40: (a) Suelo de Contamana, (b) colecta de suelo.



Figura 41: (a) Agua termal correspondiente al punto de muestreo (AC1), (b) toma de temperatura y pH, (c) colecta de agua.

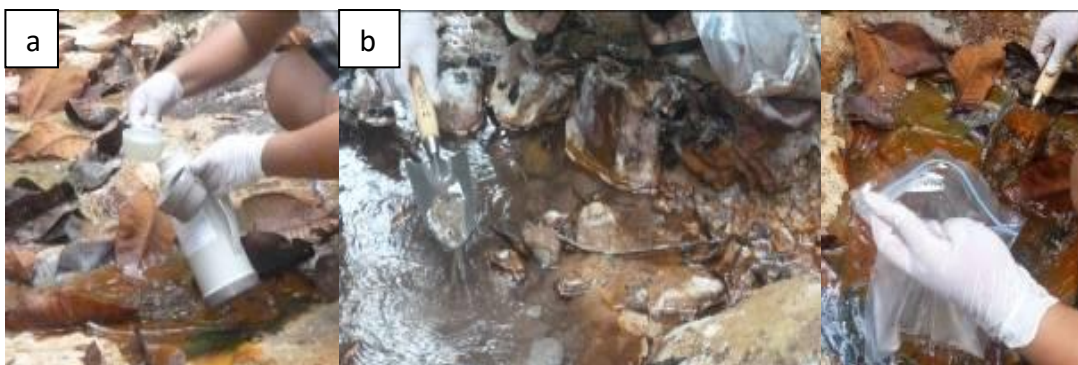


Figura 42: (a) Agua termal correspondiente al punto de muestreo (AC3), (b) colecta de sedimento.

ANEXO 02: Fotografías de halos de hidrólisis

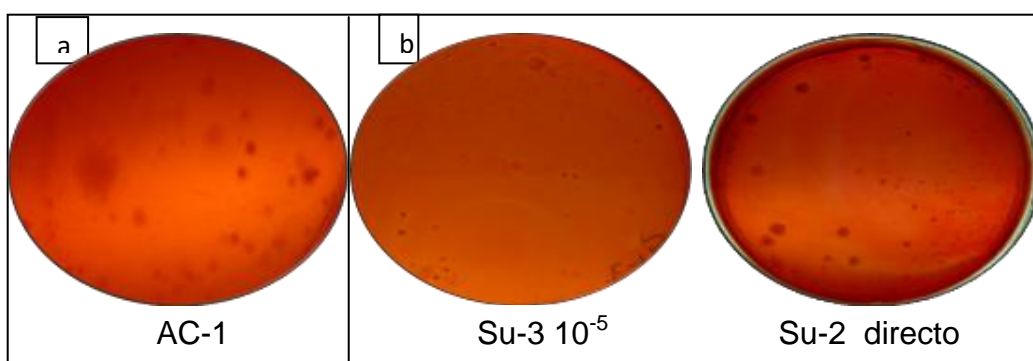


Figura 43: (a) Fotografía del aislamiento primario de muestra de agua (AC1);

(b) Fotografías del aislamiento primario de muestras de suelos.



Figura 44: Placas de vidrio a diferentes pH (7,4; 8,4; 9,4 y 10,4 respectivamente).

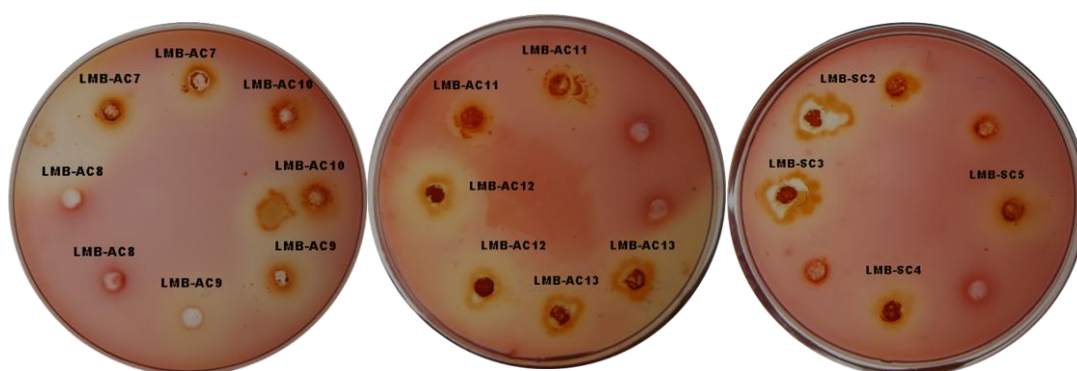


Figura 45: Algunas fotografías de las cepas bacterianas con Rojo Congo al 0,1%, se observa los halos de hidrólisis con CMC al 1%.

ANEXO 03: Tinción Gram, Tinción Dörner y observación en fresco

Solución	Tiempo de aplicación	Bacterias Gram positivas	Bacterias Gram negativas
Colorante: cristal violeta	1 min	violeta	violeta
Mordiente: lugol	1 min	Azul-violeta	Azul-violeta
Decolorante: alcohol-acetona	5 lavados	Azul-violeta	incolora
Colorante de contraste: safranina	30 segundos	Azul-violeta	rosada

Cuadro 17: Procedimiento de tinción Gram (diferencia dos grandes grupo)

Técnica de Dörner

Es una técnica de tinción de esporas que se usa carbofucsina y tinta china. Las esporas se verán de color rojo, el resto de la bacteria incolora, sobre un fondo negro. El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Limpiar adecuadamente los portaobjetos en los cuales se realizarán los extendidos.
2. Preparar una suspensión del cultivo a examinar en 1 ml de agua destilada.
3. Añadir 1 ml de carbol fucsina.
4. Colocar en baño maría hirviendo durante 10 minutos.
5. Colocar una asada de la suspensión sobre el portaobjetos.
6. Colocar una asada de tinta china. Mezclar y extender.
7. Dejar secar el extendido al aire.

