

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Caracterización molecular de bacterias amilolíticas
aisladas de las salinas de San Blas - Junín**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Pamela Elizabeth CANALES MORMONTOY

ASESOR

Amparo I. ZAVALA PESANTES

Lima - Perú

2013

Dedico este valioso esfuerzo a mis padres Melquiades y Nelly por el apoyo incommensurable que siempre me han brindado y sobre todo por la formación personal que me han dado... con cariño especial para mi madre Nelly Mormontoy, mi ejemplo a seguir.

A mis familiares y amigos por el cariño, apoyo y paciencia.

A Jorge por acompañarme incondicionalmente.

Agradecimientos

A mi alma máter la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, lugar donde se llevó a cabo la presente investigación.

Agradecimientos especiales

A la Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes, por la formación brindada, el apoyo y confianza incondicional durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A la Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo, por su gran apoyo en la realización de este trabajo, sus enseñanzas y su amistad incondicional.

A los miembros del Jurado Examinador y Calificador:

Presidenta:

Dra. Luisa Negrón Ballarte

Miembros:

Mg. Mirtha Roque Alcarraz

Q.F. Teresa Celina Gallardo Jugo

Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

Por las invaluables sugerencias y aportes para la culminación del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE ANEXOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I.- INTRODUCCIÓN	9
1.1.OBJETIVO GENERAL	11
1.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
II.- MARCO TEÓRICO	12
2.1.- AMBIENTES HIPERSALINOS	12
2.1.1.- <i>Ambientes hipersalinos peruanos</i>	15
2.2.- MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS.....	16
2.3.- BACTERIAS DE AMBIENTES HIPERSALINOS	17
2.3.1.- <i>Características generales</i>	18
2.3.1.1.- Taxonomía.....	18
2.3.1.2.- Fisiología.....	20
2.3.2.- <i>Aplicaciones biotecnológicas</i>	21
2.3.2.1. Enzimas.....	23
2.4.- AMILASAS BACTERIANAS.....	28
2.4.1.- <i>Aplicaciones industriales de las amilasas</i>	30
2.5.- PRECEDENTES DE ESTUDIO DE BACTERIAS AMIOLÍTICAS AISLADAS DE AMBIENTES HIPERSALINOS	34
2.6.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR BACTERIANA	36
2.6.1.- <i>Técnicas moleculares para la caracterización molecular de bacterias</i>	37
2.6.2.- <i>Secuenciación de los genes ribosómicos 16S</i>	40
2.6.3.- <i>Análisis bioinformático</i>	41
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1.- MUESTRAS	43
3.2.- REACTIVACIÓN DE LOS AISLADOS	44
3.3.- SELECCIÓN DE BACTERIAS AMIOLÍTICAS	44
3.4.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS BACTERIAS AMIOLÍTICAS.....	45
3.4.1.- <i>Identificación macroscópica y microscópica</i>	45
3.4.2.- <i>Pruebas fisiológicas</i>	45
3.4.3.- <i>Pruebas bioquímicas</i>	45
3.5.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	47
3.5.1.- <i>Extracción de ADN genómico</i>	47
3.5.2.- <i>Amplificación de los genes ribosómicos 16S y análisis de los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S (ARDRA)</i>	48
3.5.3.- <i>Secuenciación de los genes ribosómicos 16S</i>	50

IV.- RESULTADOS	52
4.1.- AISLADOS BACTERIANOS	52
4.2.- SELECCIÓN DE BACTERIAS AMIOLÍTICAS	52
4.3.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS BACTERIAS AMIOLÍTICAS	55
4.3.1.- <i>Identificación macroscópica y microscópica</i>	55
4.3.2.- <i>Pruebas fisiológicas</i>	55
4.3.3.- <i>Pruebas bioquímicas</i>	56
4.4.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS CON ACTIVIDAD AMIOLÍTICA	59
4.4.1.- <i>Amplificación de los genes ribosómicos 16S</i>	59
4.4.2.- <i>Análisis de los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S (ARDRA)</i>	59
4.4.3.- <i>Secuenciación y análisis bioinformático</i>	62
V.- DISCUSIÓN.....	66
VI.- CONCLUSIONES	75
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
VIII.- ANEXOS.....	89

ABREVIATURAS

ADN	:	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	:	Ácido Ribonucleico
dNTPs	:	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
PBS	:	Buffer Fosfato Salino
PCR	:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	:	Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción
SDS	:	Dodecil Sulfato de Sodio
SW	:	Agua de sales
TAE	:	Buffer Tris – Ácido acético – EDTA
TBE	:	Buffer Tris – Ácido bórico – EDTA
TSE	:	Buffer Tris – Cloruro de Sodio – EDTA
UV	:	Ultravioleta
g	:	Gramo
μL	:	Microlitro

mm : Milímetro

mM : Milimolar

pb : Pares de Bases

Kb : Kilobases

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1. Composición de stock agua de sales (SW) al 30 %.

Anexo N° 2. Salinas de San Blas, provincia de Junín (departamento de Junín), Perú.

Anexo N° 3. Marcador de peso molecular DNA ϕ X174 cortado con *Hae III*.

Anexo N° 4. Perfiles de restricción con *BstU I*.

Anexo N° 5. Perfiles de restricción con *Hinf I*.

Anexo N° 6. Matriz de datos bidimensional.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. El árbol filogenético universal de la vida basado en el secuenciamiento de los genes ARNr y la distribución de los microorganismos halófilos dentro del árbol.

Figura N° 2. Estructura de componentes del almidón: amilosa y amilopectina. Hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6.

Figura N° 3. Ubicación de las Salinas de San Blas en el mapa del departamento de Junín, Perú.

Figura N° 4. Aislados bacterianos de las Salinas de San Blas en agar agua de sales al 5 % a 48 h de incubación.

Figura N° 5. Halos de hidrólisis en agar almidón de las bacterias aisladas de las Salinas de San Blas.

Figura N° 6. Bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas según tamaño de halo de hidrólisis.

Figura N° 7. Crecimiento de las cepas bacterianas amilolíticas a diversas concentraciones de sal.

Figura N° 8. Tolerancia salina de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas.

Figura N° 9. Genes ribosómicos 16S amplificados por PCR de las bacterias amilolíticas en gel de agarosa al 1%. MP, Marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb.

Figura N° 10. Gel de agarosa al 3% mostrando ADNr 16S amplificado de las bacterias amilolíticas aisladas de las salinas de San Blas cortado con *Cfo I*.

Figura N° 11 Gel de agarosa al 3% mostrando ADNr 16S amplificado de las bacterias amilolíticas aisladas de las salinas de San Blas cortado con *Hae III*.

Figura N° 12. Dendrograma de similitud mostrando las relaciones entre las bacterias amilolíticas aisladas de las salinas de San Blas.

Figura N° 13. Árbol filogenético elaborado con los métodos Neighbor-Joining y Minimum Evolution.

Figura N° 14. Árbol filogenético elaborado con el método Neighbor-Joining.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Concentración de los cationes (Na^+ , Mg^+ , Ca^+ y K^+) y aniones (Cl^- y SO_4^-), predominantes en varios ambientes hipersalinos y en agua de mar (gL^{-1}).

Tabla N° 2. Clasificación de microorganismos según la concentración óptima de sales para el crecimiento.

Tabla N° 3. Algunas enzimas de microorganismos halófilos moderados y extremos con potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Tabla N° 4. Algunas fuentes y propiedades de amilasas microbianas termoestables.

Tabla N° 5. Características fenotípicas de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue caracterizar bacterias halófilas con actividad amilolítica provenientes de las Salinas de San Blas ubicadas en el departamento de Junín. Este estudio se realizó con 34 bacterias aisladas de muestras de suelos de las Salinas de San Blas el 2008. Primero, las bacterias se reactivaron en medio agua de sales al 5 %, de las cuales 14 hidrolizaron almidón. Los aislados amilolíticos fueron caracterizados mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas convencionales. Tres aislados fueron Gram-negativos y once Gram-positivos. El 21, 4 % (3/14) creció en un amplio rango de concentración de sales, entre 5 y 20 %. Se encontró que 8 de 14 aislados fueron halotolerantes. De las pruebas bioquímicas se tiene que el 14, 3 % (2/14) de los aislados presentó actividad lipolítica, proteolítica y DNasa, y el 42, 9 % (6/14), presentó actividad proteolítica y DNasa. Para la caracterización molecular, se extrajo el ADN genómico de los aislados, se amplificaron y cortaron los genes ribosómicos 16S con las enzimas de restricción *Hae III*, *BstU I*, *Hinf I* y *Cfo I*. Luego, se secuenciaron parcialmente los genes ribosómicos 16S de siete aislados que presentaron perfiles de ADN diferentes y se analizaron mediante programas bioinformáticos BLASTn, CLUSTALX y MEGA. Del análisis fenotípico y molecular se obtuvieron dos grupos, uno perteneciente al género *Halomonas* y el otro, a *Bacillus*.

Palabras clave: Salinas de San Blas, bacterias halófilas, amilasas, enzimas de restricción.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize halophilic bacteria with amylolytic activity from San Blas Saltern located in the department of Junin. This study was conducted with 34 bacteria isolated from soil samples from San Blas Saltern in 2008. First of all, bacteria were reactivated in salt water 5 % medium, of which 14 hydrolyzed starch. The amylolytic isolates were characterized by conventional physiological and biochemical tests. Three isolates were Gram-negative and eleven Gram-positive. 21, 4 % (3/14) were able to grow in a wide range of salt concentration between 5 and 20 %. It was found that 8 of 14 isolates were halotolerant. Biochemical tests showed that 14, 3 % (2/14) of the isolates were lipolytic , proteolytic and DNase, and 42 , 9 % (6/14), had proteolytic activity and DNase. For molecular characterization, genomic DNA was extracted from the isolated, 16S ribosomal genes were amplified and were cut with the restriction enzymes *Hae III*, *BstU I*, *Hinf I* and *Cfo I*. Then, seven isolated wich have showed different DNA profiles were partial sequenced, and sequences were analyzed using bioinformatic programs BLASTn, CLUSTALX and MEGA. From phenotypic and molecular analysis two groups were obtained, one belonged to the genera *Halomonas* and the other to *Bacillus*.

Keywords: San Blas Saltern, halophilic bacteria, amylases, restriction enzyme.

I.- INTRODUCCIÓN

Los ambientes hipersalinos están distribuidos en todo el mundo, los más conocidos son El Mar Muerto (Medio Oriente), El Gran Lago Salado (EEUU), las salinas de Maras (Perú), las minas de sal Salzbad-Salzetnan (Austria), salinas de Turda (Rumania), salinas de Wieliczka (Polonia), entre otros. En Perú, se han descrito las salinas de Huacho, cuyas sales se utilizan para diversos propósitos. Estos ambientes hipersalinos poseen condiciones ambientales extremas como para permitir la vida, sin embargo una variedad de microorganismos ha conseguido adaptarse a estas condiciones y prosperar en ellas, éstas son las bacterias y arqueas, denominados generalmente como microorganismos halófilos. Estos microorganismos producen enzimas capaces de ser activas en condiciones ambientales adversas de elevada concentración salina, y muchas veces de extrema temperatura y/o pH, las cuáles a diferencia de sus contrapartes provenientes de microorganismos no halófilos no serían activas bajo estas condiciones. Es por ello que la búsqueda y estudio de nuevos microorganismos halófilos productores de enzimas es de gran interés biotecnológico por sus potenciales usos industriales ⁽¹⁾. En Perú, los estudios reportados son aún escasos.

Las principales enzimas obtenidas de microorganismos halófilos como amilasas, lipasas, proteasas, nucleasas, entre otras han demostrado tener potencial interés en variados procesos industriales y biotecnológicos ⁽²⁾. Las amilasas degradan el almidón en oligosacáridos de tamaño variable hasta obtener unidades pequeñas. Actualmente, las amilasas han reemplazado la hidrólisis química del almidón en los procesos industriales, y presentan diversas aplicaciones industriales como en alimentos, textilera, papelería, medicina, detergentes, biocombustibles, entre otros. Por ejemplo, los jarabes fructosados empleados en la elaboración de alimentos, y en la mejora de la calidad del pan y en el horneado. Además, los procesos tecnológicos antes descritos requieren en muchos casos elevada temperatura, pH y/o concentración salina ⁽³⁾.

A nivel mundial, se han reportado algunos estudios sobre bacterias aisladas de ambientes hipersalinos capaces de producir amilasas, entre otras. Así, Rohban y col, en el 2009 describieron bacterias productoras de amilasas y otras hidrolasas aisladas del

lago hipersalino Howz Soltan en Irán. En base a las características fenotípicas y al secuenciamiento parcial de los genes ribosómicos 16S de los aislados, estos fueron identificados como miembros de los géneros *Salicola*, *Halovibrio*, *Halomonas*, *Halobacillus*, *Salinococcus* y otros ⁽⁴⁾. Ghozlan y col en el 2006 reportaron la biodiversidad de bacterias productoras de hidrolasas aisladas de diferentes ambientes hipersalinos en Alejandría, Egipto. Emplearon características fenotípicas y el método de agrupamiento de pares por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA) para identificar a sus aislados, proponiendo a los géneros *Halobacillus*, *Salinicoccus*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Pseudoalteromonas* y otros ⁽⁵⁾. El 2013, Babavalian y col identificaron bacterias halófilas moderadas productoras de amilasas del lago hipersalino Aran-Bidgol en Irán, en base a la caracterización fenotípica y genotípica mediante el secuenciamiento parcial de los genes ribosómicos 16S, como pertenecientes a los géneros *Halobacillus*, *Bacillus*, *Idiomarina*, *Halomonas* y otros ⁽⁶⁾. Sin embargo, en el Perú aún son muy pocos los estudios de bacterias productoras de amilasas aisladas de ambientes hipersalinos, es por ello que el presente estudio constituye un gran aporte al conocimiento e interés industrial, al reportar bacterias aisladas de las Salinas de San Blas ubicadas en el departamento de Junín, Perú. Adicionalmente, se valora un ambiente natural peruano.

Además, cabe mencionar que las amilasas son las enzimas de mayor importancia en el mercado a nivel mundial. En general, se emplean en diversos procesos que involucran la degradación de almidón, constituyendo cerca del 25 al 33 % del mercado mundial de enzimas ⁽⁷⁾. Debido a la gran importancia que tienen las amilasas a nivel industrial, y por los beneficios ya señalados de usar enzimas obtenidas a partir de microorganismos provenientes de ambientes hipersalinos, es que el objetivo central de este estudio ha sido la caracterización de bacterias amilolíticas de las Salinas de Blas en el departamento de Junín, Perú.

1.1.- Objetivo general

- Caracterizar molecularmente bacterias con actividad amilolítica procedentes de las Salinas de San Blas del departamento de Junín.

1.2.- Objetivos específicos

- Aislar bacterias con actividad amilolítica provenientes de muestras de suelos de las Salinas de San Blas.
- Caracterizar las bacterias mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas.
- Caracterizar las bacterias mediante la amplificación de los genes ribosómicos 16S, perfiles de restricción y secuenciación.

II.- MARCO TEÓRICO

2.1.- Ambientes hipersalinos

Los ambientes hipersalinos se definen como aquellos medios dónde la salinidad es mayor a la del agua de mar (tabla N° 1). Estos ambientes son extremadamente variables en términos de concentración total de sales, composición iónica y en otros aspectos como la temperatura, presión; y composición y concentración de nutrientes. Bajo estas características no es de sorprender que haya una gran diversidad de microorganismos diferentes en cada ambiente salino. Incluso se ha descrito que algunos ambientes hipersalinos se encuentran entre los más diversos ecosistemas de la Tierra. Los microorganismos que habitan estos ambientes son llamados de manera general halófilos o amantes de la sal. La típica percepción de los ambientes hipersalinos incluye lagos interiores como el Mar Muerto, el cual tiene tan alta concentración de sales que la densidad del agua hace que las personas floten fácilmente en su superficie; hay sin embargo, muchos tipos diferentes de ambientes hipersalinos como las salinas costeras, las salinas interiores, las minas de sal y los lagos salados ⁽⁸⁾.

Según las condiciones descritas en los ambientes hipersalinos, pareciera que la vida no podría prosperar en estos lagos y salares. Sin embargo, salares de elevada concentración de sales contienen tal densidad poblacional y biomasa como la que se puede encontrar en el agua de mar ⁽⁹⁾. Diversos estudios han descrito que la ecología de estos ambientes de extrema salinidad está dominada por microorganismos: bacterias y arqueas halófilas ^(5, 10, 11).

Tabla N° 1. Concentración de los cationes (Na⁺, Mg⁺, Ca⁺ y K⁺) y aniones (Cl⁻ y SO⁻⁴), predominantes en varios ambientes hipersalinos y en agua de mar (g/L) ⁽⁸⁾

Ambiente	Na⁺	Mg⁺	Ca⁺	K⁺	Cl⁻	SO⁻⁴	Salinidad
Agua de mar	10,8	1,3	0,4	0,4	19,4	2,7	35
Agua de mar al inicio de la precipitación de halita	98,4	14,5	0,4	4,9	187,0	19,3	324
Agua de mar al inicio de la precipitación de potasa	61,4	39,3	0,2	12,8	189,0	51,2	354
Gran Lago Salado, EEUU	105,0	11,1	0,3	6,7	181,0	27,0	333
El Mar Muerto, Israel	39,7	42,4	17,2	7,6	219,0	0,4	327
Salina Don Juan, Antártica	11,5	1,2	114,0	0,2	212,0	0,01	339
Lago Magadi, Kenya	161,0	0	0	2,3	111,8	16,8	315
Discovery Deep-Sea lago salado, Mediterráneo	1,6	121,4	0,1	0,8	336,5	9,2	470

Modificado de: Bell E. Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival. Wallingford: Cabi; 2012.

La diversidad, composición y distribución presente en los ambientes hipersalinos es variable en función de la influencia de una serie de parámetros como la salinidad total, composición iónica, solubilidad de oxígeno, pH y temperatura ⁽¹²⁾.

Se ha descrito que los ambientes hipersalinos difieren grandemente en su composición iónica, es decir en la concentración relativa de sus componentes, lo

cual puede tener influencia tanto sobre la diversidad y ecología del medio ambiente como en los límites que condicionan la vida ⁽⁹⁾.

Las salinas formadas por evaporación de agua de mar tienen un pH cercano al neutro y una composición similar al del agua de mar (denominadas como talosalinas), dónde el Na^+ y Cl^- son los principales iones (tabla N° 1). En contraste, la composición iónica de los lagos denominados como atalosalinos está determinada por la geología circundante y difiere a la del agua de mar, siendo los cationes divalentes como el Ca^{+2} y Mg^{+2} los prevalentes. Un ejemplo de ambiente atalosalino es el Mar Muerto, ubicado entre Israel y Jordania, el cual es dominado por el Mg^{+2} (cerca de 2 M) y Ca^{+2} (cerca de 0,47 M), el principal anión es el Cl^- seguido del Br^- y tiene un pH entre 5,9 y 6,3 ⁽¹³⁾. A tan alta concentración de sales, estos iones pueden ser extremadamente estresantes para los organismos que ahí viven, y pueden desestabilizar y perjudicar las funciones de macromoléculas biológicas esenciales como las proteínas, sin embargo no es así debido a las estrategias de adaptación que han desarrollado los microorganismos que ahí habitan.

El Gran Lago Salado (Utah, EEUU) de la región norte tiene una salinidad total similar a la del Mar Muerto, pero difiere en su composición de sales. Los iones predominantes son Na^+ y Cl^- , además contiene una relativa elevada cantidad de SO_4^{-2} , y tiene un pH aproximado de 7,7 ⁽¹⁴⁾.

Los lagos alcalinos atalosalinos conocidos como lagos de soda son ricos en sales como NaCl , NaHCO_3 y Na_2CO_3 , son normalmente formados a partir de la disolución de rocas que tienen bajas concentraciones de magnesio y calcio. Los lagos más estudiados de este tipo se encuentran al este del Valle Rift en África, en Rusia y EEUU. Puede darse una estresante acumulación de NH_3 debido a la débil disociación del amonio a elevado pH. Sin embargo, con estas condiciones de elevado pH, salinidad y de soportar frecuentemente altos niveles de temperatura y radiación solar, los lagos de soda se encuentran entre los ecosistemas más productivos en el mundo ⁽⁹⁾.

2.1.1.- Ambientes hipersalinos peruanos

Salinas de Atacocha

Se ubican en el distrito de Santiago de Pischa, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho a 3200 msnm. Debido a la variada composición de minerales que posee, produce sales de diferentes y característicos colores, como las conocidas sales rosa, azul y blanca. Estudios realizados en estas salinas, señalan que la mayoría de bacterias que aquí habitan son halófilas moderadas y pertenecen a diferentes géneros de la familia *Halomonadaceae* ⁽¹⁵⁾.

Salinas de Chilca

Se encuentran en la ciudad de Chilca, provincia de Cañete, departamento de Lima. Estas salinas se caracterizan por encontrarse cercanas a lagunas con altos índices de sales minerales como el cloruro de sodio, sulfato y carbonatos. Estudios sobre la diversidad microbiana en las Salinas de Chilca aún son escasos ⁽¹⁶⁾.

Salinas de Pilluana

Éstas se ubican en el distrito de Pilluana, provincia de Picota, al sur del departamento de San Martín, a una altitud de 860 msnm. Las salinas de Pilluana se caracterizan por poseer una concentración media de NaCl de 20 %, y se encuentran alimentadas por las aguas termales de Picuro Huasi. Flores-Fernández M, estudio la diversidad genética de bacterias halotolerantes productoras de lipasas extracelulares aisladas de las Salinas de Pilluana. En este estudio describe la caracterización fenotípica y molecular de 14 bacterias halotolerantes pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Bacillus* y *Virgibacillus* ⁽¹⁷⁾.

Salinas de Maras

Las salinas de Maras se encuentran en el distrito de Maras, provincia de Urubamba, departamento de Cusco a 3380 msnm. Estas salinas conocidas también como Salineras de Maras están formadas por un conjunto aproximado de 3000 pequeños pozos de 5 m² cada uno. La explotación de estas minas de sal es tan antigua como el

Tahuantinsuyo mismo. La salinera en forma de terrazas o andenes es atravesada por un riachuelo de manantiales cercanos que nutre de agua las pozas. Los estudios realizados indican el predominio del dominio *Archaea* ⁽¹⁰⁾.