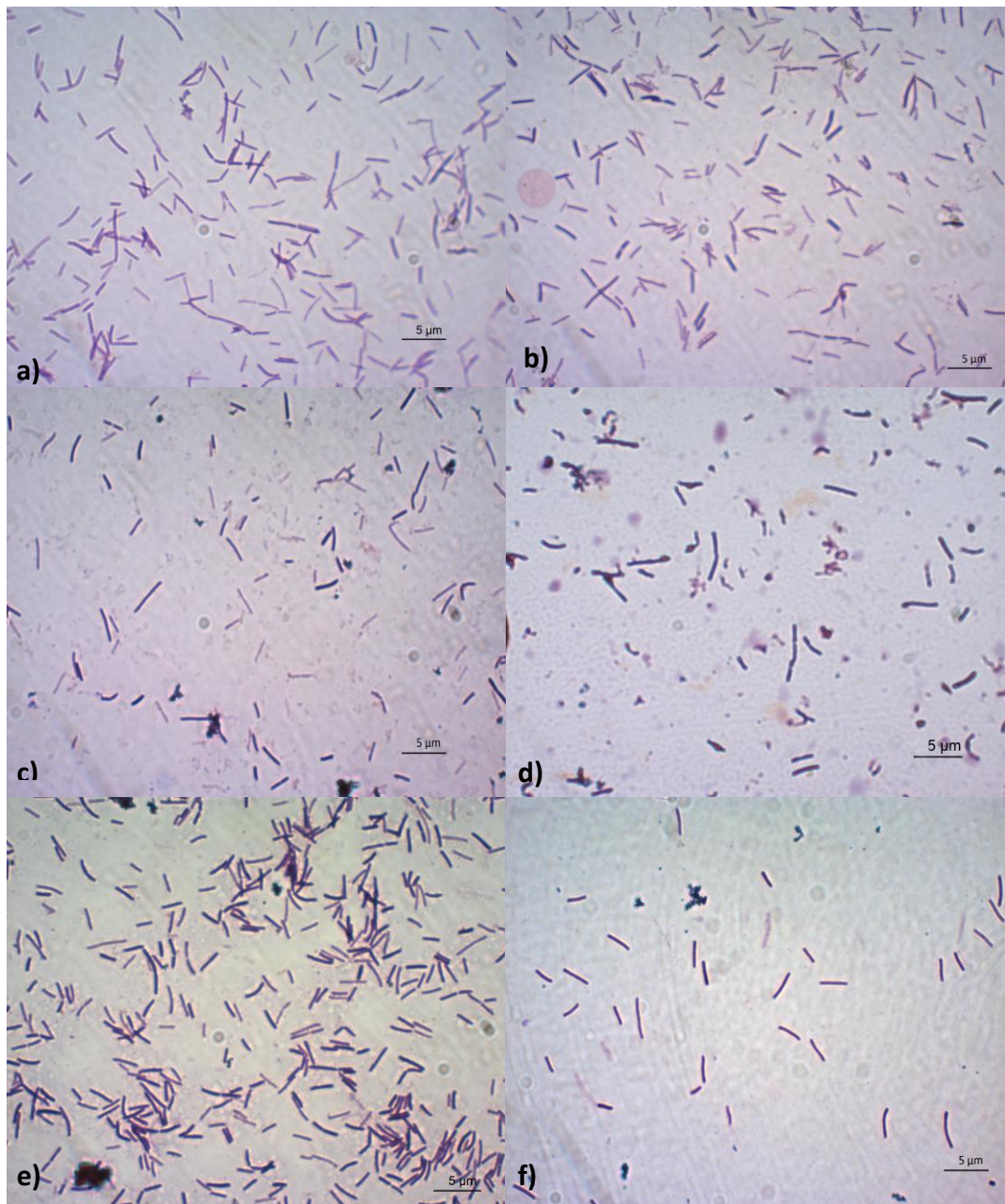


Figura 46: Observación microscópica en microfotografía en luz blanca a 1000X y coloración Gram de cepas de muestras de agua: a) LMB-AC1, b) LMB-AC2, c) LMB-AC3, d) LMB-AC6, e) LMB-AC7 y f) LMB-AC10.

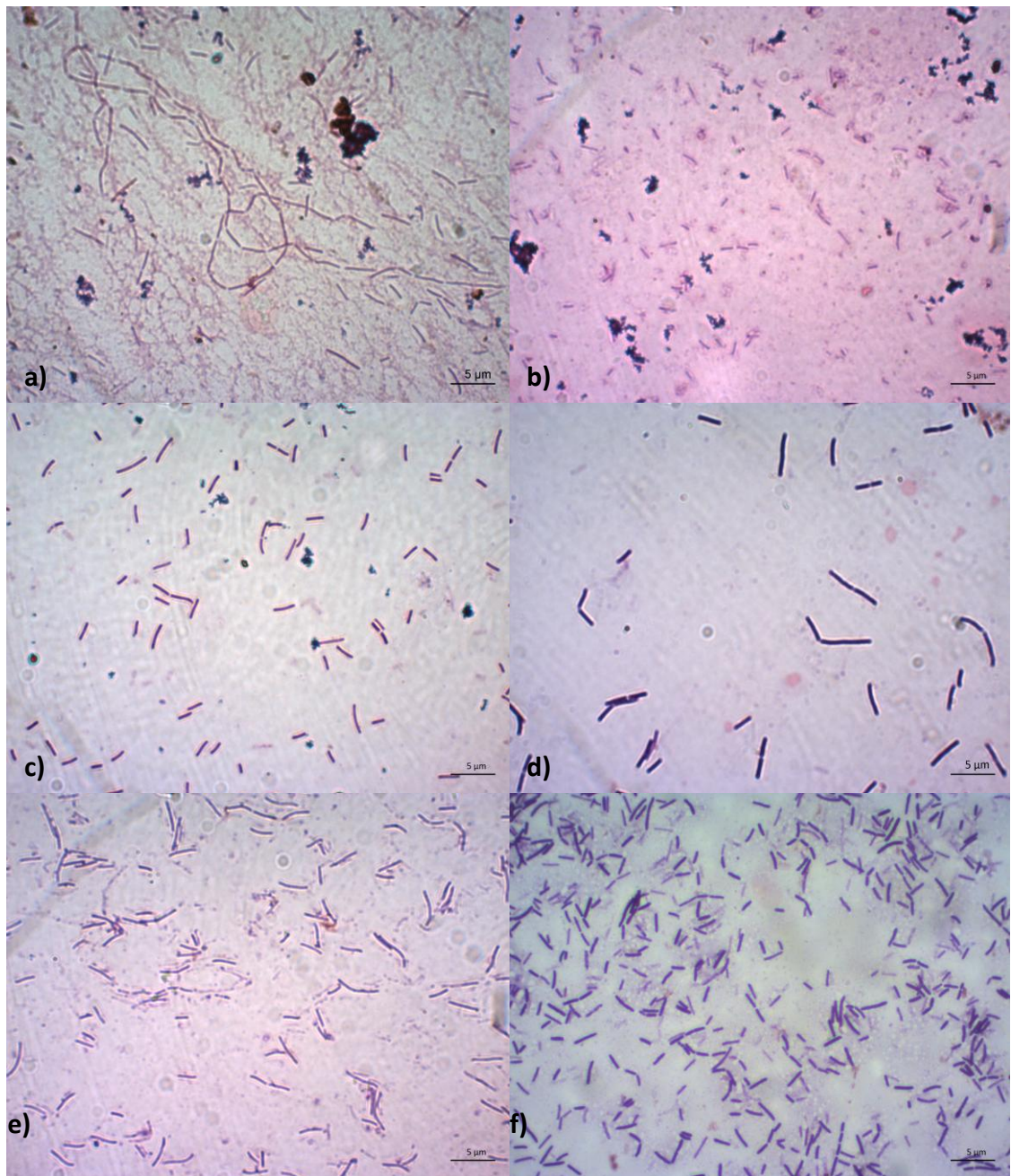


Figura 47: Observación microscópica en microfotografía en luz blanca a 1000X y coloración Gram de cepas de muestras de suelo: a) LMB-SC2, b) LMB-SC3, c) LMB-SC4, d) LMB-SC5, e) LMB-SC8 y f) LMB-SC10.