2.2.- Microorganismos extremófilos

La Tierra contiene una gran variedad de entornos los cuales desde una perspectiva antropocéntrica podrían ser clasificados como extremos, relativo a las condiciones en que la mayoría de seres humanos llevamos la vida cotidiana, tales como temperatura, presión, humedad, calidad de aire, luz, suministro de nutrientes, etc. Desde este punto de vista, el mundo está claramente lleno de extremos, factores abióticos como temperatura, salinidad y pH, son los primeros que se nos vienen a la mente.

El término extremófilo fue usado por primera vez por MacElroy en 1974, debido a que se descubrieron que muchos microorganismos vivían y prosperaban en ambientes considerados extremos para la vida humana tales como temperatura, en ocasiones encima de 100 °C, extremos valores de pH y elevadas concentraciones salinas ⁽¹⁸⁾.

Los extremófilos son clasificados en base a la condición particular extrema en que viven. Se consideran como termófilos aquellos microorganismos que crecen encima de los 50 °C; los hipertermófilos crecen inclusive por encima de los 100 °C. Los psicrófilos pueden crecer a temperaturas por debajo de los 5 °C, aunque su rango de temperatura de crecimiento puede ir desde los 20 °C hasta menos de 0 °C. Se denominan alcalófilos aquellos microorganismos que habitan ambientes con pH mayor a 8. La mayor parte de los alcalófilos pertenecen al género *Bacillus* y son también halófilos. En general los microorganismos acidófilos son aquellos que se desarrollan en medios con pH menor a 4. Así también existen los microorganismos piezófilos o barófilos, los cuales requieren condiciones de alta presión para su desarrollo y crecimiento. Los barófilos se pueden encontrar en ambientes marinos

profundos donde la presión es elevada. Inclusive se han descrito microorganismos resistentes a la radiación, tales como *Deinococcus radiodurans* y especies de *Methanosarcina*. Finalmente, los halófilos son aquellos microorganismos que crecen en elevadas concentraciones salinas, generalmente entre 5 y 30 % ⁽¹⁹⁾.

Los microorganismos extremófilos son una fuente potencial de enzimas que exhiben elevada estabilidad en condiciones extremas, lo cual resulta muy atractivo para diferentes aplicaciones industriales bajo las cuales enzimas convencionales no mostrarían el mismo comportamiento. Actualmente son diversos y cada vez mayores los procesos industriales en los que se requieren el uso de biocatalizadores en condiciones extremas de temperatura, pH o salinidad ⁽²⁰⁻²³⁾.

2.3.- Bacterias de ambientes hipersalinos

Hace más de 30 años atrás, Donn Kushner (1978) propuso una clasificación de microorganismos en base a sus requerimientos de sal y tolerancia, la cual viene siendo la más aceptada ⁽²⁴⁾. A continuación se describe en la tabla N° 2.

Tabla N° 2. Clasificación de microorganismos según la concentración óptima de sales para el crecimiento.

Denominación	Concentración de NaCl (% p/v)
Halotolerante	< 1 % -elevadas concentraciones salinas
Halófilos débiles	0,2- 0,5 M (1-3 %)
Halófilos moderados	0,5- 2,5 M (3-15 %)
Halófilos extremos	2,5- 5,0 M (15- 30 %)

Modificado de: Mellado E, Ventosa A. Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms. *Microorg Food Enzym Prod.* 2003;2:233-56.

2.3.1.- Características generales

2.3.1.1.- Taxonomía

Los halófilos y halotolerantes pueden encontrarse en cualquiera de los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eucarya (figura N° 1). Los halófilos mejores conocidos se encuentran en el dominio arquea (phylum *Euryarchaeota*) en la clase *Halobacteria*.

En el dominio Archaea, los microorganismos halófilos por excelencia son los pertenecientes a la familia *Halobacteriaceae*, orden *Halobacteriales*. Ellos son el principal componente de la biomasa de ambientes salinos como el Mar Muerto, el Lago Magadi, Kenya y otras salinas. Muchas o casi todas las coloraciones rojas en los ambientes salinos son debido a pigmentos carotenoides (C-50) encontrados en las membranas de miembros de esta familia. *Halobacterium* y casi todos sus relativos requieren por encima de 100-150 g/L de sal para su crecimiento y estabilidad estructural. Además en la orden *Methanosarcinales* se encuentran halófilos y halotolerantes representantes de los géneros *Methanohalophilus* y *Methanohalobium*. Ellos pertenecientes al phylum *Euryarchaeota* ⁽²⁵⁾.

Mientras que en el dominio Eucarya, los halófilos son escasos. Se reconoce que el único microorganismo de importancia en este dominio es el alga unicelular verde *Dunaliella*. Existen diferentes especies de *Dunaliella* las cuales crecen en una amplia gama de concentraciones salinas, y algunas sintetizan grandes cantidades de β -caroteno lo cual es aprovechado comercialmente ⁽²⁶⁾.

En el dominio Bacteria, existen varios tipos de microorganismos halófilos y halotolerantes, organizados en una variedad de subgrupos filogenéticos. Las diferentes ramas de *proteobacterias* contienen representantes halófilos. Los halófilos son encontrados también en *cyanobacteria*, la rama *Flavobacterium-Cytophaga*, las espiroquetas y los actinomicetes. Entre las bacterias Gram-positivas, los halófilos son encontrados tanto en aeróbicos como anaeróbicos. Incluso hay un orden, los *Halanaerobiales*, que consiste de dos familias (*Halanaerobiaceae* y *Halobacteroidaceae*) que consisten únicamente de microorganismos anaeróbicos

halófilos. En los Gram-negativos, son muy reconocidos los miembros de los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*, familia *Halomonadaceae* ⁽²⁷⁾.

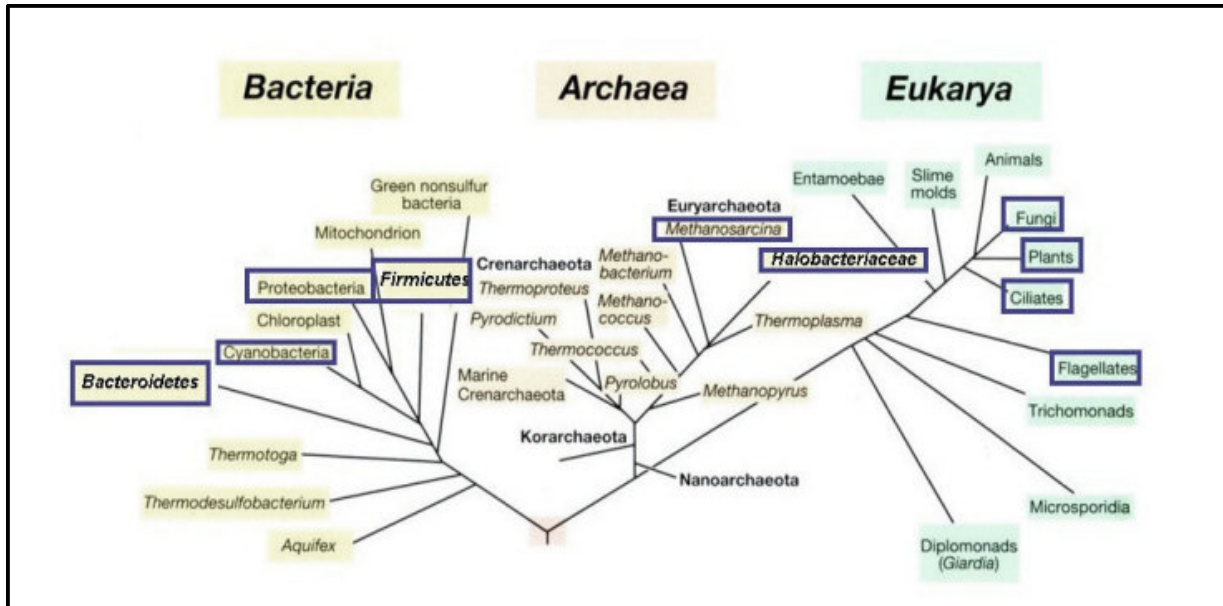


Figura N° 1. El árbol filogenético universal de la vida basado en el secuenciamiento de los genes del ARNr de la subunidad menor, y la distribución de los microorganismos halófilos dentro del árbol. Los grupos marcados en bordes azules contienen al menos un representante halófilo. De los *Bacteroidetes*, *Salinibacter ruber* es el único miembro halófilo descrito hasta la fecha, el orden *Halobacteriales* está constituido totalmente de halófilos ⁽²⁵⁾.

En general, se puede afirmar que muchos de los halófilos que pertenecen al dominio Bacteria son halófilos moderados y no extremos. Sin embargo, hay algunos tipos que se asemejan a las arqueas halófilas de la familia *Halobacteriaceae* en cuanto a sus requerimientos de sal y tolerancia. Notables ejemplos, son las bacterias fotosintéticas púrpuras del género *Halorhodospira*, el *actinomiceto* *Actinopolyspora halophila* y *Candidatus salinibacter* ⁽²⁷⁾.

En muchos casos, halófilos y no halófilos relacionados filogenéticamente son encontrados juntos en el árbol filogenético, y muchos géneros, familias y órdenes tienen representantes con diferencias marcadas en sus tolerancias y sus requerimientos de sal.

2.3.1.2.- Fisiología

Una característica básica de los microorganismos de ambientes hipersalinos es su capacidad para mantener un equilibrio osmótico con el medio que les rodea. Se han descrito fundamentalmente dos estrategias desarrolladas por los microorganismos halófilos para conseguir un balance osmótico entre el medio que les rodea y su citoplasma.

La primera estrategia descrita básicamente en arqueas consiste en la acumulación de elevadas concentraciones de K^+ y Cl^- en el medio intracelular. Esta estrategia requiere una elevada adaptación de la maquinaria enzimática intracelular a la presencia de sales para que mantengan sus propiedades conformacionales y actividad enzimática a concentraciones salinas cercanas a la saturación ⁽²⁸⁾.

Debido a estas condiciones, estos microorganismos generalmente no pueden sobrevivir en medios con bajas concentraciones de sal. Sin embargo, esta estrategia de adaptación salina no está limitada sólo a las arqueas halófilas. Las anaeróbicas fermentativas *Halanaerobiales* (*Bacteria*, *Firmicutes*) usa KCl y no solutos orgánicos para balancear osmóticamente su citoplasma, por ello han adaptado su maquinaria intracelular para tolerar la presencia de sales. Esta estrategia también ha sido identificada en *Salinibacter ruber* (*Bacteroidetes*).

La segunda estrategia de osmoadaptación está basada en la exclusión de sal del citoplasma tanto como sea posible, y acumular altas concentraciones de solutos orgánicos denominados solutos “compatibles” para conseguir el balance osmótico. Ésta alta concentración de solutos compatibles no interfiere en gran medida con su normal actividad enzimática, las adaptaciones proteómicas son muy pocas, es así que estos microorganismos pueden adaptarse a un rango amplio de concentraciones salinas ⁽²⁷⁾. Muchos de los solutos compatibles están basados en aminoácidos y derivados de aminoácidos, azúcares o alcoholes de azúcares, tales como glicerol, glicina betaína, ectoína, sucrosa y trehalosa. Esta estrategia es ampliamente usada en los tres dominios de la vida. Los solutos compatibles más usados en el dominio *Bacteria* parecen ser la ectoína y la glicina betaína. A pesar de que el uso de solutos orgánicos compatibles requiere menores adaptaciones de la

maquinaria enzimática intracelular que la acumulación de KCl; la producción de estos solutos es energéticamente más costosa ^(26, 27).

En cuanto a la adaptación de las enzimas a las condiciones de elevada salinidad, éstas presentan por lo general las siguientes características en común: la superficie de la proteína es elevadamente ácida por la presencia de aminoácidos ácidos como el ácido glutámico y el ácido aspártico, y reducción de la hidrofobicidad total de la proteína ⁽¹⁾.

2.3.2.- Aplicaciones biotecnológicas

Se han descrito diversas aplicaciones industriales de los microorganismos halófilos y halotolerantes, considerando tanto el aprovechamiento de componentes propios como de sus metabolitos secundarios o de los microorganismos en sí ⁽²⁹⁾.

Los microorganismos halófilos han desarrollado una peculiar fisiología para poder adaptarse al medio en que viven, además que poseen características que facilitan su explotación comercial, tales como requerimientos nutricionales sencillos, una amplia variedad de compuestos que pueden usar como fuente de carbono y energía, y el riesgo de contaminación durante su cultivo, por desarrollarse en medios salinos, es bajo. Debido a estas características, los microorganismos halófilos han generado interés biotecnológico para diversas aplicaciones industriales ⁽³⁰⁾.

Algunas bacterias halófilas son excelentes productoras de interesantes biopolímeros a nivel industrial. Por ejemplo se está considerando el uso de polihidroxicanoatos y poliésteres biológicos, producidos por bacterias halófilas, como el poli-3-hidroxibutirato el cual tiene la propiedad de ser plástico biodegradable.

Las actuales y potenciales aplicaciones de los microorganismos halófilos pueden ser divididas en las siguientes categorías ⁽³¹⁾:

- Procesos de manufactura artesanales como la producción de sal dónde la microbiota influye en la calidad de la sal obtenida; la producción de alimentos

fermentados tradicionales como “jeotgal”, “fugunoko nukazuke” y “nam-pla”, especialmente populares en el medio oriente y en los cuales se han aislado arqueas y bacterias de diferentes géneros. Estos procesos existen incluso desde antes que la naturaleza de los microorganismos involucrados sea conocida; pero poco o nada se ha hecho para controlar estos microorganismos en búsqueda de la mejora de estos procesos productivos ^(32, 33).

- Explotación de compuestos producidos por ciertos tipos de halófilos los cuáles pueden soportar elevadas concentraciones salinas en el medio, tales como los osmolitos ectoína, betaína, glicerol, entre otros, denominados solutos compatibles. Empleados actualmente en la formulación de productos cosméticos como agentes protectores y de cuidado de la piel, y como agentes protectores de biomoléculas en Biología Molecular ⁽³⁴⁻³⁶⁾.
- Aprovechamiento la tolerancia salina de los microorganismos halófilos y las enzimas que producen, para poder catalizar procesos industriales en altas concentraciones salinas, tales como el tratamiento de residuos industriales salinos y la degradación de contaminantes orgánicos en medios salinos ⁽³⁷⁻⁴⁰⁾.
- Aplicaciones de compuestos únicos producidos por algunos halófilos no directamente relacionados con su capacidad de vivir en ambientes salinos. Por ejemplo, la bacteriorodopsina, el cual es una proteína de peculiares características que funciona como una bomba de protones estimulada por la luz y es estable en ausencia de sales. Tiene múltiples aplicaciones potenciales en bioelectrónica, nanotecnología y holografía ^(41, 42).
- Uso industrial de compuestos presentes tanto en halófilos como en no halófilos como el β -caroteno, pigmento antioxidante usado principalmente como aditivo alimentario ⁽⁴³⁾. Los poly- β -hidroxialcanoatos (PHA) son acumulados como polímeros de reserva por diversos procariontes y usado en la industria como plásticos biodegradables ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾. Se han reportado *Haloferax mediterranei* y *Halomonas boliviensis* como productores de PHA. Los exopolisacáridos extracelulares producidos por bacterias debido a sus características reológicas y su resistencia a extremos de pH y temperatura han encontrado aplicaciones

como agentes emulsionante, tal es el caso del exopolisacárido aniónico producido por especies de *Halomonas* ⁽⁴⁷⁾.

2.3.2.1. Enzimas

La adaptación de las enzimas de microorganismos halófilos para poder ser estables y activas en medios de elevada salinidad, donde las enzimas de microorganismos convencionales no tendrían la misma actividad, permitiría un amplio rango de aplicaciones industriales tales como en procesos alimentarios, de limpieza, biosintéticos y de biorremediación medioambiental. Por esta razón se vienen llevando a cabo extensivos esfuerzos para el aislamiento y la caracterización de diferentes tipos de enzimas provenientes de microorganismos adaptados a las elevadas concentraciones salinas ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

Diferentes enzimas halófilas vienen siendo estudiadas para potenciales aplicaciones biotecnológicas. Estas enzimas incluyen hidrolasas como amilasas, nucleasas, fosfatasas y proteasas, las cuales son actualmente de gran interés comercial ⁽²⁾.

Las enzimas de bacterias halófilas son muy versátiles. Por lo general sus requerimientos de sal no son tan estrictos como en el caso de las arqueas, y su actividad enzimática es más diversa. Un ejemplo reciente de la literatura es la lipasa extracelular termotolerante de la bacteria halófila moderada *Salivibrio sp.* la cual es activa a 50 °C y a elevadas concentraciones salinas ⁽⁵¹⁾. La tabla N° 3 muestra algunas enzimas producidas por microorganismos halófilos.

Tabla N° 3. Algunas enzimas de microorganismos halófilos moderados y extremos con potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Enzima	Organismo	Concentración óptima de NaCl (%)
Halófilas extremas		
Amilasa	<i>Natronococcus sp.</i>	15
Serina proteasa	<i>Natrialba asiática</i>	10- 25
Serina proteasa	<i>Natrialba magadii</i>	6- 9
Proteasa	<i>Halobacterium salinarum</i>	23
β- galactosidasa	<i>Haloferax lucentensis</i>	23
Halófilas moderadas		
Amilasa	<i>Nesterenkonia halobia</i>	3- 11
Amilasa	<i>Halomonas meridiana</i>	10
Nucleasa H	<i>Micrococcus varians</i> subsp. <i>Halophilus</i>	29
Nucleasa	<i>Bacillus halophilus</i>	11- 17
Serina metaloproteasa	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	6

Modificado de: Mellado E, Ventosa A. Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms. Microorg Food Enzym Prod. 2003;2:233-56.

Muchos estudios señalan que diversas enzimas derivadas de bacterias halófilas y halotolerantes no sólo son estables a elevadas concentraciones salinas sino que además pueden ser termoestables y alcalinoestables, característica denominada por algunos autores como poliextremofilia ⁽²⁾. Éstas características extremas hacen de estas enzimas ideales candidatos para aplicaciones en diversos campos biotecnológicos dónde son capaces de catalizar reacciones bajo condiciones ambientales duras en las cuales sus contrapartes no halófilas no presentan la misma capacidad.

Amilasas

Las amilasas son una familia de enzimas del tipo hidrolasas que catalizan la degradación del almidón para producir dextrinas y oligosacáridos de diferentes tamaños de longitud. Las amilasas son ampliamente usadas en diferentes aplicaciones biotecnológicas incluyendo la industria alimentaria, por ejemplo en panadería y horneado para mejorar las características finales del pan; en la formulación de detergentes para promover la eliminación de manchas y por ser amigables con el medio ambiente. También se utilizan en la industria del papel para modificar el almidón en el papel encolado ⁽⁵²⁾. A continuación se señalan algunas fuentes de amilasas a partir de bacterias halófilas que han sido reportadas, *Micrococcus halobius*, *Halomonas meridiana*, *Halobacillus sp.*, *Halothermothrix orenii*, *Streptomyces sp.* y *Chromohalobacter sp.* Estas enzimas generalmente muestran estabilidad y actividad en un amplio rango de pH. Algunas de estas enzimas como en caso de *Chromohalobacter sp.* mantienen actividad tanto en presencia como en ausencia de sales. Amilasas de bacterias halófilas muestran un rango de peso molecular entre 50-75 kDa. En muchos casos, la estabilidad de estas enzimas en extremos de pH, sales, y la actividad a elevadas temperaturas hacen de las amilasas atractivas candidatas para diversos procesos industriales bajo condiciones extremas. Actualmente sólo unos pocos genes de amilasas microbianas han sido secuenciados ⁽⁵³⁾.

Una α -amilasa proveniente de una bacteria halófila moderada *Halomonas meridiana* ha sido caracterizada y el gen codificante *AmyH* ha sido clonado, constituyendo en primer gen codificante de amilasa aislado del grupo de los extremófilos ⁽²⁴⁾.

Proteasas

Las proteasas son unas de las enzimas más estudiadas y son ampliamente usadas en diversos procesos industriales. Éstas son comúnmente usadas como aditivos en detergentes, también se usan en alimentos procesados, productos farmacéuticos, tratamiento de cueros, como agentes de diagnóstico, en el tratamiento de residuos y recuperación de la plata. Se han aislado y caracterizado proteasas provenientes de

diferentes microorganismos halófilos incluyendo *Bacillus sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Salinivobrio sp.*, *Salicola sp.*, *Halobacillus spp.*, *Chromohalobacter sp.*, *Nesterenkonia sp.* y *Virgibacillus sp.* ⁽⁵³⁾. Estas enzimas mostraron actividad óptima en un amplio rango de pH entre 5 y 10, y a temperaturas entre 40 y 75 °C, algunas incluso mantienen su actividad catalítica en procesos libres de sales. También se ha reportado que algunas de estas enzimas mostraron ser activas en varias condiciones extremas, por ejemplo se han reportado algunas enzimas haloalcalófilas o halotermófilas ^(54, 55).

Se ha reportado la purificación y caracterización de la proteasa CPI de la bacteria halófila moderada *Pseudoalteromonas sp.* cepa CP76, la cual presenta tolerancia salina a un amplio rango de concentraciones desde 0 hasta 25 %. También se ha estudiado la β -galactosidasa con actividad en elevadas concentraciones salinas ⁽⁵⁶⁾. La síntesis de D-aminoácidos ha sido lograda en un completo proceso enzimático con dos enzimas secuenciales, la D-hidantoinasa y la N-carbamilasa. Ambas enzimas han sido detectadas en varios microorganismos. Debido a la alta demanda comercial de D-aminoácidos, se vienen realizando estudios para aislar nuevos microorganismos productores de estas enzimas. En este sentido, varias cepas de *Pseudomonas* ligeramente halófilas han sido reportadas con actividad hidantoidinasa, útil en estas biotransformaciones.

Halolisina, una proteasa aislada de *Natrialba asiatica* es una de las proteasas mejores caracterizadas del grupo. Esta enzima presenta elevada actividad entre 75 y 80 °C cuando es ensayada en presencia de NaCl al 25 % ⁽²⁴⁾.