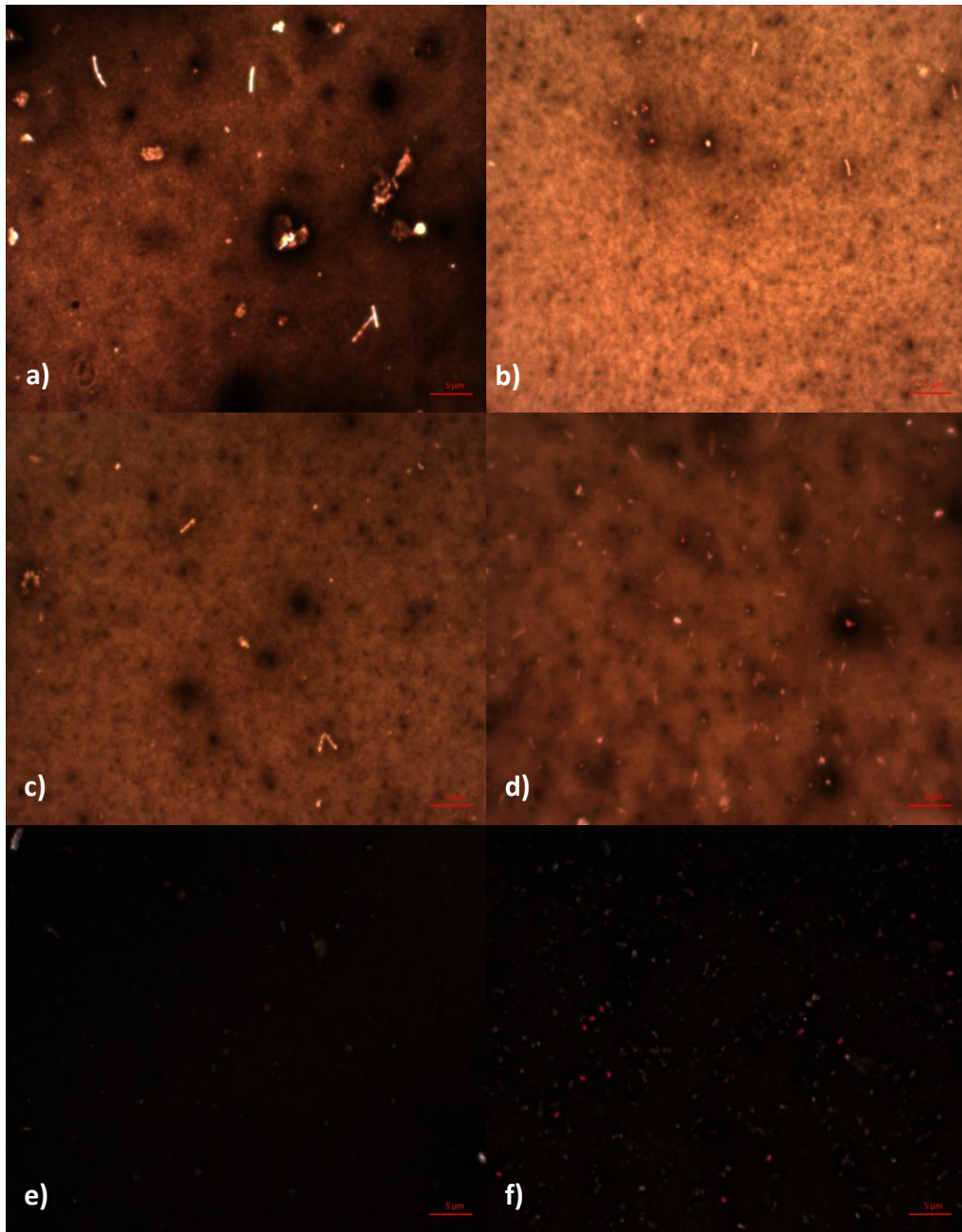


Figura 48: Observación microscópica en microfotografía de tinción de esporas por la técnica de Dörner en luz blanca a 1000X de cepas aisladas de muestras de agua: a) LMB-AC1, b) LMB-AC2, c) LMB-AC3, d) LMB-AC6, e) LMB-AC7, f) LMB-AC10.

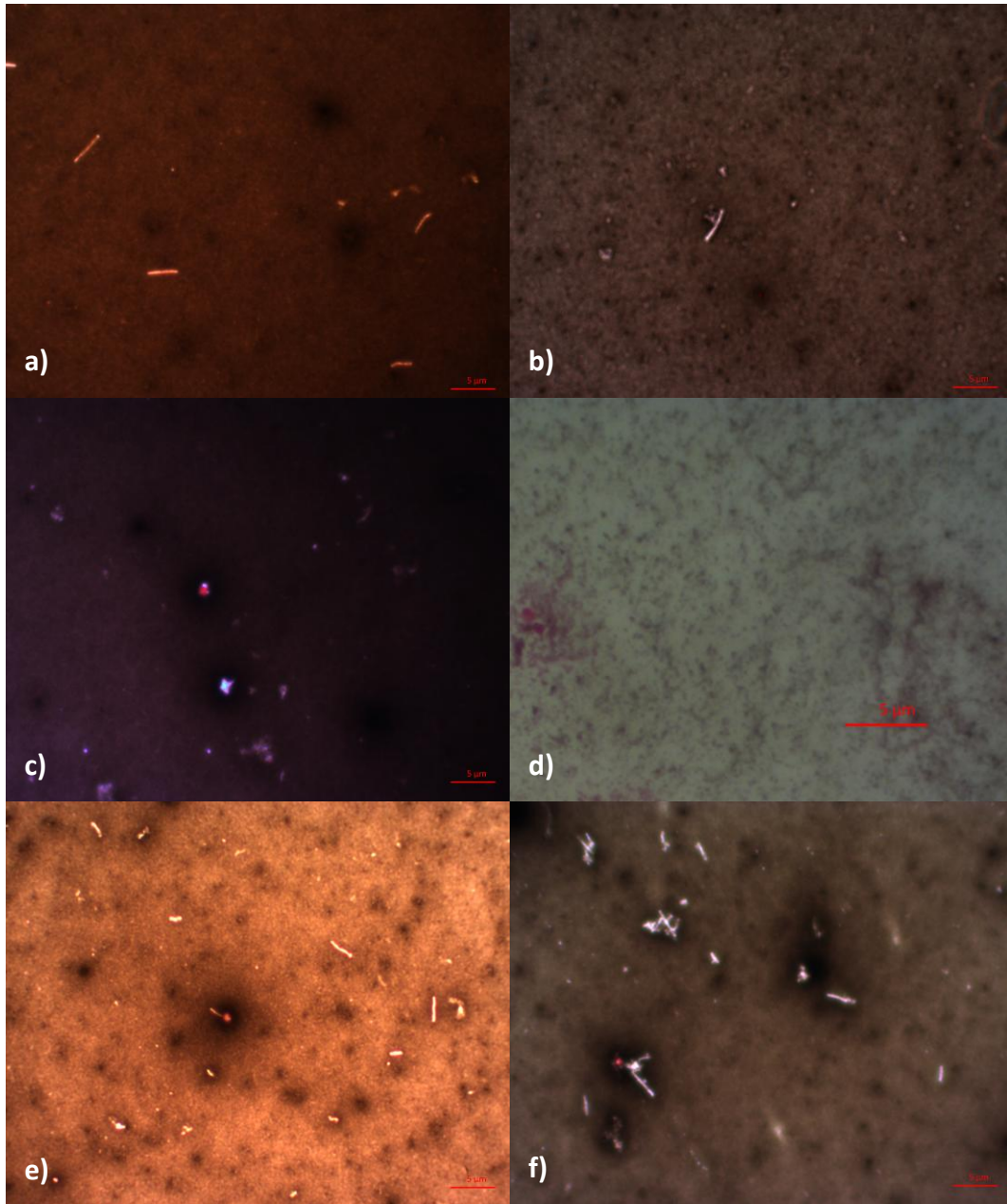


Figura 49: Observación microscópica de tinción de esporas por la técnica de Dörner en microfotografía en luz blanca a 1000X de cepas aisladas de suelo: a) LMB-SC2, b) LMB-SC3, c) LMB-SC4, d) LMB-SC5, e) LMB-SC8, f) LMB-SC10.

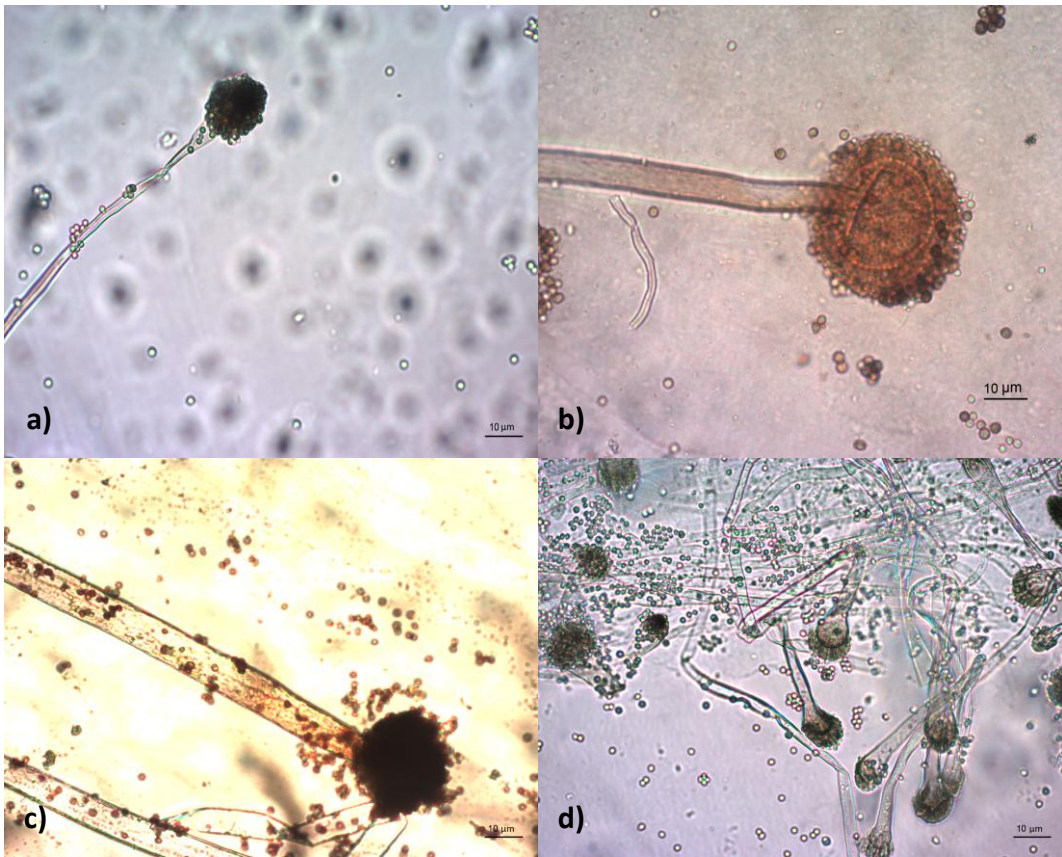


Figura 50: Observación microscópica en microfotografía en luz blanca a 400X de cepas fúngicas de muestras de suelo: a) LMB-HAC7, b) LMB-HAC8, c) LMB-HAC9, d) LMB-HAC10.

ANEXO 04: Gráficas de las secuencias del termociclador

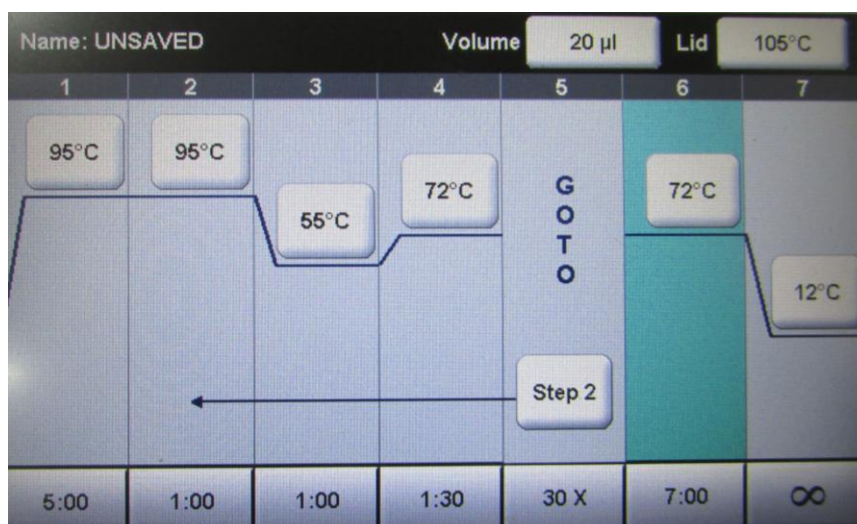


Figura 51: Gráfica de la secuencia empleada en el termociclador de ADN bacterianas.

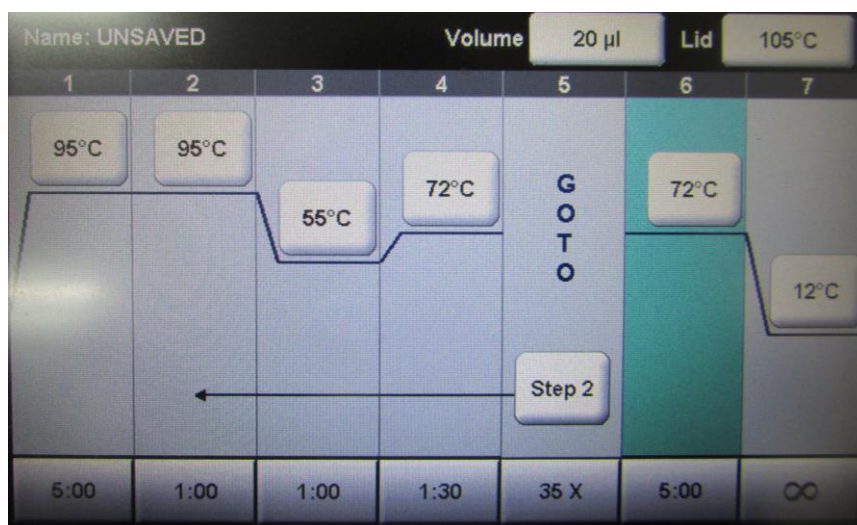


Figura 52: Gráfica de las secuencias empleadas en el termociclador de ADN fúngicas.