Xilanasas

Las xilanasas son enzimas que degradan el xilano, principal polisacárido constituyente de la hemicelulosa, las cuales se usan principalmente en procesos de blanqueamiento de papel, para lo cual se requieren de xilanasas alcalófilas y termotolerantes. Los microorganismos halófilos son una fuente promisoría para obtener enzimas con estas características, sin embargo el estudio en este ámbito es aún limitado. Sólo algunas xilanasas provenientes de microorganismos halófilos y halotolerantes han sido descritas, tales como *Glaciecola mesophila*,

Chromohalobacter sp y *Nesterenkonia sp*. Se ha reportado que alguna de estas enzimas son estables en un amplio rango de pH (de 6 a 11) y mantienen actividad a temperatura superior a 60 °C ⁽⁵⁷⁾.

Celulasas

Celulasas son principalmente usadas en la industria textil, en la composición de detergentes y en la producción de bioetanol ⁽⁵⁸⁾. Se han caracterizado algunas celulasas provenientes de microorganismos halófilos y halotolerantes derivadas de *Bacillus sp* y *Salinivibrio sp.*, las cuales se han reportado como termoestables, alcaloestables y haloestables, siendo ideales candidatos para varias aplicaciones industriales ⁽⁵⁹⁾.

Lipasas

Las lipasas son enzimas de gran interés a nivel industrial, que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos en la interfase oleosa-acuosa, las cuales se emplean en la composición de biodetergentes, cuando tienen las características de ser estables a elevados niveles de pH y temperaturas ⁽⁶⁰⁾. También se emplean para la obtención de Naproxeno y ácido linoléico conjugado, para la producción de biodiesel por transesterificación, y para la obtención de saborizantes y aromatizantes y para la obtención de aceites similares a la manteca de cacao por biotransformación del aceite de palma.

Nucleasas

La enzima nucleasa H de *Micrococcus varians subsp. Halophilus* viene siendo objeto de gran interés a nivel industrial, es usada en la producción comercial del agente saborizante ácido 5- guanílico ⁽⁶¹⁾. Además esta enzima degrada RNA a 60 °C y 12 % de sal.

2.4.- Amilasas bacterianas

Las amilasas son una familia de hidrolasas ampliamente distribuida en los tres dominios de la naturaleza. Las dos principales clases de amilasas que han sido identificadas en microorganismos son la α -amilasa y glucoamilasa. La α -amilasa (endo 1,4- α -D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.1) es una enzima extracelular que rompe al azar los enlaces 1,4- α -D-glucosídicos entre unidades de glucosa adyacentes en la cadena lineal de amilosa (figura N° 2). La α -amilasa se puede derivar de varias fuentes microbianas como las bacterianas, levaduras y hongos. Sin embargo, las amilasas bacterianas son preferidas por encima de las fúngicas, debido a varias ventajas que ofrecen. Son empleados comercialmente las cepas de *Aspergillus sp.* y *Bacillus sp.*, principalmente *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*. En diversos procesos industriales se prefiere principalmente las amilasas termoestables, debido a que su uso disminuye el riesgo de contaminación y reduce el tiempo de reacción de éstas ⁽⁶²⁾.

La β -amilasa es básicamente de origen vegetal, pero también se ha reportado en fuentes microbianas como hongos y bacterias. La β -amilasa también degrada los enlaces 1,4- α -glucosídicos, pero comienza su acción por el extremo reductor no libre del almidón. La hidrólisis se detiene en los puntos de ramificación de la amilopectina y el residuo que produce se conoce como dextrina límite.

La glucoamilasa hidroliza los enlaces 1,6- α -glucosídicos, eliminando así las ramificaciones de la amilopectina o las dextrinas ⁽⁶²⁾.

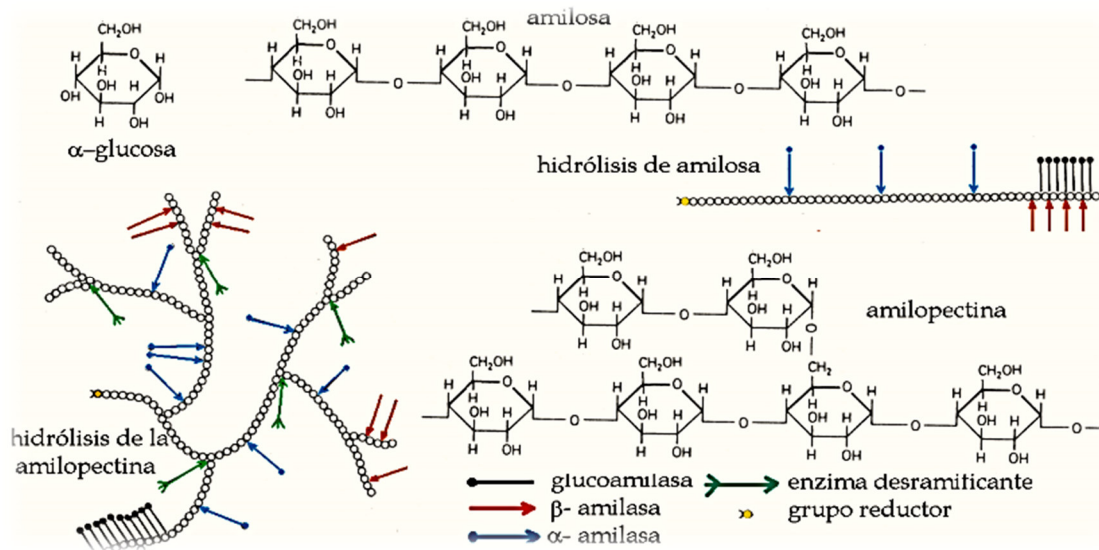


Figura N° 2. Estructura de componentes del almidón: amilosa y amilopectina. Hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 ⁽⁶³⁾.

El almidón es el material de reserva que predomina en las plantas y comúnmente se presenta en gránulos con una típica estructura en capas. Está compuesto de dos polímeros glucanos: amilosa y amilopectina. La amilosa es soluble en agua caliente, consiste de una cadena helicoidal no ramificada de unas 200 - 500 unidades de D-glucosa unidas por enlaces 1,4- α -glucosídicos. La amilopectina se hincha en agua caliente formando una pasta, es también un polímero de 1,4- α -D-glucosa que, como el glicógeno, está ramificado por enlaces 1,6- α -glucosídicos aproximadamente cada 25 unidades de glucosa. Los almidones de distinto origen difieren mucho en su ramificación, el número de unidades por cadena y los residuos fosfato e iones calcio y magnesio que los acompañan ⁽⁶³⁾.

Las enzimas usualmente se desnaturalizan y pierden su actividad catalítica a temperaturas sobre los 50 y 60 °C. Dado que, por lo general en los procesos industriales prevalecen las condiciones extremas, las enzimas termoestables han cobrado especial relevancia, debido a las múltiples ventajas que presentan como una alta velocidad de reacción en estas condiciones, bajas restricciones de disfuncionalidad, elevada estabilidad y elevada productividad. Son diversos los

estudios que reportan α -amilasa termoestables a partir de fuentes bacterianas (62, 64, 65).

2.4.1.- Aplicaciones industriales de las amilasas

La aplicación más extendida de la amilasa es en la industria del almidón. Las especies de *Bacillus* son de especial interés en procesos industriales biotecnológicos a gran escala. A pesar de la amplia distribución de esta enzima en diferentes seres vivos, la fuente que actualmente se utiliza a nivel industrial es la microbiana debido a las ventajas que presenta en la producción; tales como un buen balance costo-efectividad, menor tiempo y espacio requeridos para la producción y baja complejidad del proceso de modificación y optimización del proceso productivo (62).

Entre las bacterias, *Bacillus sp* es ampliamente usada para la producción industrial de α -amilasa termoestable por cumplir con los requerimientos productivos. También, son reconocidas como buenas fuentes productoras de termoestables α -amilasa para diversas aplicaciones industriales: *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. La tabla N° 4 muestra una lista de algunas amilasas microbianas termoestables (64).

Tabla N° 4. Algunas fuentes y propiedades de amilasas microbianas termoestables.

Organismo	Temperatura óptima (°C)	Referencias
<i>Bacillus licheniformis</i>	100	(66)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70-80	(67)
<i>Bacillus subtilis</i>	70	(68)
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	60-65	(69)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	(70)
<i>Staphylothermus marinus</i>	65	(68)
<i>Thermococcus aggregans</i>	100	(68)
<i>Thermococcus litoralis</i>	88	(71)

Modificado de: Prakash O, Jaiswal N. alpha-Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. Applied Biochem Biotechnol. 2010;160(8):2401-14.

Una de las principales aplicaciones de las amilasas en la industria alimentaria es en la producción de edulcorantes. Se utilizan hidrolizados de almidón como aditivos en la fabricación de dulces, caramelos, alimentos en conserva e incluso alimentos congelados. Los jarabes obtenidos a partir de amilasas se utilizan en una variedad de alimentos tales como gaseosas, golosinas, productos horneados, helados, salsas, alimentos para bebés, frutas enlatadas, conservas, etc. Los jarabes utilizados pueden contener maltosa, glucosa o fructuosa, dependiendo de las enzimas utilizadas. En general, los jarabes obtenidos pueden ser de diferente composición y propiedades físicas ⁽³⁾.

Como ya se mencionó las amilasas se usan en la industria alimentaria principalmente para la producción de jarabe mediante la hidrólisis del almidón. Este proceso consiste de tres pasos: gelatinización, liquefacción y sacarificación. Primero se da la disolución de los gránulos de almidón, formando así una suspensión viscosa, proceso denominado gelatinización. Luego sigue la liquefacción, en la cual se da la hidrólisis parcial del almidón y pérdida de la viscosidad. Finalmente se da la sacarificación, que comprende la producción de glucosa y maltosa. La gelatinización es alcanzada calentando los gránulos de almidón en solución acuosa (pH 5,8- 6,5) a una temperatura entre 105 y 110 °C durante cinco minutos. Durante la liquefacción, se da la hidrólisis parcial del almidón en los enlaces 1,4- α -glucosídicos con una α -amilasa termoestable a 95 °C durante 2 a 3 horas. En este proceso es necesaria la actividad enzimática a elevada temperatura. Por ejemplo, si la temperatura de gelatinización cae por debajo de 105 °C, el almidón sufre una hidrólisis incompleta lo cual ocasionaría problemas de filtración más adelante. Es deseable que las α -amilasas sean activas a una temperatura de gelatinización entre 100 y 110 °C, y liquefacción entre 85 y 95 °C, para economizar y optimizar el proceso productivo ^(72, 73).

Comercialmente, la producción de jarabe de maíz con elevada concentración de fructuosa es elevada. Este es un proceso de bajo costo ya que se obtiene un agente edulcorante a partir de una materia prima relativamente barata: el almidón de maíz. Esta conversión requiere el uso secuencial de tres enzimas: la α -amilasa, producida por *Bacillus subtilis* que hidroliza el almidón en fragmentos cortos o

unidades de maltosa; la glucoamilasa, producida por *Aspergillus niger*, que hidroliza hasta formar unidades de glucosa; y la glucosa isomerasa, que convierte la glucosa en su isómero la fructuosa.

Otra aplicación que tiene la amilasa es en el procesado de caña de azúcar, puesto que en el jugo obtenido existen pequeñas cantidades de almidón que aún pueden hidrolizarse. En este proceso se ha usado tradicionalmente la α -amilasa de *B. licheniformis* entre 85 y 95 °C ⁽⁷²⁾.

Las amilasas se pueden añadir a la masa del pan para degradar el almidón presente en la harina en oligosacáridos más pequeños los cuales son posteriormente fermentados por levaduras. Esta adición mejora de la tasa de fermentación y reducción de la viscosidad de la masa, lo cual resulta en la mejora del volumen y la textura del producto. Por otra parte, el azúcar adicional en la masa mejora el sabor, textura, color y cualidades generales de aspecto del pan. Además se genera un efecto antienvjecimiento de estos productos ya que mejora la retención de la suavidad en los panes, incrementando así la vida útil de los productos de panadería. Actualmente, en panadería se usa una amilasa termoestable maltogénica proveniente de *Bacillus stearothermophilus* ⁽⁶⁵⁾.

La utilización de amilasas bacterianas en la industria textil y de fabricación de papel, se basa en la utilidad de las dextrinas como agentes cohesivos producidas a partir del almidón. En la industria textil se utiliza el recubrimiento de almidón para evitar que la fibra textil se retuerza y aumente su peso durante el tejido; sin embargo, para el subsecuente procesamiento de la tela, el almidón tiene que ser completamente removido para lo cual se emplea la α -amilasa. El proceso se describe a continuación: después de que la tela es lavada en agua caliente a 90 °C durante 10 s, se pasa una o más veces por un baño caliente que contiene una solución de 0,5 a 1 % p/v de la α -amilasa proveniente de *Bacillus subtilis* y una solución 0.05 % p/v de cloruro de calcio (para estabilizar la enzima) a temperatura entre 65 y 80 °C durante 20 segundos. De esta manera es que se emplean las enzimas para remover el almidón de la tela y se evita la ruptura de las fibras longitudinales en el procesado textil ⁽³⁾.

En la industria del papel se usa el almidón como agente de encolado para mejorar la calidad y el acabado del papel revestido, haciendo su superficie suficientemente lisa y fuerte para mejorar la calidad de la escritura sobre ésta. Como en la industria textil, el almidón se usa como un protector contra el daño mecánico que pudiera sufrir la fibra de papel durante su procesamiento, pero además se consigue mejorar el acabado y la calidad final del papel. Por ello el almidón es adicionado en el proceso de fabricación, sin embargo la viscosidad del almidón natural es muy fuerte para conseguir las características mencionadas por lo que se ajusta con un tratamiento de amilasas para su degradación parcial. Como resultado, la superficie del papel es más lisa y fuerte, mejorando así la calidad de la escritura sobre éste ⁽⁷⁴⁾. Algunos ejemplos de amilasas usadas en la industria del papel: Amizyme[®], Termamyl[®] y BAN[®].

La amilasa también se emplea en la composición de detergentes, esto debido a que contribuye a mejorar la eficacia de la limpieza gracias a su capacidad de degradación de los restos de almidón en la suciedad y a que producen un mínimo impacto ambiental al ser biodegradable. La principal ventaja de las enzimas en la composición de los detergentes es que con ellos las condiciones de lavado se hacen menos drásticas que con las formulaciones de detergentes sin enzimas. Los primeros detergentes para lavavajillas automáticos eran muy fuertes causando grave daño por ingesta accidental y no eran compatibles con la delicada porcelana y vajilla de madera, esto obligó a las industrias de detergentes a buscar soluciones más eficientes, lo cual se consigue con las amilasas. Además, las enzimas también permiten la reducción de las temperaturas de lavado. Hoy en día, cerca del 90 % de todos los detergentes líquidos contienen α -amilasa en su composición ^(75, 76).

2.5.- Precedentes de estudio de bacterias amilolíticas aisladas de ambientes hipersalinos

Algunas amilasas han sido purificadas y caracterizadas de microorganismos halófilos tales como *Haloferax mediterranei* ⁽⁷⁷⁾, *Halobacterium salinarum* ⁽⁷⁸⁾, *Natrococcus amylolyticus* ⁽⁷⁹⁾, *Halomonas meridiana* ⁽⁸⁰⁾, entre otros. También se han reportado estudios sobre el aislamiento y caracterización fenotípica y genotípica de bacterias productoras de hidrolasas de interés como las amilasas provenientes de diferentes ambientes hipersalinos en el mundo, algunos de los cuales se mencionan a continuación.

Ardakani y col, 2012 aislaron bacterias de sedimento y agua del Golfo Pérsico el cual se caracteriza por su alta salinidad y se identificaron cepas productoras de enzimas hidrolíticas como amilasas, lipasas, proteasas y DNAsas. El estudio fenotípico y molecular determinó que las bacterias fueron halófilas moderadas pertenecientes al género *Pseudoalteromonas*, el cual es ampliamente distribuido en ambientes marinos ⁽⁸¹⁾.

Sánchez-Porro y col, 2003 determinaron la diversidad de bacterias moderadamente halófilas con actividad hidrolítica. Se aislaron 122 bacterias provenientes de diferentes ambientes hipersalinos del sur de España. Los aislados fueron capaces de producir diferentes hidrolasas tales como amilasas, lipasas, proteasas y pululanasa. Estas bacterias fueron capaces de crecer óptimamente en medios conteniendo entre 5 y 15 % de sales, y en algunos casos entre 20 y 25 %. En contraste con cepas ATCC pertenecientes a especies previamente descritas las cuales reportan poca actividad hidrolítica, los aislados ambientales producen una gran variedad de hidrolasas. Estas cepas fueron identificadas como miembros de los géneros: *Salinivibrio* (55 cepas), *Halomonas* (25 cepas), *Chromohalobacter* (dos cepas), *Bacillus-Salibacillus* (29 cepas), *Salinicoccus* (dos cepas), *Marinococcus* (una cepa) y ocho aislados no identificados ⁽⁸²⁾.

Rohban y colaboradores, 2009 aislaron 231 bacterias moderadamente halófilas provenientes de diferentes áreas de la playa de Howz Soltan, un lago hipersalino ubicado en la zona desértica central de Irán, las cuales crecieron óptimamente a la concentración de sales entre 5 y 15 %. Estos aislados produjeron una gran cantidad de enzimas hidrolíticas, 177 (76, 6 %) de estos produjeron amilasas. También se detectaron lipasas, proteasas, inulinasas, xilanasas, celulasas, pululanasas, DNasas y pectinasas ⁽⁸³⁾.

Ying Yong y col, 2012 analizaron muestras de suelo y aguas salinas obtenidas de las Salinas Daishan en China Oriental. Se aislaron un total de 181 cepas entre bacterias y arqueas. El análisis filogenético indica la presencia de siete géneros presentados en el grupo de las bacterias halófilas, y cuatro, en las arqueas halófilas. La mayoría de las cepas mostraron actividad productora de enzimas, incluyendo amilasas, proteasas y lipasas, siendo en su mayoría cepas de *Haloarcula* ⁽⁸⁴⁾.

Amoozegar y col, 2003 estudiaron la producción de amilasa de *Halobacillus sp.* cepa MA-2 bajo condiciones de elevada temperatura y salinidad en cultivos aeróbicos conteniendo almidón, peptona, extracto de res y cloruro de sodio. Se evidenció que varias fuentes de carbono inducen la producción de amilasa. El pH, temperatura y aireación óptimos para la producción enzimática fueron 7,8; 30 °C y 200 rpm, respectivamente. Por otra parte los parámetros óptimos para la actividad enzimática fueron pH entre 7,5 y 8,5 y temperatura de 50 °C ⁽⁸⁵⁾.

Moreno y col, 2009 estudiaron la diversidad de los halófilos extremos a partir de muestras provenientes de diferentes hábitats hipersalinos del Sur de España. Caracterizaron un total de 43 halófilos extremos, los cuales exhibieron actividad hidrolítica tipo amilolítica, proteolítica, lipolítica y DNasa. Los aislados crecieron óptimamente entre 15 y 20 % de sales. Varios de los aislados productores de hidrolasas fueron asignados a la familia *Halobacteriaceae*, géneros *Halorubrum*, *Haloarcula* y *Halobacterium* ⁽⁸⁶⁾.

Vahed y col, 2011 evaluaron 37 cepas que lograron aislar del lago Urmia de Irán, uno de los lagos hipersalinos más permanentes. En la mayoría de los aislados se

encontró actividad catalasa, oxidasa y ureasa positiva. El análisis filogenético basado en el secuenciamiento de los genes ribosómicos 16S arrojó que las bacterias aisladas pertenecen a dos grandes grupos taxonómicos: *Gammaproteobacteria* (incluyendo *Salicola*, *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Idiomarina* y *Halomonas*) y *Firmicutes* (incluyendo *Bacillus* y *Halobacillus*)⁽⁸⁷⁾.

2.6.- Caracterización molecular bacteriana

Inicialmente la identificación bacteriana se realizaba únicamente en base al estudio de las características fenotípicas del aislado bacteriano; sin embargo, identificar a los microorganismos teniendo en cuenta sólo las evaluaciones fenotípicas, resulta bastante limitado e impreciso ya que sólo características observables en muchos casos resultan insuficientes para poder dar conclusiones definitivas. Además, se debe tener en cuenta que el fenotipo de un ser vivo es el producto de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente, y por lo tanto hay variaciones a lo establecido genéticamente. Por estas razones y gracias a los grandes avances de la Biología Molecular, es que desde hace algunos años atrás la identificación bacteriana se viene realizando con otra metodología, la cual se basa en el uso de criterios fenotípicos y moleculares. De esta manera se tiene mayor grado de confianza de una identificación precisa⁽¹⁷⁾. Se ha reportado en muchos casos que el establecimiento de la taxonomía basada sólo en los rasgos morfológicos proporciona datos inadecuados o engañosos a nivel de la diferenciación de especies y subespecies⁽⁸⁸⁾.

El empleo de técnicas moleculares en la identificación bacteriana permite reducir tiempos de análisis, además de otorgar mayor exactitud y reproducibilidad de los resultados. De esta manera se establece de manera más confiable las relaciones filogenéticas y el ordenamiento de las cepas bacterianas en grupos coherentes, sin las desviaciones típicas obtenidas con los medios de cultivo de enriquecimiento. Incluso, ya se practican métodos para el estudio de la diversidad de poblaciones microbianas sin necesidad de lograr el aislamiento de los microorganismos. Así también, se han desarrollado técnicas de identificación mediante PCR convencional

y PCR cuantitativa a tiempo real. Por otra parte, se ha agilizado la identificación bacteriana mediante la combinación de técnicas clásicas de microbiología y técnicas rápidas de identificación molecular, ya sea en cultivo puro o mixto y por los kits comerciales disponibles ⁽⁸⁹⁾.

2.6.1.- Técnicas moleculares para la caracterización molecular de bacterias

Actualmente las diversas técnicas moleculares permiten el estudio de la dinámica de las poblaciones microbianas, establecer relaciones filogenéticas y evolutivas, e incluso detectar características de interés, entre otras diversas aplicaciones. La gran cantidad de información que se genera a partir de estos análisis puede servir para cubrir múltiples objetivos, siendo posible evaluar desde un individuo hasta categorías taxonómicas más amplias. Incluso en la actualidad, en base a estas técnicas, se viene revisando toda la sistemática de los microorganismos clásicamente propuesta a partir de caracteres morfológicos, lográndose establecer a través del análisis de secuencias de ADN árboles filogenéticos mucho más precisos ^(17, 90).