ANEXO 05: Cromatograma procesado de Macrogen

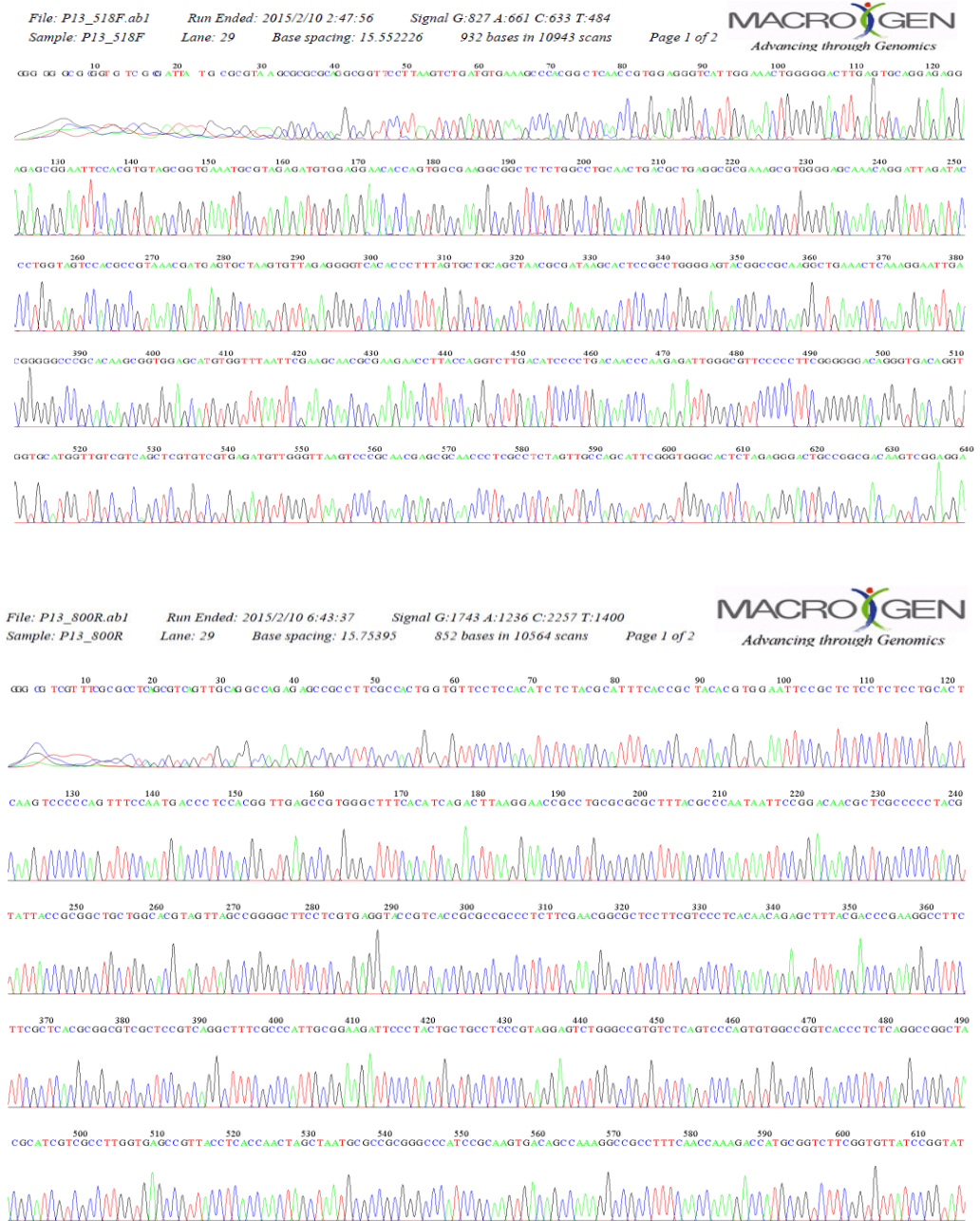


Figura 53: Los cromatogramas 518F y 800R procesados de la empresa Macrogen.