A continuación se describen algunas técnicas moleculares que contribuyen al estudio de las relaciones filogenéticas de los microorganismos:

Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

El análisis de las diferencias en los tamaños de los fragmentos de restricción debido a polimorfismos en el ADN, es una técnica que explota las variaciones en las secuencias de ADN homólogas. En el análisis de RFLP, la muestra de ADN se digiere con enzimas de restricción que cortan el ADN en secuencias específicas, y los fragmentos de restricción resultantes se separan de acuerdo a sus longitudes mediante electroforesis en gel. El análisis RFLP es una herramienta muy útil en el mapeo genético y la caracterización de la diversidad genética microbiana. Actualmente el uso más frecuente de los RFLP es en combinación con la PCR (PCR-

RFLP) y en genes o regiones particulares para detectar alelos que difieren en una secuencia o región específica ⁽⁹¹⁾.

Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Este método consiste en amplificar al azar regiones de ADN extraído. Los cebadores se escogen al azar, por lo que no es necesario contar con información sobre secuencias específicas del microorganismo a identificar. Después de la separación mediante electroforesis en geles de agarosa se obtienen patrones de fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

En los últimos años se ha popularizado debido a que carece de las desventajas de los RFLP y permite generar datos en forma eficiente y barata, aunque se ha cuestionado su reproducibilidad ⁽⁹²⁾.

Análisis de los perfiles de restricción de ADN ribosómico amplificado por PCR (ARDRA)

Es una técnica molecular que combina la amplificación por PCR de los genes ribosómicos 5S, 23S, 16S o 18S y la digestión del producto amplificado con enzimas de restricción. Estas endonucleasas reconocen secuencias específicas en la doble hebra de ADN, generando un patrón determinado de fragmentos debido a los polimorfismos presentes cuya comparación permite la diferenciación de los aislados. Las variantes genotípicas se detectan como variantes en el tamaño de los fragmentos de restricción ^(93, 94).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El objetivo de esta técnica es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN específico partiendo de una cantidad mínima para de éste, en teoría de un fragmento único de ADN molde. Esta técnica sirve amplificar un fragmento de ADN, y su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil realizar cualquier estudio con esa gran cantidad de copias de ADN. La técnica se basa en la propiedad natural de los ADN polimerasa para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternados para separar las hebras de ADN

recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarse nuevamente. Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al elevar la temperatura y era necesario añadir nuevas polimerasas en cada ciclo. Pero actualmente se vienen usando polimerasas termoestables obtenidas de microorganismos termófilos. Todo el proceso se encuentra automatizado mediante un aparato llamado termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Como etapa inicial si es que la ADN polimerasa requiere activación por calor, se lleva la reacción hasta temperatura entre 94 y 96 °C durante 1 a 9 minutos ⁽⁹⁵⁾.

Cada ciclo está constituido por tres etapas:

1.- Desnaturalización

Separación de las dos hebras de ADN mediante el alza de la temperatura entre 94-95° C.

2.- Alineamiento

Se produce la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario disminuir la temperatura entre 40 y 68 °C durante 20 a 40 segundos. Los cebadores actúan como límite de la región del ADN que va a ser amplificado.

3.- Extensión

La ADN polimerasa parte del cebador para sintetizar el ADN complementario al molde, para esto añade dNTP complementarios. La temperatura para este paso depende del ADN polimerasa que se use. Para la Taq polimerasa la temperatura de máxima actividad es entre 75 y 80 °C. El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento a amplificar. La regla general es que a su temperatura óptima la ADN polimerasa polimerizará mil bases por minuto.

La elongación final se lleva a cabo de 70 a 74 °C durante 5 a 15 minutos tras el último ciclo de PCR, con ello se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado ⁽⁹⁵⁾.

2.6.2.- Secuenciación de los genes ribosómicos 16S

Desde que Carl Woese definió al ARN ribosómico (ARNr) 16S como el cronómetro molecular por excelencia, la comparación de las secuencias de los ARNr 16S o de los genes que los codifican permite establecer relaciones filogenéticas existentes entre organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en la taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias.

El ARNr 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas y aunque existen cronómetros moleculares alternativos, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle.

Presenta las siguientes características principales:

1. Es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado.
3. Los cambios en la molécula ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariotas. Contiene suficiente variabilidad como para diferenciar a los microorganismos más alejados y a los más próximos.
4. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S existen bases de datos amplias en continuo crecimiento.

Para la identificación bacteriana se comparan la secuencia obtenida de cada aislado con las existentes en las bases de datos, muchas de las cuales son de libre acceso en internet. Además el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos los cuales reflejan gráficamente la genealogía molecular de las bacterias en estudio.

Los métodos de secuenciación de ADN se desarrollaron a finales de los años 70 y revolucionaron de forma significativa el mundo de la genética molecular. Originalmente se describieron dos métodos, el método químico de Maxam y Gilbert y en la actualidad el más popular el método enzimático de Sanger. Se basa en la síntesis enzimática de ADN cuya elongación se detiene por incorporación de

nucleótidos modificados (ddNTP). Este método requiere la secuencia de ADN a secuenciar, un primer, ADN polimerasa y cuatro di-desoxi nucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Para el marcaje se puede usar fluorescencia, mediante un fluorocromo distinto para cada ddNTP. Actualmente es popular la secuenciación mediante microarrays ⁽⁹⁶⁾.

2.6.3.- Análisis bioinformático

Es la última etapa de la identificación bacteriana. La primera etapa consiste en la comparación de la secuencia del ADNr 16S con las depositadas en cualquiera de las distintas bases de datos, luego la definición taxonómica del aislado, la comparación entre secuencias mediante el alineamiento y la construcción de árboles filogenéticos que permitan relacionar a los aislados evolutivamente.

A continuación se describen los programas informáticos empleados en el desarrollo de esta tesis:

BLASTn 2.2.28 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), permite encontrar regiones de semejanza local entre diversas secuencias. Este programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con otras depositadas en los bancos de datos del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) y calcula la significancia estadística de la similitud entre ellas. Este programa también puede ser usado para deducir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como también puede ayudar en la identificación de miembros dentro de una familia ⁽⁹⁷⁾.

CLUSTALX 2.1(www.clustal.org/clustal2/#Download), permite realizar alineamientos de las secuencias de nucleótidos y proteínas. Las secuencias son alineadas de a pares y los pares con puntaje (score) más alto luego son agrupados con otras secuencias, formado así grupos armados de acuerdo a la similitud entre ellos. La importancia de este programa, es que permite apreciar el grado de conservación y/o diferenciación de las muestras, hecho que es muy útil en el diseño de experimentos que prueban y modifican la función de proteínas específicas y en la identificación de nuevos miembros de los géneros ⁽⁹⁸⁾.

MEGA 5 (www.megasoftware.net), es una herramienta informática que permite realizar análisis moleculares relacionados con la filogenia, conducir la alineación automática y manual de las secuencias, deduciendo árboles filogenéticos, estimando índices de evolución molecular, comprobando hipótesis evolutivas y deduciendo la naturaleza y el grado de las fuerzas selectivas que determinan la evolución de genes y genomas. El análisis más potente que puede realizar el programa es el de Neighbor- Joining. El Neighbor-Joining es un método de construcción de árboles filogenéticos, en base a las distancias genéticas y es de gran utilidad para el estudio de poblaciones enteras ^(99, 100).

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Muestras

Las muestras de lodos fueron recolectadas de las Salinas de San Blas en el año 2008. Las Salinas de San Blas están ubicadas a 5 Km del lago Chinchaycocha en el distrito de Ondores, provincia de Junín, departamento de Junín. Ubicadas a 4100 msnm, las Salinas de San Blas se encuentran en la región natural Puna. Las muestras fueron recolectadas en frascos estériles de capacidad de 100 mL. Los frascos con las muestras se transportaron en una caja térmica manteniendo el frío para su posterior estudio y análisis en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

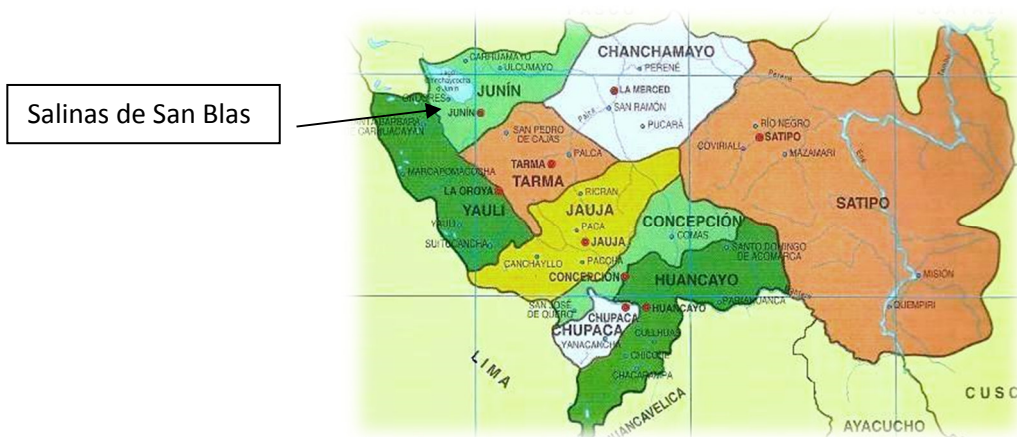


Figura N° 3. Ubicación de las Salinas de San Blas en el mapa del departamento de Junín, Perú ⁽¹⁰¹⁾.

3.2.- Reactivación de los aislados

Para los ensayos en general se preparó una solución stock de agua de sales (SW) 30 % descrita en el manual Halohandbook (anexo N° 1), la cual se recomienda utilizar para el aislamiento y cultivo de microorganismos halófilos ⁽¹⁰²⁾. A partir de esta solución stock SW 30 % se prepararon los diferentes medios de cultivo que se usaron en el estudio a la concentración final de SW 5 %.

Para reactivar 34 aislados bacterianos de las Salinas de San Blas se empleó medio líquido SW 5 % suplementado con 0,5 % de extracto de levadura. Para estabilizar los aislados se realizaron tres pasajes consecutivos alternando medios líquidos y sólidos SW 5 %.

3.3.- Selección de bacterias amilolíticas

Para la selección de las bacterias con actividad amilolítica se cultivaron las colonias reactivadas en medio agar almidón (DIFCO) suplementado con SW 5 % y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Luego, se evidenció la actividad amilolítica empleando el revelador lugol SR. Los halos transparentes alrededor de las colonias indicaron la producción de amilasas ⁽⁸²⁾.

Los aislados amilolíticos fueron conservados en agar SW 5 %, suplementado con 0,2 % de extracto de levadura y 5 % de glicerol a 4 °C.

3.4.- Caracterización fenotípica de las bacterias amilolíticas

3.4.1.- Identificación macroscópica y microscópica

Las bacterias se cultivaron en agar SW 5 % suplementado con extracto de levadura 0,5 % y se incubaron a 37 °C durante 48 h para observar las características de forma, tamaño, color y consistencia final de las colonias.

Para la observación microscópica se tomaron colonias de cultivos frescos de 24 h. Se realizó la Tinción Gram y se observó al microscopio a un aumento de 100 X utilizando aceite de inmersión para tal fin.

3.4.2.- Pruebas fisiológicas

Para las diferentes pruebas se utilizó el medio líquido SW 5 % suplementado con extracto de levadura 0,5 %.

- Tolerancia salina

Se evaluó el crecimiento de las bacterias en caldos a las concentraciones salinas de 0, 5, 10, 15 y 20 %.

- pH

Se evaluó el crecimiento de los aislados en caldos a pH 5, 6, 7, 8 y 9, empleando para ello buffers apropiados para cada valor de pH. Buffers acetato, fosfato y glicina.

3.4.3.- Pruebas bioquímicas

Hidrólisis de caseína

La caseína es una proteína presente en la leche y en algunos de sus derivados. Para esta prueba se sembraron los aislados en agar SW 5 % suplementado con extracto de levadura 0,2 % y nutriente skim milk 1 % (OXOID) y se incubaron a 37 °C durante

48 h. Se evidencia la hidrólisis de la caseína mediante la formación de halos translúcidos alrededor de las colonias ⁽¹⁰³⁾. Las bacterias que son capaces de producir enzimas proteolíticas son las que degradan la caseína en aminoácidos los cuales son transportados al interior de las células para poder ser metabolizados. Debido a que el aspecto final del medio es turbio u opaco, se puede evidenciar la hidrólisis de la caseína mediante la formación de halos translúcidos alrededor de las colonias que produzcan estas proteasas.

Hidrólisis de celulosa

Las bacterias se cultivaron en placas de agar SW 5 % suplementado con carboximetilcelulosa (CMC) 1 % (Merck) y extracto de levadura 0,2 % a 37 °C por 48 h. Luego de transcurrido este tiempo se revelaron las placas con S.R. rojo de Congo 0,1 % tornándose todo el medio color rojo. Se reportó la actividad celulolítica positiva por la formación de halos claros alrededor de las colonias. Debido a la fuerte interacción que muestra el colorante Rojo de Congo con las moléculas de β -glucopiranosas con enlaces β -1,4-O-glucosídicos, que conforman la estructura de la celulosa ⁽¹⁰⁴⁾.

Producción de DNasa

Los aislados fueron cultivados en agar DNA (Oxoid) suplementado con SW 5 % a 37 °C por 48 h. Luego del cual se añadió HCl 0,1 N. La formación de halos translúcidos fue reportada como actividad positiva ⁽⁸²⁾.

Hidrólisis de tween 80

Se evaluó cultivando los aislados en medio agar SW 5% suplementado con extracto de levadura 0,2 % y tween 80 1 %, se incubó a 37 °C por 48 h. La presencia de un precipitado alrededor de las colonias indicó hidrólisis ⁽¹⁰⁵⁾. Este precipitado se forma debido a la formación de sales de calcio gracias a los ácidos grasos liberados producto de la lipólisis.

Hidrólisis de tributirina

Para evaluar la actividad lipolítica se empleó el agar SW 5 % suplementado con extracto de levadura 0,2 % y se añadió la emulsión previamente esterilizada formada por la tributirina y tritón 100, a la concentración final de 1 % y 0,1 %,

respectivamente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. se evidenció la actividad lipolítica positiva mediante la formación de halos de hidrólisis translúcidos alrededor de las colonias.

3.5.- Caracterización molecular

3.5.1.- Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó aplicando el método de solventes según lo descrito por Chávez-Hidalgo ⁽¹⁰⁶⁾ con las siguientes modificaciones para bacterias:

Lisis

Se tomaron 2 mL de un cultivo fresco, aproximadamente de 24 h, y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, los precipitados celulares se lavaron dos veces con una solución de PBS 1X conteniendo NaCl 3 % y se centrifugó a 10 000 rpm por cinco minutos. A los precipitados celulares se les añadieron 600 µL de TSE 1X, 60 µL de SDS 10 % (Amresco) y 10 µL de proteinasa K (Ambion), y se incubaron a 56 °C por dos horas.

Purificación

El ADN extraído se purificó con 600 µL de la mezcla fenol/clorformo 1:1 (Merck), se homogenizó y centrifugó a 10 000 rpm por 5 min. Al sobrenadante se le añadieron 600 µL de cloroformo, se homogenizó y centrifugó a 10 000 rpm por 5 min. Después se separó la fase acuosa que contiene el ADN.

Precipitación

A la fase acuosa se le adicionaron 100 µL de acetato de sodio 3 M (Merck) y 600 µL de etanol absoluto (Merck), y se guardó a - 20 °C por 2 h. Luego de ese periodo, se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min, el precipitado se lavó con 500 µL de etanol al 70 % y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min, este paso se realizó dos veces. El ADN extraído se resuspendió con 50 µL de tampón TE.

Finalmente, se verificó la extracción y pureza del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % con buffer TAE 1X. El ADN se tiñó con bromuro de etidio y se observó en transiluminador UV Ultra - Violet Products.

3.5.2.- Amplificación de los genes ribosómicos 16S y análisis de los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S (ARDRA)

Se amplificaron los genes ribosómicos 16S usando cebadores universales específicos para bacterias. Las condiciones de reacción para la PCR fueron las siguientes:

Volumen de reacción: Se empleó un volumen final de reacción 25 µL, la mezcla de reacción contenía KCl 50 mM, Tris/ HCl 10 mM, tritón X-100 0,1 % (v/v), MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 pmoles de cada cebador, *Taq* ADN- polimerasa 1,5 U (Invitrogen) y 50 ng de ADN medido mediante espectrofotometría UV a 260 nm.

Cebadores específicos: Se utilizaron cebadores específicos para el dominio *Eubacteria*.

16SBF 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'

16SBR 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'

Condiciones de amplificación: Se empleó un termociclador (Perkin Elmer 2400) donde se realizó una primera desnaturalización a 94 °C por 4 min y luego 35 ciclos con las siguientes etapas:

Desnaturalización: 94 °C por 45 s

Hidridación: 55 °C por 1 min

Extensión: 72 °C por 45 s

Extensión final de 72 °C por 7 min

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 1X, se utilizó como marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb (Invitrogen) el cual contiene fragmentos de ADN entre 0,5 a 12 kb.

Se añadieron 5 U de enzima de restricción a cada μg producto amplificado, las cuales fueron *Hae III*, *BstU I*, *Hinf I* y *Cfo I* (Fermentas), las condiciones de reacción fueron realizadas según las especificaciones del fabricante, a excepción del tiempo de incubación que fue de 12 h a 37 °C.

Luego de este periodo los productos de la digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 3 % empleando TBE 0,5 X como tampón. La electroforesis se realizó durante 4 h, primero a 80 voltios por 1 h y luego a 60 voltios por 3 h. Se utilizó como marcador de peso molecular DNA ϕX174 cortado con *Hae III*. Este marcador presenta 11 fragmentos de ADN desde 72 a 1353 pb (anexo N° 3). Finalmente, los geles de agarosa se colorearon con bromuro de etidio 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se observaron las bandas obtenidas (fragmentos de ADN) a través del transiluminador UV (UV Ultra - Violet Products).

El análisis de los perfiles de restricción de ADN ribosómico amplificado por PCR (ARDRA) se realizó en los 14 aislados amilolíticos. Para el análisis de los perfiles de restricción se usó como herramienta el coeficiente de concordancia simple y el análisis de agrupamiento de pares por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA). De acuerdo a estos análisis, se escogió un aislado representativo de cada perfil para el secuenciamiento de los genes ribosómicos 16S.

Para el UPGMA, previamente se diseñó una matriz de datos bidimensional en una hoja de cálculo del programa Excel 2010, colocando los tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos (bandas) en columnas y la denominación de los aislados en filas. Se asignó "1" en caso de presencia, y "0" en caso de ausencia de cada banda por aislado (anexo N° 6). Sobre la matriz obtenida se aplicó el análisis de agrupamiento antes descrito y se visualizó en forma de dendrograma (figura N° 12). Se determinó el tamaño de las bandas obtenidas mediante comparación con el marcador de peso molecular DNA ϕX174 cortado con *Hae III*.

3.5.3.- Secuenciación de los genes ribosómicos 16S

Para el secuenciamiento de los genes ribosómicos 16S, se llevó a cabo la amplificación de los genes ribosómicos 16S mediante PCR a partir del ADN extraído anteriormente. La secuenciación se llevó a cabo en el analizador ADN ABI prism 3100, del Instituto de Medicina Tropical “Alexander Von Humbolt” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.5.4.- Análisis bioinformático

Para el análisis de secuencias se utilizaron sistemáticamente los siguientes programas bioinformáticos:

- BLASTn 2.2.28
- CLUSTALX 2.1
- MEGA 5

Las secuencias fueron analizadas con el programa BLASTn para determinar el grado de similitud entre las bacterias en estudio y aquellas cuyas secuencias de los genes ribosómicos 16S están depositadas en el Banco de Genes (GeneBank) del NCBI. En base a estos análisis, se seleccionaron secuencias de especies bien identificadas y clasificadas con mayor porcentaje de similitud (en todos los casos mayor a 95 %) y con los más altos Score Total de miembros de los géneros *Halomonas* y *Bacillus*.

Las especies tipo extraídas del GeneBank del NCBI y seleccionadas para el análisis bioinformático se señalan a continuación junto con sus números de acceso entre paréntesis: *Halomonas venusta* DSM4743 (NR_042069), *Halomonas meridiana* DSM5425 (NR_042066), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* DSM10 (NR_027552), *Bacillus vallismortis* DSM11031 (NR_024696), *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC15535 (NR_041455), *Halomonas halophila* CCM3662 (NR_042697), *Bacillus licheniformis* ATCC14580 (NR_074923), *Bacillus flexus* IFO15715 (NR_024691), *Bacillus megaterium* IAM13418 (NR_043401) y *Bacillus firmus* IAM12464 (NR_025842).

Con el conjunto de secuencias se procedió a realizar el alineamiento múltiple con el programa bioinformático CLUSTALX 2.1. Además con este programa se editó las secuencias realizando cortes para obtener regiones uniformes.

La inferencia filogenética de los aislados se realizó utilizando el programa informático MEGA 5. Para la construcción del árbol filogenético se utilizaron los métodos de Neighbour-Joining (NJ) y Minimum Evolution (ME). Para evaluar el soporte de las relaciones filogenéticas, se utilizó el análisis de bootstrap de 1000 replicaciones y a Kimura-2-parámetros, como modelo de sustitución nucleotídica. Se usó como grupo externo a *Halobacterium salinarum* (NR_025555).

IV.- RESULTADOS

4.1.- Aislados bacterianos

Las 34 bacterias aisladas de las Salinas de San Blas presentaban colonias con características diferentes de color, forma, tamaño y consistencia (figura N° 4). Se conservaron en medio de cultivo agar SW 5 % suplementado con extracto de levadura 0,2 % y glicerol 2 % a 4 °C.

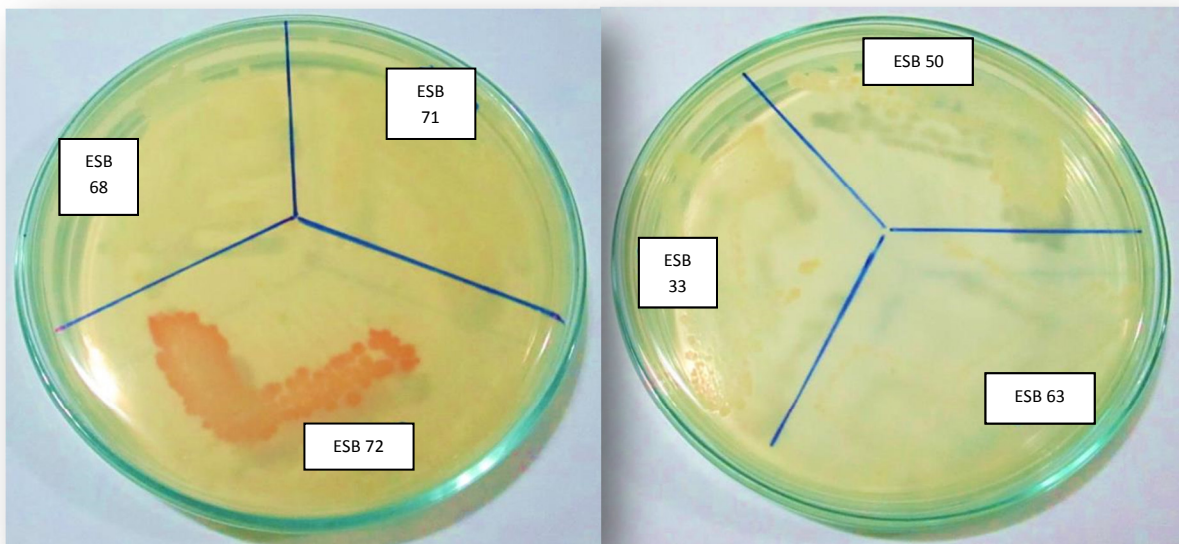


Figura N° 4. Aislados bacterianos de las Salinas de San Blas en agar agua de sales al 5 % a 48 h de incubación.

4.2.- Selección de bacterias amilolíticas

De los 34 aislados, 14 (41, 2 %) presentaron actividad amilolítica. Los aislados ESB 30, ESB 34 y ESB 53 (21, 4 % de los aislados) mostraron halos de hidrólisis mayores a 2 cm; el 35, 7 % de los aislados (5/14), entre 1 y 2 cm, mientras que el 42, 9 % (6/14) exhibieron halos menores a 1 cm (figuras N° 5 y 6).

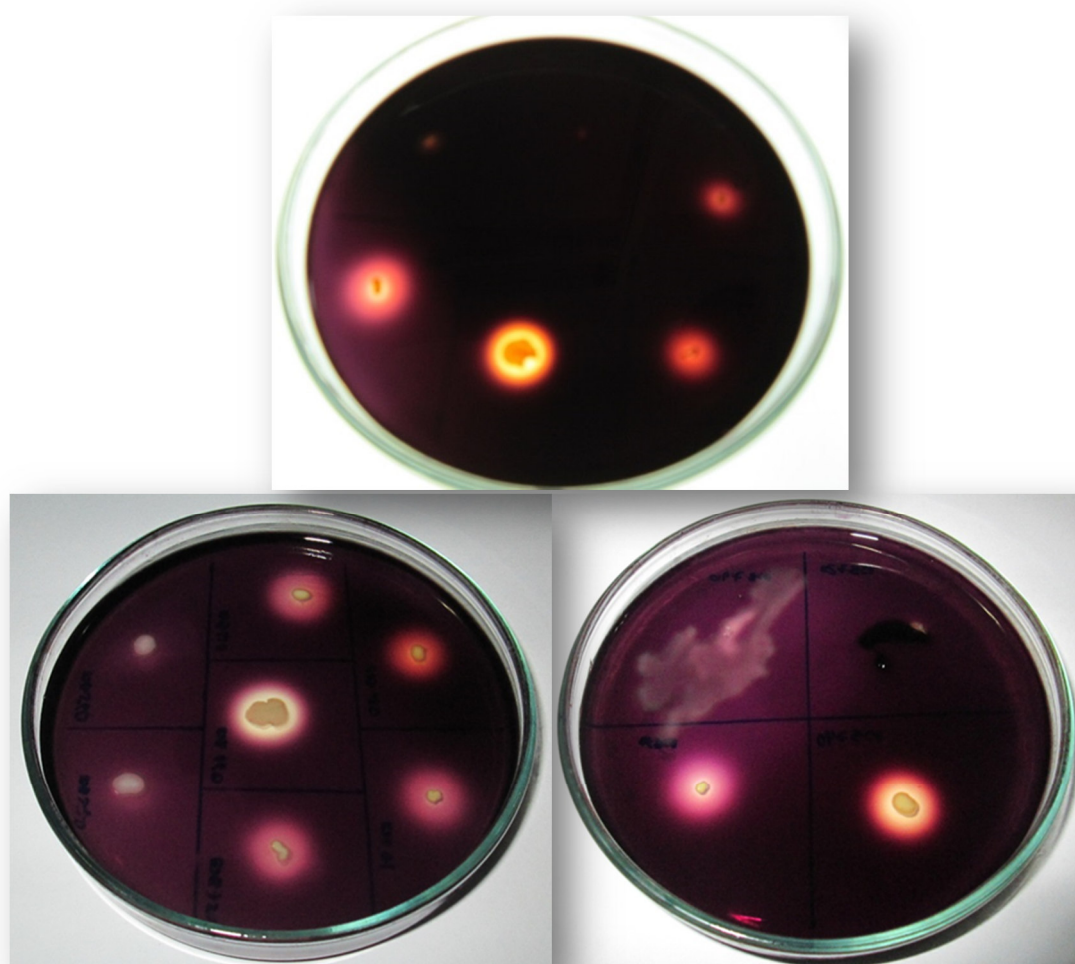


Figura N° 5. Halos de hidrólisis en agar almidón de las bacterias aisladas de las Salinas de San Blas.

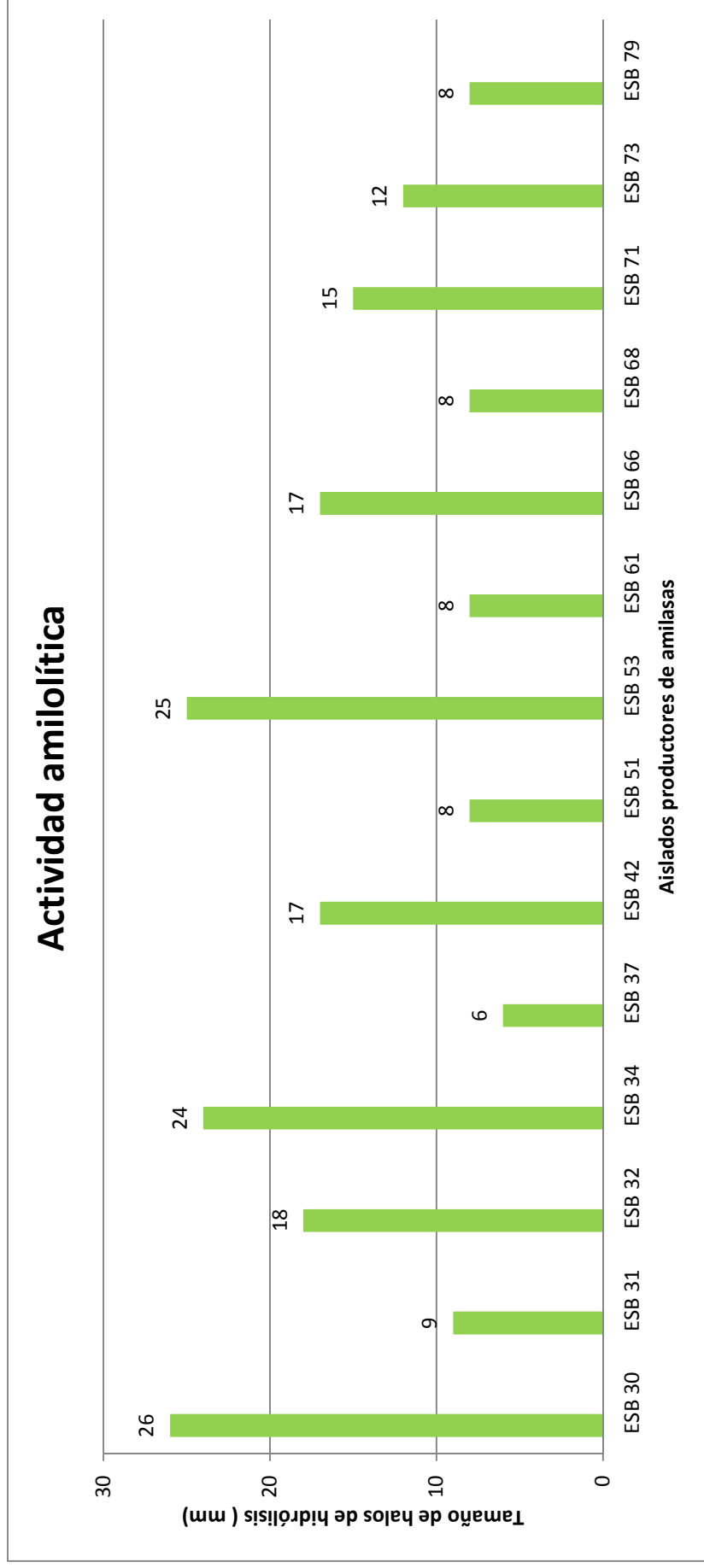


Figura N° 6. Bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas según tamaño de halo de hidrólisis.

4.3.- Caracterización fenotípica de las bacterias amilolíticas

4.3.1.- Identificación macroscópica y microscópica

De las 14 cepas de bacterias amilolíticas se observó que once aislados fueron bacilos Gram-positivos y tres bacilos Gram-negativos. Las características morfológicas se describen en la tabla N° 5.

4.3.2.- Pruebas fisiológicas

Tolerancia salina

Al realizar la prueba de crecimiento a distintas concentraciones de sales, se observó que el 35, 7 % (5/14) de los aislados fueron capaces de crecer en el intervalo de 0 a 15 % de sales. Se encontró que 21,4 % (3/14) de los aislados crecieron hasta una concentración salina de 20 %. Además, se determinó que el 57, 1 % (8/14) de las bacterias fueron halotolerantes (figuras N° 7 y 8).

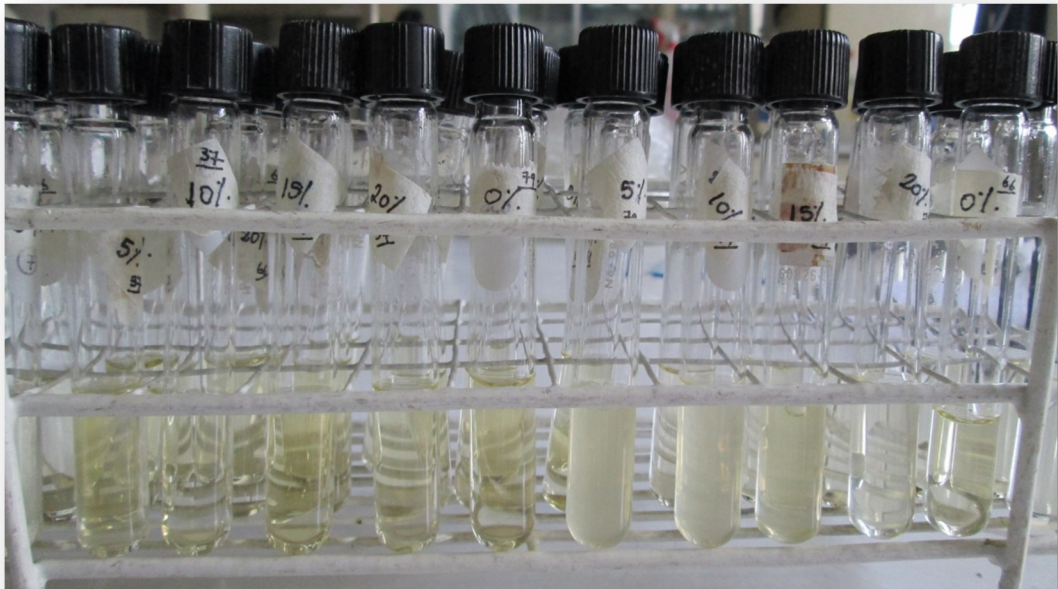


Figura N° 7. Crecimiento de las cepas bacterianas amilolíticas a diversas concentraciones de sal.

Prueba de pH

Los aislados crecieron en un amplio rango de pH, en su mayoría entre 5 a 9.

4.3.3.- Pruebas bioquímicas

La hidrólisis de uno y otro sustrato fue variada, así ninguna cepa hidrolizó tween 80 ni carboximetilcelulosa. Los aislados ESB 30 y ESB 71 hidrolizaron tributirina. El 50 % de los aislados fueron DNasa positivos y el 71, 4 % hidrolizó caseína (tabla N° 5).

Tabla N° 5. Características fenotípicas de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas.

Características	Aislados													
	ESB 30	ESB 31	ESB 32	ESB 34	ESB 37	ESB 42	ESB 51	ESB 53	ESB 61	ESB 66	ESB 68	ESB 71	ESB 73	ESB 79
Morfología celular	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Tinción Gram	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Color de la colonia	Crema claro	Crema	Amarillo ténue	Crema oscuro	Crema	Crema	Anaranjado	Crema amarillo	Crema	Crema claro	Crema claro	Crema amarillo	Amarillo ténue	Amarillo ténue
Forma de la colonia	Redonda	Redonda	Amorfa	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Amorfa	Redonda	Redonda	Redonda	Amorfa
Aspecto de la colonia	Pequeña	Mediana, mucosa	Mediana, mucosa	Pequeña	Plana, sin borde definido	Pequeña	Mediana	Plana, con halo alrededor	Diminuta, sin borde definido	Convexa, brillante	Mediana, plana	Diminuta, con halo alrededor	Pequeña, plana	Mediana, con halo alrededor
Rango de sales (% p/v)	5-15	5-20	5-20	0-15	0-10	0-15	5-15	0-15	0-15	0-10	5-10	0-15	0-10	5-20
Rango de pH	5-9	5-9	5-9	5-9	5-9	5-8	5-9	5-9	5-9	5-9	5-9	5-9	5-9	5-9
Hidrólisis de:														
Tributirina	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caseína	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
DNasa	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
CMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

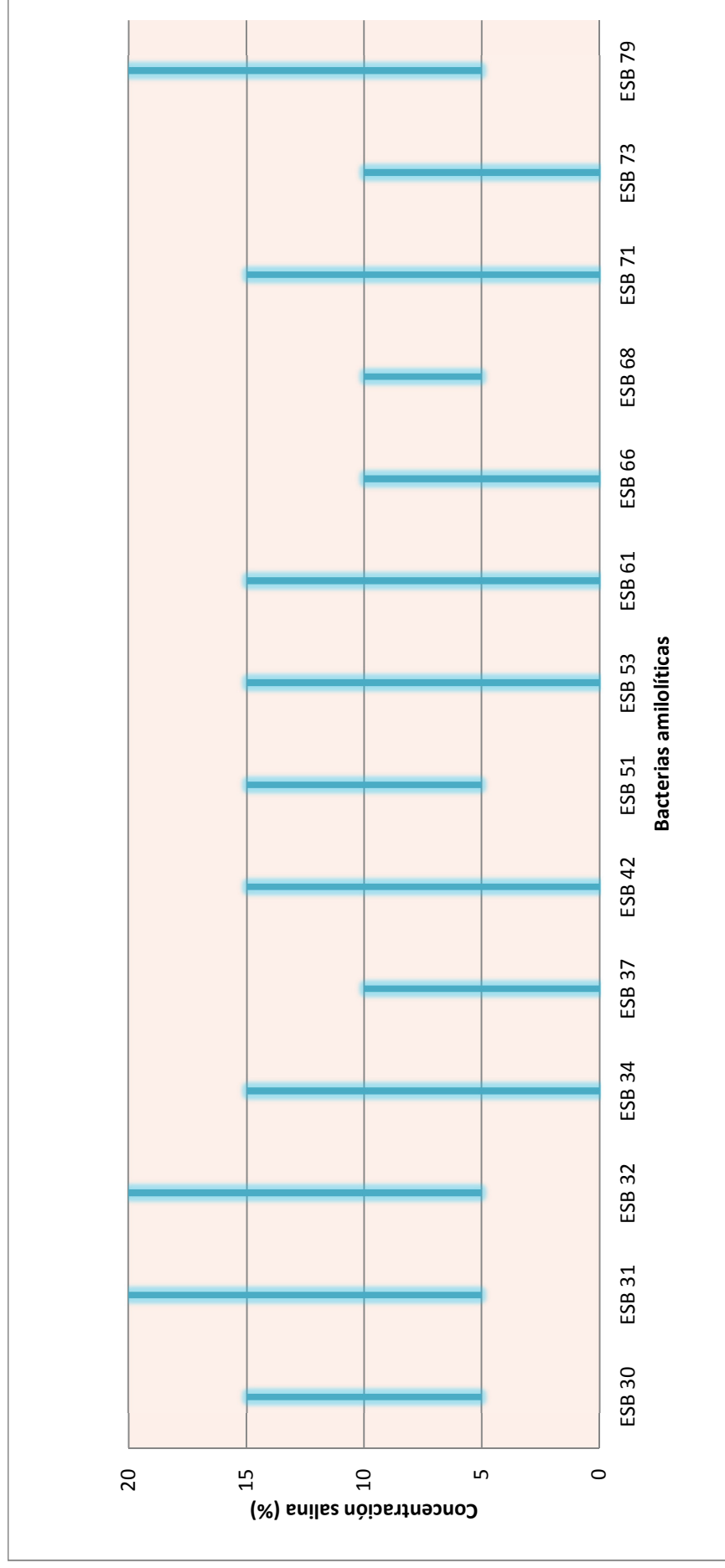


Figura N° 8. Tolerancia salina de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas.

4.4.- Caracterización molecular de las bacterias con actividad amilolítica

A las 14 bacterias amilolíticas inicialmente se les extrajo y purificó el ADN genómico para el correspondiente estudio.

4.4.1.- Amplificación de los genes ribosómicos 16S

En la amplificación de los genes ribosómicos 16S utilizando cebadores específicos para el dominio *Eubacteria* se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 1400 pb. En la figura N° 9 se observa que todos los productos de PCR presentan la misma intensidad indicando que la cantidad del ADN molde y reactivos es óptima.

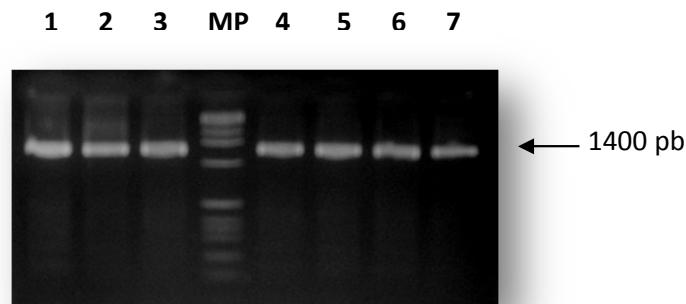


Figura N° 9. Genes ribosómicos 16S amplificados por PCR de las bacterias amilolíticas en gel de agarosa al 1%. MP, Marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb.

4.4.2.- Análisis de los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S (ARDRA)

Los productos amplificados de los catorce aislados seleccionados se cortaron con las enzimas *Cfo I*, *BstU I*, *Hae III* y *Hinf I*. En las figuras N° 10 y 11 se observan los fragmentos de ADN obtenidos de diversos tamaños, los cuales agrupan a los

aislados en siete grupos genómicos de perfiles de restricción distintos. Con *Cfo I*, se obtuvieron fragmentos entre 155 y 1306 pb (figura N° 10); con *BstU I*, entre 61 y 1335 pb; con *Hae III*, entre 118 y 603 pb (figura N° 11) y con *Hinf I*, entre 120 y 1353. A continuación se muestran los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S obtenidos con la digestión enzimática:

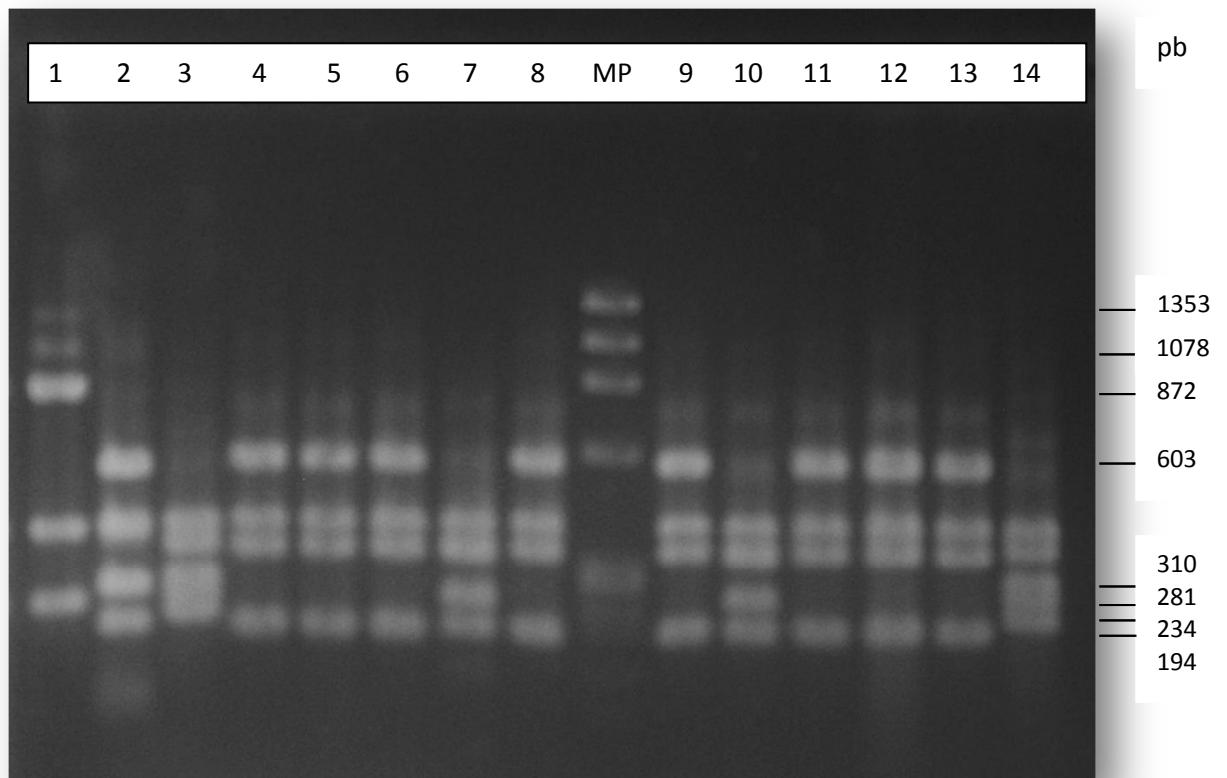


Figura N° 10. Gel de agarosa al 3% mostrando ADNr 16S amplificado de las bacterias amilolíticas aisladas de las salinas de San Blas cortado con *Cfo I*. Línea (cepa): 1, ESB 30; 2, ESB 31; 3, ESB 32; 4, ESB 34; 5, ESB 37; 6, ESB 42; 7, ESB 51; 8, ESB 53; MP, Marcador de peso molecular DNA ϕ X174; 9, ESB 61; 10, ESB 66; 11, ESB 68; 12, ESB 71; 13, ESB 73 y 14, ESB 79.