La secuencia pertenece a la cepa bacteriana LMB-AC1

ANEXO 06: Biomasa obtenida de hongos

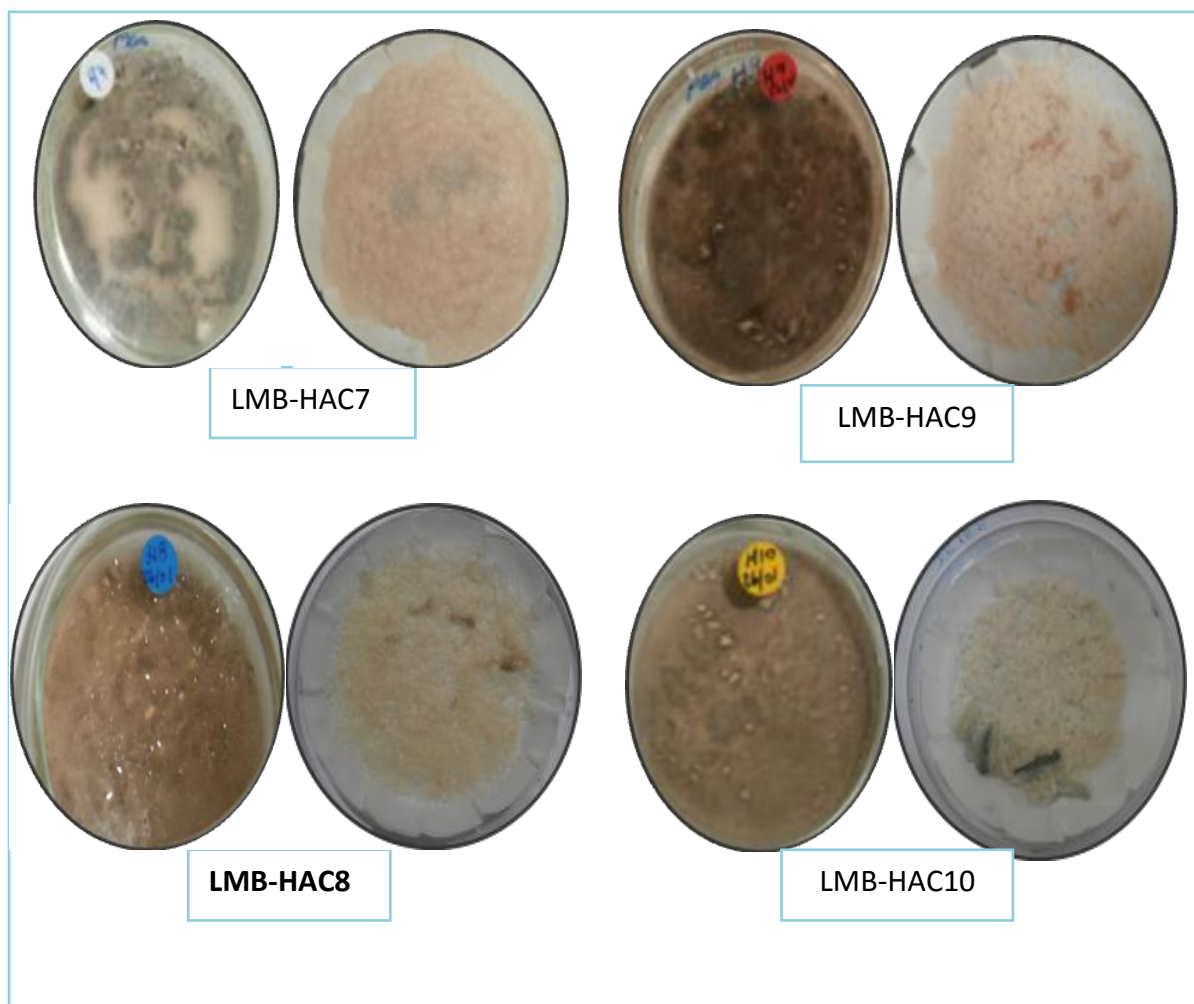


Figura 54: Cepas de hongos en placas de PDA y su respectiva biomasa en papel filtro de peso seco: LMB-HAC7, LMB-HAC8, LMB-HAC9 y LMB-HAC10.

ANEXO 07: Microplaca y curva usados en el método (DNS)

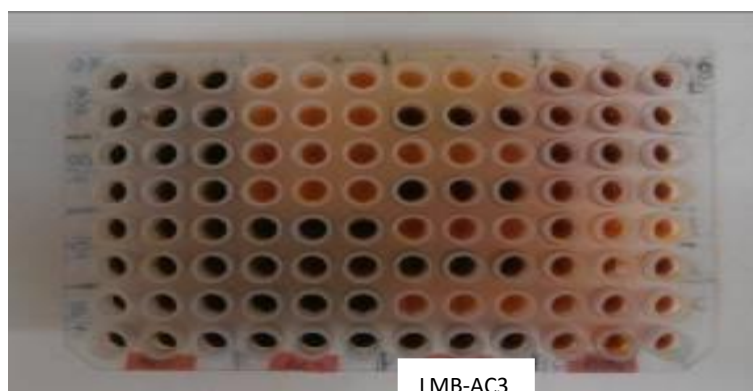


Figura 55: Reacción de la actividad con el reactivo DNS en la microplaca de PCR de 96 pozos. La mejor cepa es LMB-AC3.

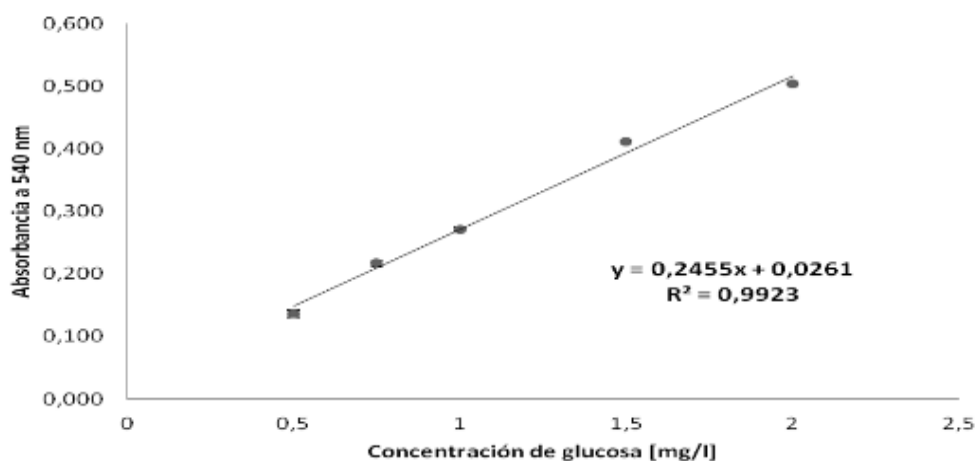


Figura 56: Curva estándar de glucosa, elaborada con el método de DNS para microplacas (King et al [87]). Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones \pm DS. Donde: Y, representa el valor de absorbancia, corregido por el blanco y determinado espectrofotométricamente a la longitud de onda de 540 nm, X el valor de la concentración de glucosa y R^2 el valor de coeficiente de correlación.