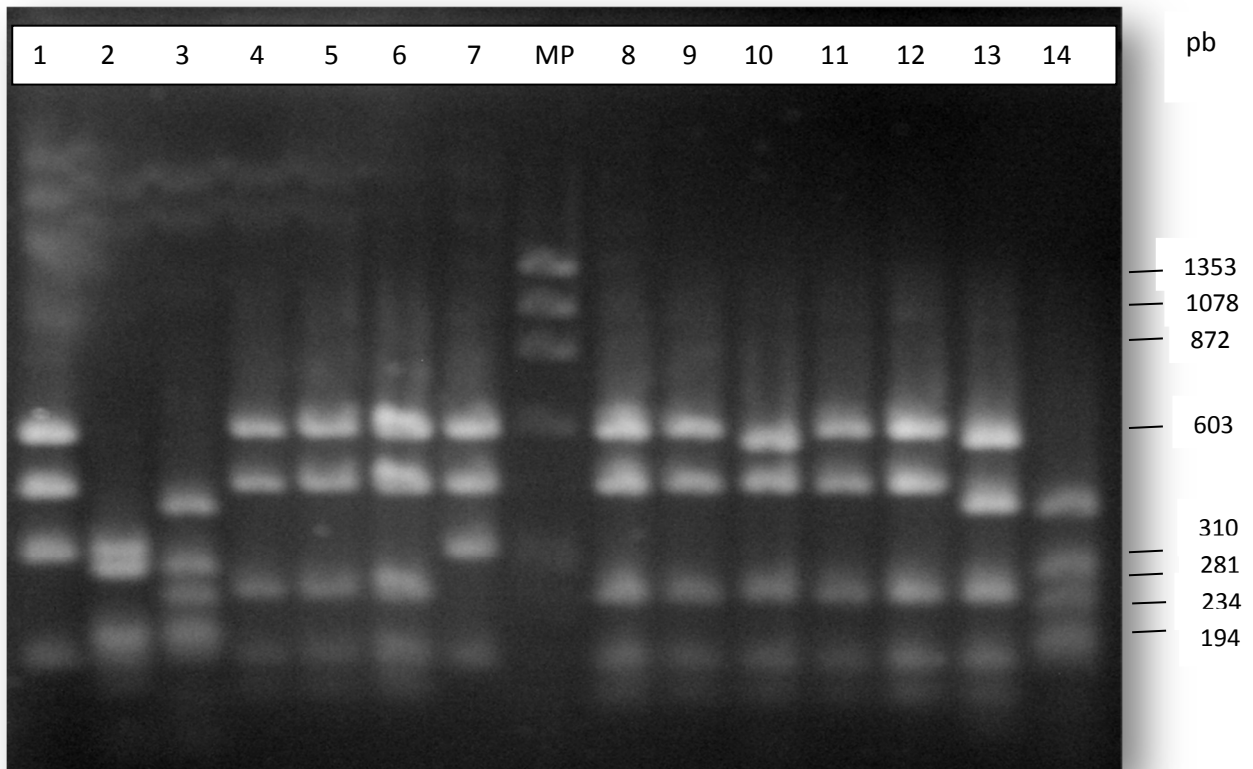


Figura N° 11. Gel de agarosa al 3% mostrando ADNr 16S amplificado de las bacterias amilolíticas aisladas de las salinas de San Blas cortado con *Hae III*. Línea (cepa): 1, ESB 30; 2, ESB 31; 3, ESB 32; 4, ESB 34; 5, ESB 37; 6, ESB 42; 7, ESB 51; MP, Marcador de peso molecular DNA ϕ X174; 8, ESB 53; 9, ESB 61; 10, ESB 66; 11, ESB 68; 12, ESB 71; 13, ESB 73 y 14, ESB 79.

En la figura N° 12 se observa el dendrograma de similitud obtenido a partir de la matriz de datos elaborada con los perfiles de restricción ARDRA. Se observa en el dendrograma que los catorce aislados se distribuyen en dos grupos denominados A y B. En el grupo A, se encuentra el 78,6 % de las bacterias amilolíticas y es un grupo heterogéneo con tres subgrupos. En el grupo B, se encuentra el 21,4 % de los aislados (ESB 31, ESB 32 y ESB 79). Los aislados 53 y 61 presentan entre ellos un nivel de similitud de 100 %, al igual que entre si los aislados ESB 42, ESB 34 y ESB 37. Los aislados ESB 51 y ESB 66 se encuentran agrupados en el mismo brazo. De igual forma los aislados ESB 73, ESB 68 y ESB 71, se encuentran en el mismo brazo.

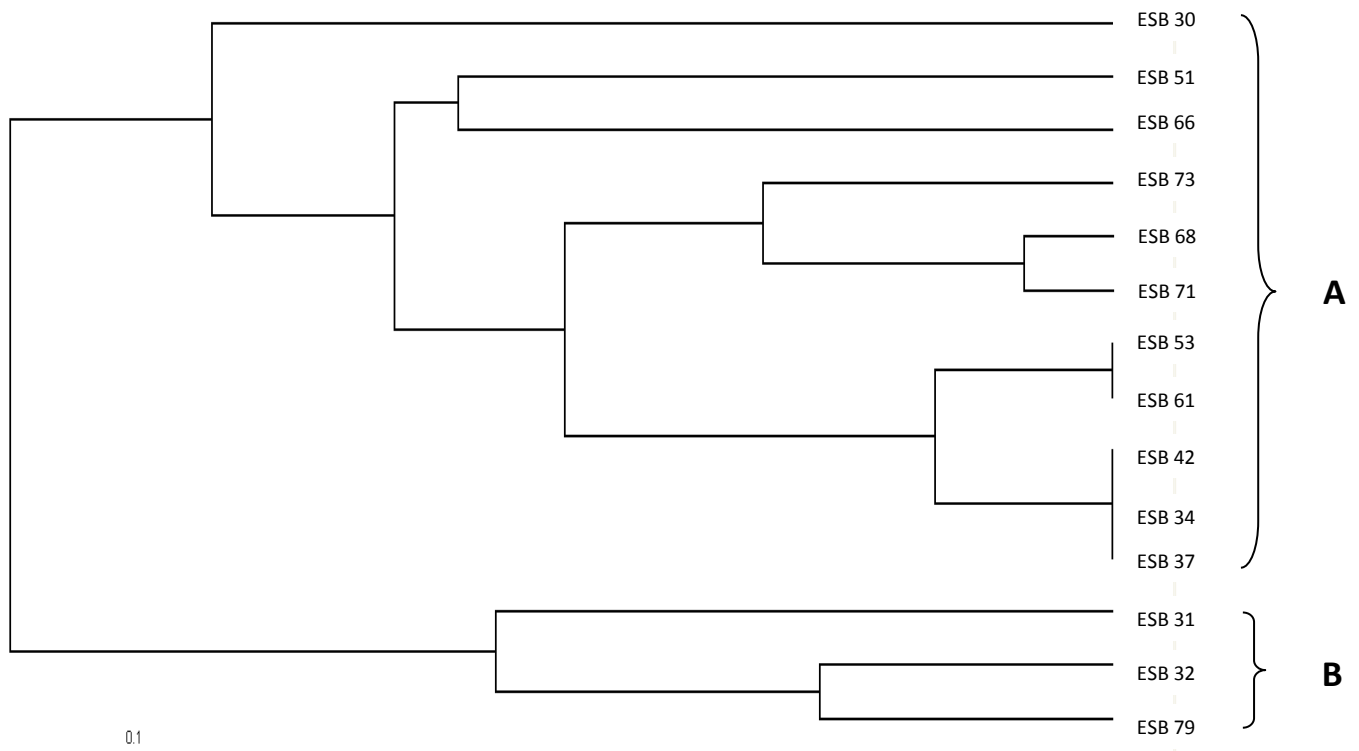


Figura N° 12. Dendrograma de similitud mostrando las relaciones entre las bacterias amilolíticas aisladas de las salinas de San Blas en base a los perfiles de restricción obtenidos. El método usado fue el UPGMA. A y B indican las agrupaciones principales.

4.4.3.- Secuenciación y análisis bioinformático

Los aislados seleccionados de las pruebas fenotípicas y los perfiles de restricción obtenidos fueron: ESB 31, ESB 34, ESB 51, ESB 61, ESB 66, ESB 79, ESB 30 y ESB 32, sin embargo por problemas técnicos del servicio de secuenciación sólo se recibieron siete secuencias del sentido FORWARD.

Las secuencias de los aislados comparadas utilizando el BLASTn con las secuencias de los genes ribosómicos 16S de bacterias depositadas en el GeneBank del NCBI presentaron alto grado de similitud con especies del género *Halomonas* y *Bacillus*, se escogieron secuencias con igual o más de 98 % de similitud. El alineamiento se realizó con un total de 29 secuencias (7 secuencias propias y 22 secuencias de

referencia tomadas del GeneBank). Luego se realizaron cortes sobre las secuencias nucleotídicas desde la posición 87 hasta 1093, quedando del tamaño de 1006 pb.

El árbol filogenético construido muestra que los siete aislados se encuentran agrupados en dos clados o ramas filogenéticas principales (figura N° 13). El primer clado está conformado por los aislados ESB 32, ESB 79 y ESB 31; y corresponde al género *Halomonas*, así mismo la relación filogenética de estos tres aislados se encuentra apoyada por un valor de bootstrap de 100. El aislado ESB 31 se encuentra cercanamente relacionado con *Halomonas subterranea* ZG 16 y *Halomonas janggokensis* M24, con un nivel de similitud de 98 % en ambos casos, relación apoyada con un valor de bootstrap de 99. Los aislados ESB 32 y ESB 79 se encuentran ubicados en la misma rama filogenética, cuyo valor de bootstrap es de 100; además ambos aislados están cercanamente relacionados con *Halomonas denitrificans* M29 con un porcentaje de similitud de 98 % en ambos casos, y un valor de bootstrap de 78.

En el segundo clado principal se encuentran los aislados: ESB 30, ESB 51, ESB 66 y ESB 61, y corresponde al género *Bacillus*, relación filogenética apoyada por un valor de bootstrap de 100. La secuencia del aislado ESB 30 se encuentra estrechamente relacionada a *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* DSM10 con un porcentaje de similitud de 98 %, apoyado con un valor de bootstrap de 69/67 con NJ/ME. El aislado ESB 51 tiene un porcentaje de similitud de 83 % con *Bacillus vietnamensis* 15 - 1, y 81 % con *Bacillus aquimaris* TF - 12, apoyado con un valor de bootstrap de 92/90 con NJ/ME en ambos casos. Cabe mencionar que en el caso de esta secuencia específica, su calidad no fue óptima ya que presentó varias bases como "N", por lo cual podría no ser confiable este resultado en particular. La secuencia del aislado ESB 66 tiene un porcentaje de similitud de 98 % con *Bacillus firmus* IAM 12464, relación filogenética apoyada, sin embargo, con un valor de bootstrap de 47/46 con NJ/ME. El aislado ESB 61 se encuentra compartiendo la misma rama filogenética con *Bacillus flexus* IFO 15715 con un nivel de similitud de 98 %, robustecido con un valor de bootstrap de 100, de igual forma muestra 98 % de similitud con *Bacillus megaterium* IAM 13418, con un valor de bootstrap de 100.

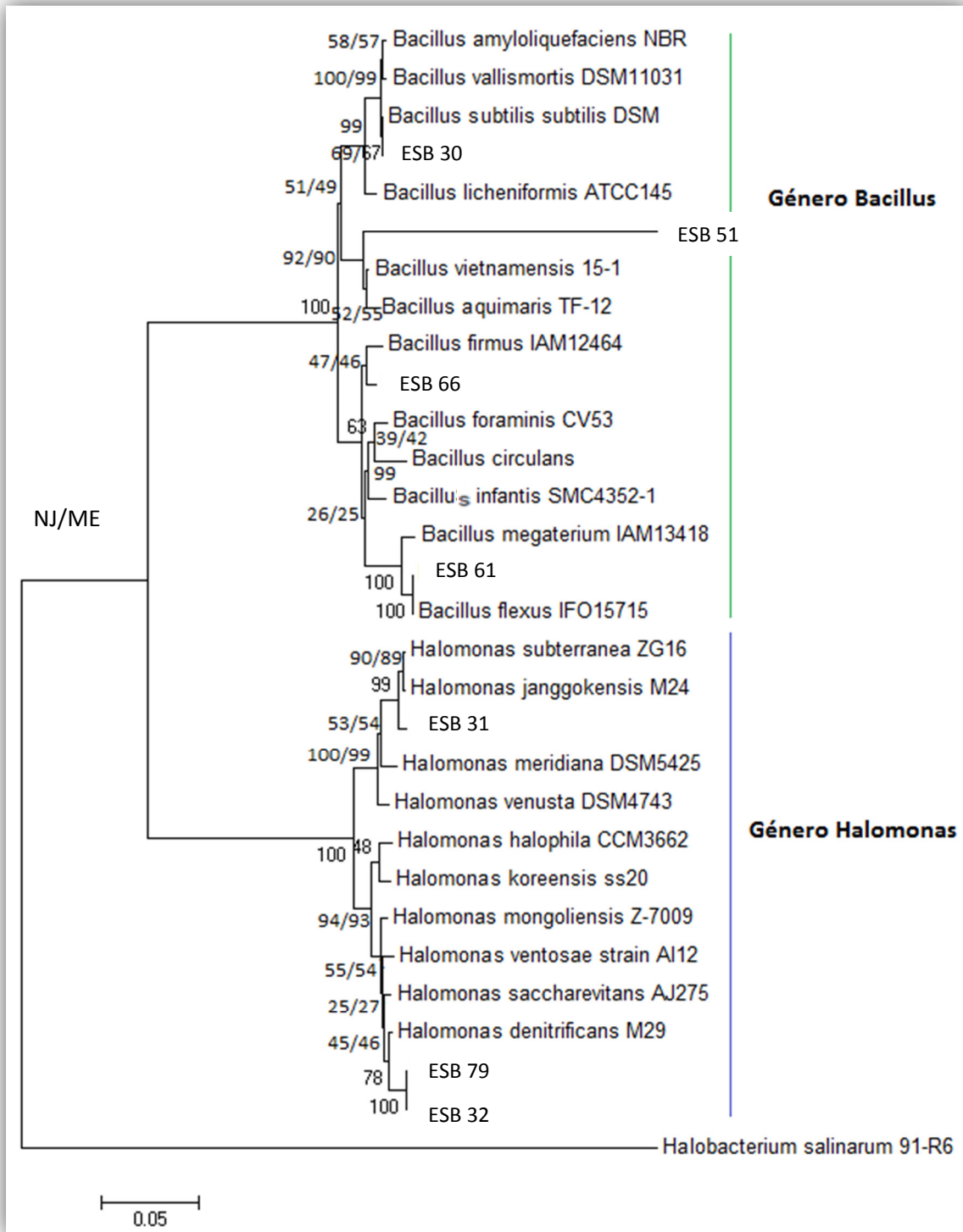


Figura N° 13. Árbol filogenético elaborado con los métodos Neighbor-Joining y Minimum Evolution en base a las secuencias nucleotídicas parciales del ADN ribosómico 16S de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas. Bar de 0,05 sustituciones de nucleótidos.

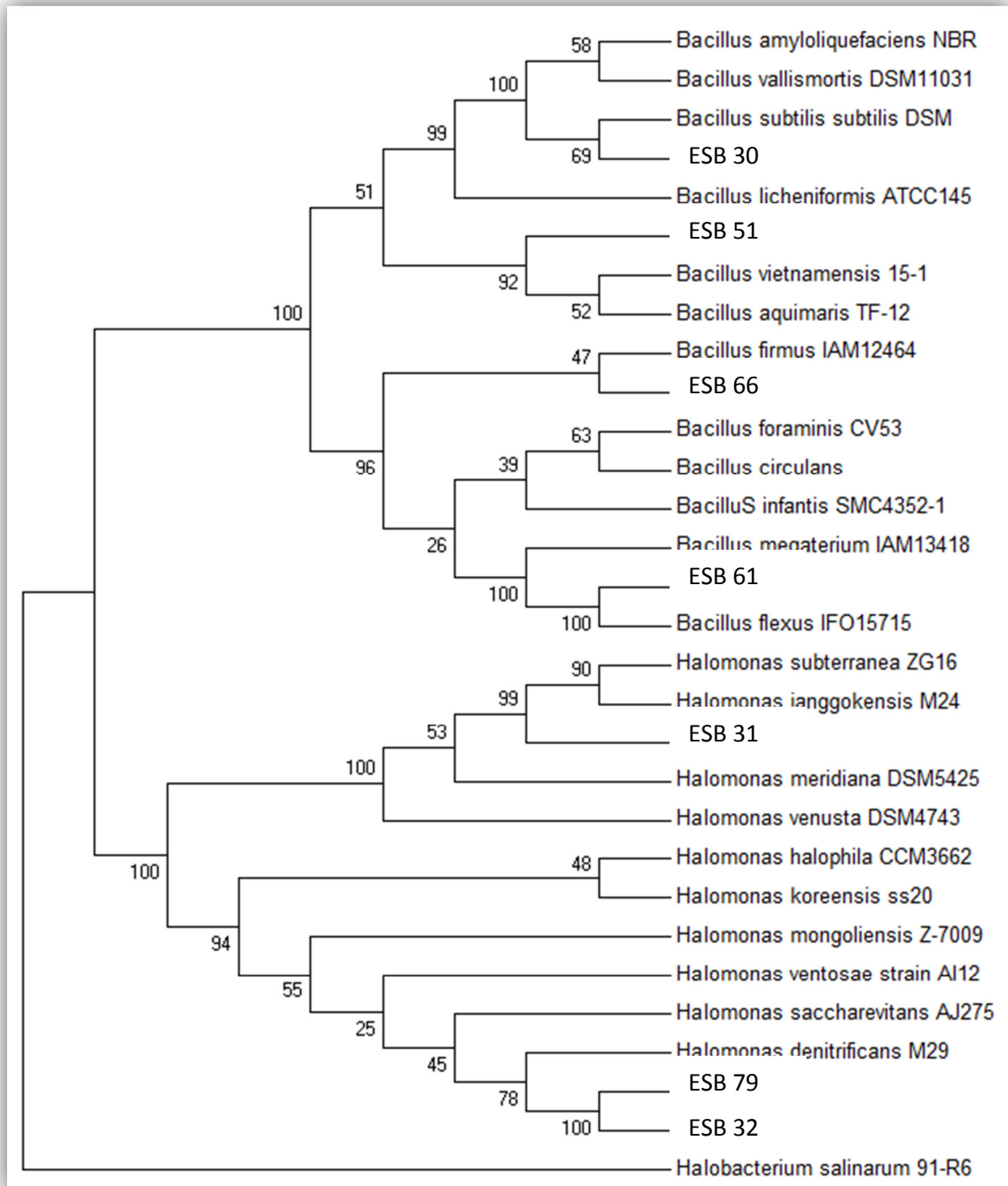


Figura N° 14. Árbol filogenético elaborado con el método Neighbor-Joining en base a las secuencias nucleotídicas parciales del ADN ribosómico 16S de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas. Los valores de bootstrap son basados en 1000 replicaciones.

V.- DISCUSIÓN

Aunque las bacterias provenientes de ambientes salinos tienen un gran potencial biotecnológico debido a que sus enzimas tienen la capacidad de ser activas en condiciones extremas bajo las cuales sus contrapartes mesófilos no presentan la misma actividad, pocos son los estudios acerca de la producción de enzimas extracelulares provenientes de estos microorganismos. Por ello, el objetivo de este estudio ha sido el aislamiento, caracterización fenotípica y molecular de bacterias productoras de amilasas provenientes de las Salinas de San Blas en el departamento de Junín de Perú.

Las Salinas de San Blas se ubican a 4100 msnm en el distrito de Ondores, a 5 Km del lago Chinchaycocha, provincia de Junín, departamento de Junín en Perú. Las Salinas de San Blas se encuentran en la región natural Puna y como tal, las condiciones ambientales son extremas. La temperatura promedio durante el día es de 6 °C, con fuerte irradiación solar en el día y un clima muy frío durante la noche, además de una elevada concentración de sales. Se reporta que este medioambiente no ha cambiado mucho en los últimos 3000 años ⁽¹⁰⁷⁾. Estas características parecen adversas para el desarrollo de la vida, sin embargo se ha descrito que a pesar de estas condiciones, diversos microorganismos logran adaptarse a estas condiciones extremas, los cuales se denominan extremófilos ^(19, 108, 109).

Por el gran potencial que representan los ambientes extremos para el desarrollo de diversos microorganismos halófilos es que se estudiaron muestras de un ambiente salino en altitud, además por ser un nicho ecológico peruano se busca la valoración de la riqueza biológica ⁽²³⁾.

Para brindar las condiciones que permitieran el adecuado desarrollo de las bacterias, en la preparación de los medios, se siguió las recomendaciones dadas en el Halohandbook; se usaron diluciones de la solución stock de Agua de Sales 30 %. Ésta formulación descrita por Rodríguez-Valera y colaboradores contiene sales en aproximadamente la misma proporción que la encontrada en el agua de mar, pero con una concentración final de sales mucho mayor. Para los casos en que no se

usaron medios definidos, se suplementó con extracto de levadura a la concentración de 0,5% ⁽¹⁰²⁾. Dado que el objetivo de este estudio fue seleccionar bacterias de ambientes salinos, en general microorganismos halófilos y halotolerantes, se usaron medios a una concentración final de 5 % de sales, que contenían 3,9 % de NaCl.

El Perú cuenta en su territorio con diversos ambientes hipersalinos, incluyendo salinas naturales y otras artificiales para la producción de sal comercial. Sin embargo, los estudios sobre la diversidad microbiana y el perfil enzimático de estos microorganismos capaces de actuar bajo condiciones extremas son escasos, y por lo tanto hay potencial biotecnológico aún desconocido. En el año 2006, Ghozlan y col realizaron la primera publicación de Egipto acerca de la biodiversidad y capacidad hidrolítica de bacterias halófilas moderadas aisladas de ambientes salinos en Alejandría ⁽⁵⁾. En Perú, Maturrano y col, 2006 reportaron un estudio acerca de la diversidad microbiológica de las Salinas de Maras, ubicadas en los Andes peruanos, en el departamento de Cusco ⁽¹⁰⁾. Fernández-Jerí en el año 2007 aisló 20 bacterias halófilas moderadas productoras de exopolisacáridos de las salinas de Atacocha en Ayacucho, Perú ⁽¹¹⁰⁾.

Las muestras estudiadas de las Salinas de San Blas fueron lodos y no salmueras; diversos estudios señalan que en suelos hay mayor diversidad de microorganismos. En otras investigaciones en Perú también se aislaron bacterias a partir de muestras de suelos de ambientes salinos. Chávez-Hidalgo, 2010 aisló 86 bacterias halófilas moderadas de las Salinas de Pilluana en el departamento de San Martín, 35 de ellas con actividad lipolítica ⁽¹¹¹⁾. Flóres-Fernández, 2010 reportó 14 bacterias halotolerantes con actividad lipolítica ⁽¹⁷⁾. Además, Quesada y col, 1985 en sus estudios en hábitats salinos en Alicante-España, encontraron que la más alta proporción de aislados fueron encontrados en los suelos salinos con 10 a 20 % de concentración de sales, que en las muestras de agua de mar ⁽¹¹²⁾. El suelo es un hábitat inherentemente heterogéneo y se puede esperar una amplia gama de

concentraciones salinas en cualquier parte del suelo y por lo tanto una amplia diversidad microbiana.

Los criterios utilizados para la selección primaria de los aislados fueron las características morfológicas diferentes de sus colonias. Luego, se seleccionaron los aislados productores de amilasas, los cuales fueron capaces de hidrolizar almidón en el medio SW 5 % suplementado con almidón 1 %.

En general los requerimientos nutricionales para el crecimiento de estos microorganismos son sencillos. Estudios han reportado que los medios con bajas concentraciones de nutrientes en muchos casos permiten un aislamiento efectivo de microorganismos de ambientes extremos, debido a que estos se caracterizan por vivir en condiciones limitadas de nutrientes en sus ambientes de origen ^(113, 114). Resultando esta característica muy conveniente para la producción enzimática a nivel comercial.

El 78, 6 % de los aislados fueron identificados como bacilos Gram-positivos y el 21, 4 % como bacilos Gram-negativos. Estudios sobre la diversidad microbiana de los ambientes hipersalinos de hace unas décadas reportan que las bacterias Gram-negativas son predominantes; sin embargo, Babavalian y col, 2013 aislaron e identificaron 61 bacteria Gram-positivas y 22 Gram-negativas halófilas moderadas del lago hipersalino Aran-Bidgol en Irán, identificando los aislados como pertenecientes a los géneros *Halobacillus*, *Thalassobacillus*, *Bacillus*, *Salinicoccus*, *Idiomarina*, *Salicola* y *Halomonas* ⁽⁶⁾. Ello daría a entender que el conocimiento sobre la diversidad microbiana en ambientes salinos es muy amplio, y que los estudios continuos en el tema brindarán nuevos hallazgos para entender la biodiversidad microbiológica en estos ambientes extremos. En estudios de bacterias halófilas moderadas aisladas de ambientes salinos en Alejandría-Egipto, se reportaron 76 bacterias halófilas moderadas Gram-negativas (84, 5 %) y 14 Gram-positivas (15,5 %). Los estudios de caracterización molecular sugirieron que las bacterias Gram-negativas pertenecían a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Chromohalobacter*, *Halomonas* y *Salegentibacter* y un aislado no identificado. Además, propusieron que las bacterias Gram-positivas pertenecían a

los géneros *Halobacillus*, *Salinicoccus*, *Staphylococcus* y *Tetrageococcus* ⁽⁵⁾. Por otra parte, Quesada y col, 1985 tomaron muestras de tres diferentes hábitats salinos cerca de Alicante, España: salinas solares, salinas naturales y del mar, y reportaron un total de 736 aislados, seleccionando 60 bacterias halófilas moderadas para caracterización fenotípica. Todos los aislados fueron bacilos Gram-negativos, y de acuerdo a las características encontradas estos podrían ser asignados a los géneros *Flavobacterium* y *Acinetobacter* ⁽¹¹²⁾.

Se encontró que el 41, 2 % (14/ 34) de los aislados presentó actividad amilolítica, pero el número de aislados iniciales es relativamente pequeño por lo cual no se puede comparar este porcentaje con otros estudios sobre la diversidad microbiana de ambientes hipersalinos. Ventosa y col, 1983 aislaron 38 cepas de bacterias halófilas moderadas los cuales fueron cocos Gram-positivos en su totalidad, el 26, 32 % (10/38) de los aislados fue capaz de hidrolizar almidón. Las cepas se aislaron a partir de muestras de suelo de una salina solar en Alicante-España ⁽¹¹⁵⁾. Babavalian y col, 2013, reportaron 20 bacterias halófilas moderadas productoras de amilasas de 83 aislados del lago hipersalino Aran-Bidgol en Irán ⁽⁶⁾. Cojoc y col, 2009 encontraron que el 15 % de los aislados de una mina de sal subterránea en Rumania mostraron actividad amilolítica a una concentración de NaCl 1 M ⁽¹¹⁶⁾.

De los catorce aislados con actividad amilolítica, se encontró que el tamaño del halo de hidrólisis fue variado. Los aislados que exhibieron mayor actividad amilolítica fueron ESB 30, ESB 34 y ESB 53, los cuales mostraron halos de hidrólisis mayores a 2 cm. El 35, 71 % de los aislados mostraron halos entre 1 y 2 cm, mientras que el 42, 86 % de los aislados mostraron halos menores a 1 cm. Flores y col, 2010 reportaron 32 bacterias halófilas moderadas aisladas de diferentes ambientes salinos del Perú, encontraron que el 75 % (24/32) de los aislados presentó actividad amilolítica. De ellos, el 20, 83 % exhibió halos mayores a 15 mm ⁽⁴⁹⁾.

Se encontró que el 21,4 % (3/14) de los aislados crecieron hasta una concentración salina de 20 %, los cuales fueron bacilos Gram-negativos que crecieron en un amplio

rango de pH, características que concuerdan con las descritas para el género *Halomonas* ^(117, 118). No se detectó ningún aislado que fuera capaz de degradar carboximetilcelulosa ni tween 80. Presumiblemente debido a que estos polímeros no son abundantes o no se encuentran en el hábitat de estos microorganismos. Adicionalmente, la información acerca de la capacidad hidrolítica de estas bacterias podría ser usada para direccionar estrategias para la biorremediación de lugares con altos contenidos de sales. Es interesante que actividades hidrolíticas combinadas han sido detectadas en las cepas ESB 30 y ESB 71, estos aislados podrían ser de interés para aplicaciones industriales. Sánchez-Porro reportó sólo cuatro bacterias con cinco actividades hidrolíticas combinadas (amilasa, DNasa, lipasa, proteasa y pululanasa) de un total de 122 bacterias halófilas moderadas aisladas de salinas localizadas en Almería, Cádiz y Huelva en España ⁽⁸²⁾. Al respecto, Babavalian y col, 2013 encontraron aislados con diversas actividades hidrolíticas combinadas del lago hipersalino Aran-Bigdol en Irán: un aislado productor de ocho enzimas hidrolíticas; tres aislados productores de siete enzimas; siete aislados productores de seis enzimas, y nueve aislados productores de cuatro enzimas de un total de 83 bacterias halófilas moderadas aisladas ⁽⁶⁾. Cojoc y col, 2009 investigaron 16 aislados de una mina de sal en Slanic Prahova-Rumania, de los cuales una cepa evidenció la producción de amilasa, gelatinasa, proteasa, lipasa, celulasa y xilanasas ⁽¹¹⁶⁾.

Según el dendrograma de similitud generado a partir del análisis de los perfiles de restricción de los 14 aislados, estos se encuentran divididos en dos grandes grupos denominados A y B, resultado que coincide con el análisis bioinformático, que identifica a estos dos grupos como correspondientes a los géneros *Halomonas* y *Bacillus*. Además estos resultados se corresponden con las características fenotípicas encontradas.

El primer grupo abarca a los aislados ESB 32, ESB 79 y ESB 31, los cuáles comparten varias características fenotípicas en común. Son bacilos Gram-negativos halófilos moderados que crecen en un porcentaje de sales de hasta 20 %, en un amplio intervalo de pH de 5 a 9, y comparten un perfil hidrolítico similar. Además de las

características fenotípicas, los resultados del análisis filogenético muestran que estos aislados se relacionan estrechamente con especies del género *Halomonas*. En el dendrograma de similitud, los aislados ESB 32 y ESB 79 se encuentran formando el mismo brazo, resultado que coincide con lo encontrado en el análisis filogenético en el cual se ubican en la misma rama filogenética, relación además apoyada con un valor de bootstrap de 100. Los aislados ESB 32 y ESB 79 se encuentran relacionados cercanamente con *Halomonas denitrificans* con un porcentaje de similitud de 98 % en ambos casos, y un valor de bootstrap de 78. Según lo reportado por Kim y col, 2007 ⁽¹¹⁹⁾, *Halomonas denitrificans* y los aislados ESB 32 y ESB 79 presentan colonias amarillentas, lisas y translúcidas, son halófilas moderadas que crecen en medios de hasta 20 % de concentración de sales, no hidrolizan ADN, caseína ni tween 80, sin embargo reportan actividad amilolítica negativa por lo que podría tratarse de otra cepa de esta especie, considerando además la heterogeneidad del género *Halomonas*. Cabe señalar que estos aislados presentan un perfil de restricción parecido pero no homogéneo al 100 % y ESB 32 presenta mayor halo de hidrólisis amilolítica, razones por la cual se tratarían de cepas de la misma especie.

Según lo observado en el árbol filogenético, el aislado ESB 31 se encuentra cercanamente relacionado con *Halomonas subterranea* y *Halomonas janggokensis*, con un porcentaje de similitud de 98 % y con un valor de bootstrap de 99, en ambos casos. Sin embargo, de acuerdo a las características fenotípicas ESB 31 está más relacionado con *Halomonas janggokensis*, ya que al igual que reportaron Kim y col, 2007 ⁽¹¹⁹⁾; ambos son halófilos que crecen en una concentración de sales de hasta 20 % y en amplio rango de pH, pero no en ausencia de sales, hidrolizan ADN, pero no caseína, ni tween 80. En cambio, *Halomonas subterranea* según lo reportado por Xu y col, 2007 ⁽¹²⁰⁾ puede crecer en ausencia de sales, hidroliza caseína, pero no ADN. Sin embargo, en ambos estudios se ha reportado que estas especies no son capaces de hidrolizar almidón. Se podría señalar que la relación filogenética entre el aislado ESB 31 y *Halomonas janggokensis* se sustenta en los resultados de la evaluación fisiológica y bioquímica antes mencionados, incluso cuando la capacidad amilolítica no concuerda con los estudios señalados. Estas diferencias se

justificarían en el hecho de que el género *Halomonas* es heterogéneo, según han descrito estudios previos, tal como lo reportaron Mata y col, 2002 ⁽¹¹⁸⁾ quienes realizaron una detallada caracterización de 21 cepas tipo del género *Halomonas* mediante 234 test fenotípicos diferentes, cuyos resultados agruparon las especies en tres grandes grupos con un nivel de similitud de 62 %. Adicionalmente, las diferencias reportadas en el presente estudio, se pueden sustentar en el hecho de que las Salinas de San Blas cuentan con condiciones ambientales particulares, que posiblemente han influenciado en el desarrollo de nuevas capacidades hidrolíticas. Similares resultados presentaron Sánchez-Porro y col, 2003 quienes en su estudio sobre la diversidad de bacterias halófilas moderadas reportaron diversidad de aislados con capacidad de hidrolizar varios sustratos, observación que contrasta con los resultados obtenidos de las mismas pruebas con 21 cepas tipo de los mismos géneros encontrados, entre ellos: *Chromohalobacter*, *Salinivibrio*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Salibacillus*, *Salinicoccus* y *Marinococcus* ⁽⁸²⁾.

Cabe mencionar que el aislado ESB 31 presenta un nivel de similitud de 96 % con *Halomonas meridiana*. Coronado y col, 2000 ⁽⁸⁰⁾ reportaron un estudio sobre la optimización de la producción enzimática y caracterización de α -amilasa proveniente de esta misma cepa *Halomonas meridiana* DSM 5425, enzima que mostró actividad incluso en concentraciones salinas de 30 %, con un óptimo de 10 % la cual señalan podría tener aplicaciones en el tratamiento de aguas salinas o residuales con almidón y elevada concentración de sales.

De acuerdo al dendrograma de similitud (figura N° 12), la segunda rama denominada A se encuentra conformada por los aislados ESB 30, ESB 51, ESB 66, ESB 73, ESB 68, ESB 71, ESB 53, ESB 61, ESB 42, ESB 34 y ESB 37. Los aislados secuenciados fueron ESB 30, ESB 51, ESB 66 y ESB 61, los cuales de acuerdo a la inferencia filogenética robustecida con un valor de bootstrap de 100 se agrupan en el segundo grupo, que considerando además las características fenotípicas se identifican como miembros del género *Bacillus*. Tomando en cuenta las características fenotípicas y genotípicas señaladas, todos los aislados que conforman la rama A en el dendrograma de similitud se ubicarían dentro del género

Bacillus. Las características fisiológicas como las concentraciones salinas de crecimiento y los perfiles hidrolíticos variados encontrados en estos aislados indican que se ha encontrado diversidad de cepas dentro de este género ⁽¹²¹⁾.

El género *Bacillus* constituye una larga y heterogénea colección de bacilos aeróbicos y anaeróbicos facultativos formadores de esporas que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Otra característica importante es que el género *Bacillus* es reconocido por incluir especies productoras de enzimas hidrolíticas extracelulares usadas a nivel industrial para diversos procesos, en especial en la industria alimentaria ^(64, 122, 123).

El aislado ESB 30 se relaciona estrechamente con *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, presentando un porcentaje de similitud de 98 %. Las especies de *Bacillus subtilis* constituyen un conjunto complejo de especies estrechamente relacionadas. Por muchos años se ha reconocido que estas especies no pueden diferenciarse en base a características fenotípicas, ni de acuerdo a los genes ribosómicos 16S por su naturaleza altamente conservada ⁽¹²⁴⁾, empleándose nuevos métodos.

Cabe mencionar que el aislado ESB 30, de acuerdo a las características fenotípicas es un bacilo Gram-positivo que crece en concentraciones salinas desde 5 a 15 % y presenta un amplio perfil hidrolítico al degradar almidón, tributirina, caseína y DNA, características que la hacen atractiva para potencial uso industrial. De acuerdo a lo descrito por Nakamura y col, 1999 ⁽¹²⁵⁾ el aislado ESB 30 y *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. comparten además similares características fenotípicas como la hidrólisis de almidón y caseína.

El aislado ESB 51 presenta un porcentaje de similitud de 83 % con *Bacillus vietnamensis* y de 81 % con *Bacillus aquimaris*. Según el criterio descrito por Stackebrandt y col, 1994 ⁽¹²⁶⁾ se debe considerar que cuando las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 16S tienen una homología menor al 98 %, es improbable que los dos organismos se relacionen a nivel de especie. En base a lo señalado, se podría indicar que el aislado ESB 51 no pertenece a la especie *Bacillus vietnamensis* ni a *Bacillus aquimaris*. Sin embargo, el valor de bootstrap de 92, las

características fenotípicas y el agrupamiento de similitud son confiables para ubicar al aislado ESB 51 dentro del género *Bacillus*.

El aislado ESB 66 se encuentra en el mismo brazo filogenético con *Bacillus firmus* especie reconocida como productora de amilasas ⁽¹²⁷⁾, especie con la que se relaciona con un nivel de similitud de 98; sin embargo esta relación es apoyada con un valor de bootstrap de 47/ 46 con NJ/ME, lo cual indica que la relación filogenética establecida podría no ser confiable.

El aislado ESB 61 se encuentra estrechamente relacionado con *Bacillus flexus* con un porcentaje de similitud de 99 % y un valor de bootstrap de 100, así también presenta un nivel de similitud de 98 % con *Bacillus megaterium* con un valor de bootstrap de 100. Las características fenotípicas de este aislado concuerdan con las reportadas por Zhao y col, 2008 ⁽¹²⁸⁾ quienes caracterizaron la amilasa alcalina producida por *Bacillus flexus* XJU-3 que por sus propiedades presenta aplicaciones industriales potenciales, ambos son capaces de hidrolizar almidón y caseína, crecer en un rango de sales de hasta 15 % y tolerar un amplio rango de pH, sólo se diferencian en la capacidad de hidrolizar tween 80, por lo que podría tratarse de una nueva variedad de *Bacillus flexus*.

VI.- CONCLUSIONES

1.- Se seleccionaron catorce bacterias con actividad amilolítica a partir de muestras de suelo de las Salinas de San Blas en Junín-Perú.

2.- De los catorce aislados, tres fueron bacilos Gram-negativos y once bacilos Gram-positivos, y exhibieron diversos perfiles hidrolíticos.

3.- Los aislados ESB 32, ESB 79 y ESB 31 pertenecen al género *Halomonas* según el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas parciales de los genes ribosómicos 16S y el agrupamiento de los perfiles de restricción.

4.- Los aislados ESB 30, ESB 51, ESB 66, ESB 73, ESB 68, ESB 71, ESB 53, ESB 61, ESB 42, ESB 34 y ESB 37 pertenecen al género *Bacillus* según la caracterización molecular basada en el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas parciales de los genes ribosómicos 16S y el agrupamiento de los perfiles de restricción.

5.- En base a las características fenotípicas y genotípicas evaluadas, los aislados ESB 32 y ESB 79 se relacionan ambos con *Halomonas denitrificans*, ESB 31 con *Halomonas janggokensis*, ESB 30 con *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, ESB 66 con *Bacillus firmus* y ESB 61 con *Bacillus flexus*.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Enache M, Kamekura M. Hydrolitic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Rom J Biochem* 2010;47(1):47-59.
2. Delgado-Garcia M, Valdivia-Urdiales B, Aguilar-Gonzalez CN, Contreras-Esquivel JC, Rodriguez-Herrera R. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *J Sci Food Agric*. 2012;92(13):2575-80.
3. Aiyer PV. Amylases and their applications. *Afr J Biotechnol*. 2005;4(13):1525-9.
4. Rohban R, Amoozegar MA, Ventosa A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009;36(3):333-40.
5. Ghozlan H, Deif H, Kandil RA, Sabry S. Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. *J Gen Appl Microbiol*. 2006;52(2):63-72.
6. Babavalian H, Amoozegar MA, Pourbabae AA, Moghaddam MM, Shakeri F. Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. *Microbiology*. 2013;82(4):466-74.
7. Reddy N, Nimmagadda A, Rao KS. An overview of the microbial α -amylase family. *Afr J Biotechnol*. 2004;2(12):645-8.
8. Bell E. *Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival*. Wallingford: CABI; 2012.
9. Nissenbaum A. *Hypersaline brines and evaporitic environments: Proceedings of the Bat Sheva Seminar on Saline Lakes and Natural Brines*. Netherlands: Elsevier ed; 1980.
10. Maturrano L, Santos F, Rossello-Mora R, Anton J. Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(6):3887-95.
11. Hutcheon GW, Vasisht N, Bolhuis A. Characterisation of a highly stable alpha-amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles*. 2005;9(6):487-95.

12. Javor B. Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry. Berlín: Springer Verlag; 1989.
13. Nissenbaum A. The microbiology and biogeochemistry of the Dead Sea. *Microb Ecol.* 1975;2(2):139-61.
14. Post FJ. The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microb Ecol.* 1977;3(2):143-65.
15. Fernández-Jerí Y, Zavaleta AI, Arahall D. Bacterias halófilas moderadas aisladas de las salinas de Atacocha-Ayacucho. *Ciencia e Investigación.* 2007;10:59-63.
16. Canales PE. Bacterias productoras de betagalactosidasa aisladas de las Salinas de Chilca. Libro de resúmenes de investigación de la XIII Jornada de Investigación en Farmacia y Bioquímica, Toxicología y Ciencia de los alimentos. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
17. Flores-Fernández M. Diversidad genética de bacterias halotolerantes productoras de lipasas extracelulares aisladas de las Salinas de Pilluana-San Martín. [Tesis de pregrado] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
18. Van Den Burg B. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(3):213-8.
19. Pikuta EV, Hoover RB, Tang J. Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit Rev Microbiol.* 2007;33(3):183-209.
20. Cavicchioli R, Amils R, Wagner D, McGenity T. Life and applications of extremophiles. *Environ Microbiol.* 2011;13(8):1903-7.
21. Fujiwara S. Extremophiles: developments of their special functions and potential resources. *J Biosci Bioeng.* 2002;94(6):518-25.
22. De Champdore M, Staiano M, Rossi M, D'Auria S. Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *J R Soc Interface.* 2007;4(13):183-91.

23. Podar M, Reysenbach AL. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Curr Opin Biotechnol*. 2006;17(3):250-5.
24. Mellado E, Ventosa A. Biotechnological potencial of moderately and extremely halophilic microorganisms. *Microorg Food Enzym Prod*. 2003;2:233-56.
25. Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Salin Syst*. 2008;4(2):1-13.
26. Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2002;28(1):56-63.
27. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* . 1998;62(2):504-44.
28. Lanyi JK. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev*. 1974;38(3):272-90.
29. Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 2001;5(2):73-83.
30. Rodriguez-Valera F. Biotechnological potential of halobacteria. *Biochem Soc Symp*. 1992;58:135-47.
31. Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol*. 2010;31(8-9):825-34.
32. Namwong S, Tanasupawat S, Visessanguan W, Kudo T, Itoh T. *Halococcus thailandensis* sp. nov., from fish sauce in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57(Pt 10):2199-203.
33. Tapingkae W, Tanasupawat S, Itoh T, Parkin KL, Benjakul S, Visessanguan W, et al. *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58(Pt 10):2378-83.
34. Lentzen G, Schwarz T. Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;72(4):623-34.