ANEXO 08: Preparación de reactivos y soluciones

1) Tinción Gram

- a. Safranina: Disolver 0,5 g de safranina en 100 ml de agua destilada.
- b. Reactivo de Hucker:
 - Solución A: Disolver 2 g de cristal violeta en 20 ml de etanol 95%.
 - Solución B: Disolver 0,8 g oxalato de amonio en 80 ml de agua destilada. Dejar en reposo por la noche o calentar ligeramente para disolver. Combinar las soluciones A y B y filtrar.
- c. Lugol: Combinar 1 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio en un mortero. Lavar la mezcla con un poco de agua destilada. Aforar con agua destilada a un volumen final de 300 ml. Agitar fuertemente para disolver. Guardar en frasco ambar con tapa de vidrio.
- d. Alcohol acetona: Mezclar 500 ml de alcohol 95% con 300 ml de acetona.

2) Amortiguador de lisis

- a. Tris-Acetato pH 7,8: disolver 60,57 g de Tris en agua destilada. Ajustar el pH a 7,8 con ácido acético glacial.
- b. Las concentraciones finales del amortiguador de lisis son 40 mM Tris-Acetato pH 7,8; 20 mM acetato de sodio, 1,0 mM EDTA y 1% SDS.

3) Tampón TES (Tris, EDTA, SDS)

Las concentraciones finales de los ingredientes del tampón TES son: 10 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA y 2% SDS.

4) Tampón TAE

- a. Solución stock (50X): Mezclar 242 g de base Tris con 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8.
- b. Solución de trabajo (1X): diluir la solución stock 1:50.

5) Cloruro de sodio 5 M (NaCl)

- Disolver 13,149 g de cloruro de sodio en 45 ml de agua destilada.

6) Buffer fosfato (PBS) 0,05M pH 7,4 ; solución Stock

- a. Solución A: Fosfato de sodio monobásico 0,2 M (w=138): Disolver 27,6 g en 1000 ml de agua destilada.
- b. Solución B: Fosfato de sodio dibásico 0,2 M: Disolver 28,39 g de fosfato de sodio dibásico (w=141,96) en 1000 ml de agua.
- c. Combinar 19 ml de la solución A con 81 ml de la solución B, y aforar a 200 ml con agua destilada.

7) Tampón ácido bórico-borax 0,05M pH 8,4; solución stock.

- a. Solución A: Ácido bórico 0,2 M. Disolver 12,36 g ácido bórico en 1000 ml de agua destilada.

- b. Solución B: bórax 0,05 M. Disolver 19,069 g de borax en 1000 ml de agua destilada.
- c. Combinar 50 ml de solución A con 11,5 ml de la solución B y aforar a 200 ml con agua destilada.

8) Tampón Glicina-NaOH 0,05M(pH 9,4 y 10,4), solución stock

- a. Solución A: Disolver 15,01 g de glicina 0,2M en 1000 ml de agua destilada.
- b. Solución B: Disolver 8 g de hidróxido de sodio 0,2M en 1000 ml de agua destilada.
- c. Soluciones finales:
 - pH 9,4: Combinar 50 ml de la solución A con 16,8 ml de la solución B y aforar con agua destilada a volumen final de 200 ml.
 - pH 10,4: Combinar 50 ml de la solución A con 38,6 ml de la solución B y aforar con agua destilada a volumen final de 200 ml.

9) Solución de RNAsa

Preparar una solución con 10 mM Tris-Cl pH 7,8 y 15 mM NaCl. Calentar a 80°C por 10 minutos y dejar enfriar. Añadir RNAsa a 10 µg/ml. Guardar a -20°C.

10) Reactivo de Miller: Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS):

Primero, mezclar 10,16 g ácido 3,5-dinitrosalicílico; 19,8 g hidróxido de sodio en 1416 ml de agua destilada.

Una vez disuelto la mezcla, a esta solución añadir 306 g tartrato de sodio y potasio; 7,6 ml de fenol (disuelto a 50°C) y 8,3 g metabisulfito de sodio.

ANEXO 09: Cálculos para la conversión a unidades enzimáticas

Para calcular la concentración de los azúcares reductores producidos, se debe calcular la absorbancia neta (Abs N).

Primeramente, las absorbancias de blanco muestra, muestra y blanco sustrato deben ser convertidos a concentraciones con la fórmula de la curva de glucosa.

En la figura 58 (anexo 07) se encuentra la gráfica de la curva con los siguientes valores: $y=0,2455x+0,0261$ donde se despeja $x = (y-0,0261)/0,2455$

En y se reemplaza la absorbancia obtenida de la lectura del espectrofotómetro.

Seguidamente se reemplaza los datos en la siguiente fórmula:

$$\text{AbsN} = \text{Glucosa M} - (\text{Bs} + \text{BM})$$

Donde:

abs N es mg/ml

BM: blanco muestra

BS: blanco sustrato

M: muestra

Calculo de Unidades enzimáticas.

Se define como una unidad enzimática (U), a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de producto (azúcar reductor) por minuto bajo las condiciones de ensayo (pH y T°).

El volumen de la muestra en la reacción fue 90 μl , se debe expresarlo por 1 ml, entonces se realiza una regla de tres simple, el tiempo para endoglucanasa (CMSasa) es de 120 min, incubado a 2 horas (120 minutos).

$$[((\text{mg} / 180) \times 1000) \times (10^6 / 120) \times (1000 / 90)] = 1000 / 1944 = 0.514$$

Este factor lo multiplicamos por la dilución en que ha sido llevada la muestra, entonces obtendremos la unidad enzimática (UI/ml).