35. Kolp S, Pietsch M, Galinski EA, Gutschow M. Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis. *Biochim Biophys.* 2006;1764(7):1234-42.
36. Buenger J, Driller H. Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Pharmacol Physiol.* 2004;17(5):232-7.
37. Le Borgne S, Paniagua D, Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *J Mole Microbiol Biotechnol.* 2008;15(2-3):74-92.
38. Kubo M, Hiroe J, Murakami M, Fukami H, Tachiki T. Treatment of hypersaline-containing wastewater with salt-tolerant microorganisms. *J Biosci Bioeng.* 2001;91(2):222-4.
39. Barnard D, Casanueva A, Tuffin M, Cowan D. Extremophiles in biofuel synthesis. *Environ Technol.* 2010;31(8-9):871-88.
40. Chávez-Hidalgo EL, Zavaleta AI, Canales PE, Izaguirre V, Sinisterra JV, Guerra G. Bacterias productoras de betagalactosidasa aisladas de ambientes hipersalinos peruanos. *Científica.* 2011;8(2):171-6.
41. Wagner NL, Greco JA, Ranaghan MJ, Birge RR. Directed evolution of bacteriorhodopsin for applications in bioelectronics. *J R Soc Interface.* 2013;10 (84): 20130197. Epub 2013/05/17.
42. Kim YJ, Neuzil P, Nam CH, Engelhard M. Deposition of bacteriorhodopsin protein in a purple membrane form on nitrocellulose membranes for enhanced photoelectric response. *Sensors.* 2013;13(1):455-62.
43. Raja R, Hemaiswarya S, Rengasamy R. Exploitation of *Dunaliella* for beta-carotene production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74(3):517-23.
44. Fernandez-Castillo R, Rodriguez-Valera F, Gonzalez-Ramos J, Ruiz-Berraquero F. Accumulation of Poly (beta-Hydroxybutyrate) by *Halobacteria*. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51(1):214-6.

45. Don TM, Chen CW, Chan TH. Preparation and characterization of poly(hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*. J Biomater Sci Polym. 2006;17(12):1425-38.
46. Quillaguaman J, Munoz M, Mattiasson B, Hatti-Kaul R. Optimizing conditions for poly(beta-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;74(5):981-6.
47. Calvo C, Martinez-Checa F, Toledo FL, Porcel J, Quesada E. Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. Appl Microbiol Biotechnol. 2002;60(3):347-51.
48. Sheridan PP, Brenchley JE. Characterization of a salt-tolerant family 42 beta-galactosidase from a psychrophilic antarctic *Planococcus* isolate. Appl Environ Microbiol. 2000;66(6):2438-44.
49. Flores - Fernández M, Zavaleta AI, Zambrano Y, Cervantes L, Izaguirre V. Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. Ciencia e Investigación. 2010;13 (1): 42-6.
50. Madern D, Ebel C, Zaccai G. Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles : life under extreme conditions. 2000;4(2):91-8.
51. Amoozegar MA, Salehghamari E, Khajeh K, Kabiri M, Naddaf S. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio sp.* strain SA-2. J Basic Microbiol. 2008;48(3):160-7.
52. Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem. 2003;38(11):1599-616.
53. Setati ME. Diversity and industrial potential of hydrolaseproducing halophilic/halotolerant eubacteria. Afr J Biotechnol. 2010;9(11):1555-60.

54. Gupta A, Roy I, Patel RK, Singh SP, Khare SK, Gupta MN. One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus sp.* J Chromatogr A. 2005;1075(1-2):103-8.
55. Vidyasagar M, Prakash S, Mahajan V, Shouche YS, Sreeramulu K. Purification and characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter sp.* TVSP101. Braz J Microbiol. 2009;40:12-9.
56. Holmes ML, Scopes RK, Moritz RL, Simpson RJ, Englert C, Pfeifer F, et al. Purification and analysis of an extremely halophilic beta-galactosidase from *Haloferax alicantei*. Biochim Biophys. 1997;1337(2):276-86.
57. Govender L, Naidoo L, Setati ME. Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-1, 4-bxylanase from a newly isolated haloalkaliphilic *Nesterenkonia sp.* Afr J Biotechnol. 2009;8(20): 5458-66.
58. Wang C-Y, Hsieh Y-R, Ng C-C, Chan H, Lin H-T, Tzeng W-S, et al. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio sp.* strain NTU-05. Enzym Microb Technol. 2009;44(6):373-9.
59. Aygan A, Arikan B. A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus sp.* C14 isolated from Van soda lake. Int J Agric Biol. 2008;10:369-74.
60. Bayoumi R, El-louboudey S, Sidkey N, Abd-El-Rahman M. Production, purification and characterization of thermoalkalophilic lipase for application in bio-detergent industry. J Appl Sci Res. 2007;3(12):1752-65.
61. Kamekura M HT, Onishi H. Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 59-GMP. Appl Environ Microbiol. 1982;44:994-5.
62. Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. Biotechnol Appl Biochem. 2000; 31 (Pt 2):135-52.

63. Carrillo L. Microbiología Agrícola. Salta UNd, editor. Argentina: Universidad Nacional de Salta; 2003.
64. Prakash O, Jaiswal N. Alpha-amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160(8):2401-14.
65. Souza PDM, Magalhães PDO. Application of microbial alfa-amylase in industry – a review. *Braz J Microbiolol*. 2010;41:850-61.
66. Ivanova VN, Dobрева EP, Emanuilova EI. Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *J Biotechnol*. 1993;28(2–3):277-89.
67. Vihinen M, Mantsala P. Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Biotechnol Applied Biochem*. 1990;12(4):427-35.
68. Canganella F, Andrade CM, Antranikian G. Characterization of amyolytic and pullulytic enzymes from thermophilic archaea and from a new *Fervidobacterium species*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1994;42(2-3):239-45.
69. James J, Robert N, Lee B. Cloning and expression of a glucoamylase gene from *Lactobacillus amylovorus* ATCC 33621 in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*. 1996;18(12):1407-12.
70. Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol*. 2003;89(1):17-34.
71. Neuner A, Jannasch HW, Belkin S, Stetter KO. *Thermococcus litoralis* sp. nov.: a novel species of extremely thermophilic marine *archaeobacteria*. *Archiv Microbiol*. 1990;153:205-7.
72. Wiseman A, Rebollar MC, Calvo ES. Manual de Biotecnología de Los Enzimas. España: Acribia; 1991.
73. Van Der Maarel MJ, Van Der Veen B, Uitdehaag J, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J Biotechnol*. 2002;94(2):137-55.

74. Bruinenberg P, Hulst A, Faber A, Voogd R. A process for surface sizing or coating of paper. 1996. European Patent Application EP 0,690,170 A.1.
75. Van E, JH. Enzymatic automated dishwash detergents. *Chim Oggi*. 1992; 10:21-4.
76. Kanthi Kiran K, Chandra TS. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkali-tolerant α -amylase by a moderately halophilic *Bacillus sp.* strain TSCVKK. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;77(5):1023-31.
77. Perez-Pomares F BV, Ferrer J, Pire C, Marhuenda-Egea FC, Bonete MJ. α -Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*. 2003;7:299-306.
78. Patel S JN, Madamwar D. Production of α -amylase from *Halobacterium halobium*. *World J Microbiol Biotechnol*. 1993;9:25-8.
79. Kobayashi T KH, Aono R, Horikoshi K, Kudo T. Haloalkaliphilic maltotriose-forming α -amylase from the archaeobacterium *Natronococcus sp.* strain Ah-36. *J Bacteriol*. 1992;174:3439-44.
80. Coronado MJ VC, Hofemeister J, Ventosa A, Nieto J. Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;183:67-71.
81. Ardakani MR, Poshtkouhian A, Amoozgar MA, Zolgharnein H. Isolation of moderately halophilic *Pseudoalteromonas* producing extracellular hydrolytic enzymes from Persian Gulf. *Indian J Microbiol*. 2012;52(1):94-8.
82. Sanchez-Porro C, Martin S, Mellado E, Ventosa A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J Applied Microbiol*. 2003;94(2):295-300.
83. Rohban R, Amoozgar MA, Ventosa A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009;36(3):333-40.

84. Yang DD, Li Q, Huang JJ, Chen M. [Diversity and enzyme-producing activity of culturable halophilic bacteria in Daishan Saltern of East China]. *J Appl Ecol.* 2012;23(11):3103-8.
85. Amoozegar MA, Malekzadeh F, Malik KA. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *J Microbiol Methods.* 2003;52(3):353-9.
86. Moreno Mde L, Garcia MT, Ventosa A, Mellado E. Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and protease-producing extreme halophile. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009;68(1):59-71.
87. Vahed SZ, Forouhandeh H, Hassanzadeh S, Klenk HP, Hejazi MA, Hejazi MS. Isolation and characterization of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran. *Microbiol.* 2011;80(6):826-33.
88. Avise JC. A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends Ecol Evol.* 1989;4(9):279-81.
89. Poulsen LK, Dalton HM, Angles ML, Marshall KC, Molin S, Goodman AE. Simultaneous determination of gene expression and bacterial identity in single cells in defined mixtures of pure cultures. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(9):3698-702.
90. Theron J, Cloete T. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit Rev Microbiol.* 2000;26(1):37-57.
91. Liu W-T, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(11):4516-22.
92. Andrighetto C, Marcazzan G, Lombardi A. Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese. *Lett Appl Microbiol.* 2004;38(5):400-5.
93. Ventura M, Elli M, Reniero R, Zink R. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified

ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Ecol* 2001;Jul;36(2-3):113-21.

94. Gich FB, Amer E, Figueras JB, Abella CA, Balaguer MD, Poch M. Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *Int Microbiol*. 2000;3(2):103-6.

95. Lauerman LH. Advances in PCR technology. *Anim Health Res Rev*. 2004;5(2):247-8.

96. Rodicio M, Mendoza M. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004;22(4):238-45.

97. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*. 2000;7(1-2):203-14.

98. Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci*. 1998;23(10):403-5.

99. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28(10):2731-9.

100. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 1987;4(4):406-25.

101. Ministerio del Ambiente [en internet] Lima: Sistema Nacional de Información Ambiental; 2013 [actualizado el 14 de mayo del 2013, acceso el 15 de mayo del 2013]: <http://sinia.minam.gob.pe/index.php?accion=verElemento&idElementoInformacion=865&verPor=&idTipoElemento=&idTipoFuente=&idfuentesinformacion=93>.

102. Dyall-Smith M. The halohandbook. Protocols for haloarchaeal genetics. Melbourne: Edited by Dyall-Smith M. University of Melbourne; 2006

103. Ventosa A, Quesada E, Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbiol*. 1982;128(9):1959-68.

104. Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol.* 1982;43(4):777-80.
105. Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1957;23(1):15-22.
106. Chávez -Hidalgo EL. Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de *Trypanosoma cruzi* en placenta y cordón umbilical humano. [Tesis de pregrado] Lima: UNMSM; 2010.
107. Morales D. Importancia de las Salinas de San Blas durante el período formativo en la Sierra Central del Perú. *Boletín de Arqueología PUCP,* 2 (1998), 273-87.
108. Rossi M, Ciaramella M, Cannio R, Pisani FM, Moracci M, Bartolucci S. Extremophiles 2002. *J Bacteriol.* 2003;185(13):3683-9.
109. Averhoff B, Muller V. Exploring research frontiers in microbiology: recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles. *Res Microbiol.* 2010;161 (6): 506-14.
110. Fernández-Jerí Y. Identificación molecular de eubacterias halófilas moderadas productoras de exopolisacáridos aisladas de las salinas de Atacocha-Ayacucho. [Tesis de Maestría] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
111. Chávez-Hidalgo EL. Bacterias halófilas moderadas con actividad lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana-San Martín. [Tesis de Maestría] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
112. Quesada E, Bejar V, Valderrama MJ, Ventosa A, Ramos Cormenzana AR. Isolation and characterization of moderately halophilic nonmotile rods from different saline habitats. *Microbiol.* 1985;1(1-2):89-96.

113. Böckelmann U, Manz W, Neu TR, Szewzyk U. Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ('river snow') in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. *FEMS Microbiol Ecol.* 2000;33(2):157-70.
114. Rubiano C. Aislamiento y caracterización de microorganismos termofílicos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termominerales de Paipa E Iza (Boyacá). [Tesis de pregrado] Colombia: Pontificia Universidad Javeriana; 2006.
115. Ventosa A, Ramos-Cormenzana A, Kocur M. Moderately halophilic gram-positive cocci from hypersaline environments. *Syst Appl Microbiol.* 1983;4(4):564-70.
116. Cojoc R, Merciu S, Popescu G, Dumitru L, Kamekura M, Enache M. Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. *Rom Biotechnol Lett.* 2009;14:4658-64.
117. Arahall DR, García MT, Ludwig W, Schleifer KH, Ventosa A. Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(4):1443-8.G
118. Mata JA, Martínez-Cánovas J, Quesada E, Béjar V. A Detailed Phenotypic Characterisation of the Type Strains of *Halomonas* species. *Syst Appl Microbiol.* 2002;25(3):360-75.
119. Kim KK, Jin L, Yang HC, Lee S-T. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57(4):675-81.
120. Xu X-W, Wu Y-H, Zhou Z, Wang C-S, Zhou Y-G, Zhang H-B, et al. *Halomonas saccharevitans* sp. nov., *Halomonas arcis* sp. nov. and *Halomonas subterranea* sp. nov., halophilic bacteria isolated from hypersaline environments of China. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57(7):1619-24.

121. Goto K, Omura T, Hara Y, Sadaie Y. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. J Gen Appl Microbiol. 2000;46(1):1-8.
122. Nascimento WCAd, Martins MLL. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp.* Braz J Microbiol. 2004;35(1-2):91-6.
123. McConnell D, Cantwell B, Devine K, Forage A, Laoide B, O'kane C, et al. Genetic engineering of extracellular enzyme systems of *Bacilli*. Ann New York Acad Sci. 1986;469(1):1-17.
124. Rooney AP, Price NP, Ehrhardt C, Swezey JL, Bannan JD. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2009;59(10):2429-36.
125. Nakamura L, Roberts MS, Cohan FM. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1999;49:1211-5.
126. Stackebrandt E, Goebel B. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol. 1994;44(4):846-9.
127. Wijbenga D-J, Beldman G, Veen A, Binnema D. Production of native-starch-degrading enzymes by a *Bacillus firmus/lentus* strain. Appl Microbiol Biotechnol. 1991;35(2):180-4.
128. Zhao J, Lan X, Su J, Sun L, Rahman E. Isolation and identification of an alkaliphilic *Bacillus flexus* XJU-3 and analysis of its alkaline amylase. Acta Microbiol Sin. 2008;48(6):750-6.

VIII.- ANEXOS

Anexo N° 1

Composición de stock agua de sales (SW) 30 % (g/L)

NaCl.....	240,0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	30,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	35,0 g
KCl.....	7,0 g
NaBr.....	0,8 g
NaHCO ₃	0,2 g
CaCl ₂	0,5 g
Agua destilada csp.....	1 L

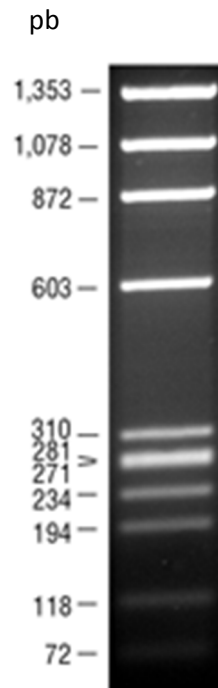
Anexo N° 2

Salinas de San Blas, provincia de Junín (departamento de Junín), Perú.



Anexo N° 3

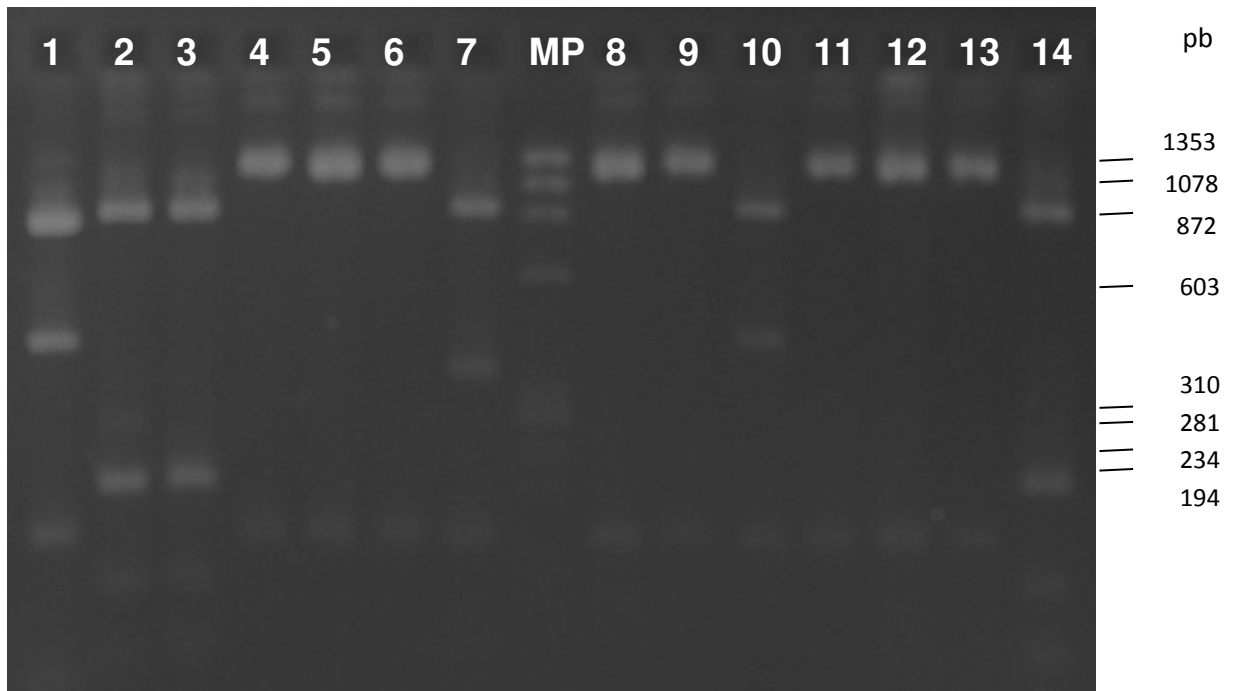
Marcador de peso molecular DNA ϕ X174 cortado con *Hae III*



Fragmento	Peso molecular kDa	Tamaño en pares de bases
1	251	1 353
2	200	1 078
3	162	872
4	112	603
5	58	310
6a	52	281
6b	50	271
7	43	234
8	36	194
9	22	118
10	13	72

Anexo N° 4

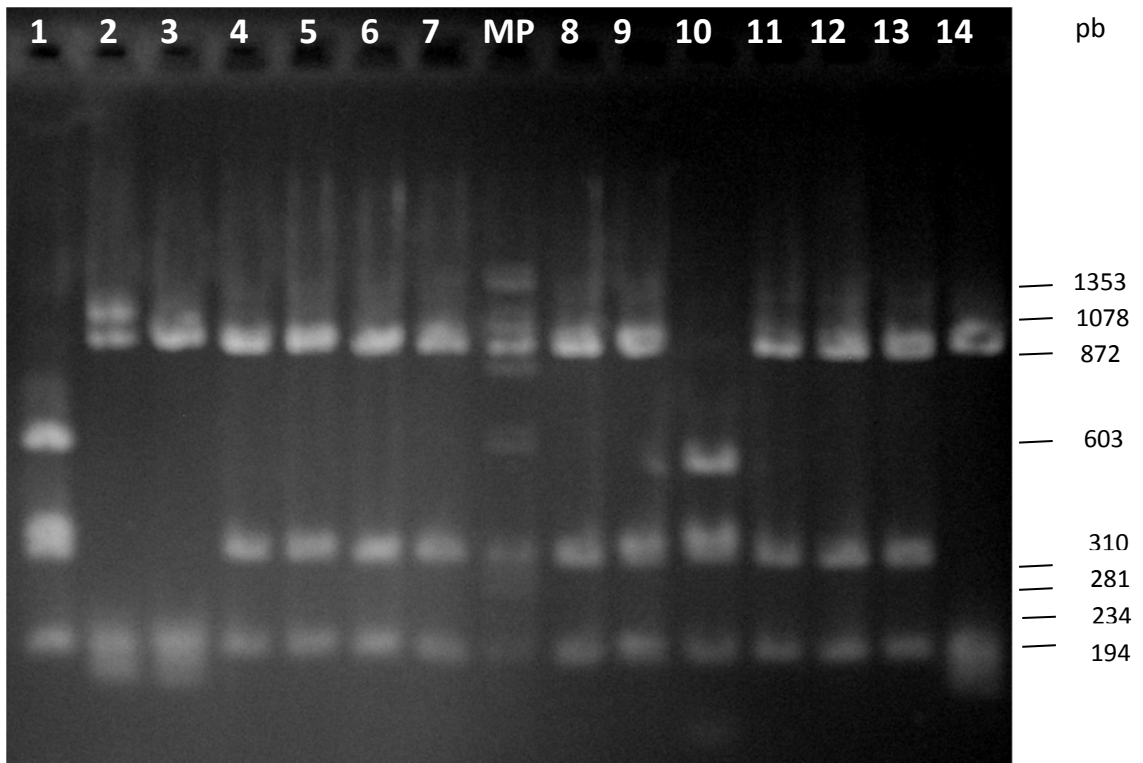
Perfiles de restricción con *BstU I*



Gel de agarosa al 3% mostrando ADNr 16S amplificado de las bacterias amilolíticas aisladas de las salinas de San Blas cortado con *BstU I*. Línea y cepa 1: ESB 30; 2, ESB 31; 3, ESB 32; 4, ESB 34; 5, ESB 37; 6, ESB 42; 7, ESB 51; MP, Marcador de peso molecular DNA ϕ X174; 8, ESB 53; 9, ESB 61; 10, ESB 66; 11, ESB 68; 12, ESB 71; 13, ESB 73 y 14, ESB 79.

Anexo N° 5

Perfiles de restricción con *Hinf I*



Gel de agarosa al 3% mostrando ADNr 16S amplificado de las bacterias amilolíticas aisladas de las salinas de San Blas cortado con *Hinf I*. Línea y cepa 1: ESB 30; 2, ESB 31; 3, ESB 32; 4, ESB 34; 5, ESB 37; 6, ESB 42; 7, ESB 51; MP, Marcador de peso molecular DNA ϕ X174; 8, ESB 53; 9, ESB 61; 10, ESB 66; 11, ESB 68; 12, ESB 71; 13, ESB 73 y 14, ESB 79.

