



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**ESPECIES DE LA FAMILIA *Bacillaceae* PRODUCTORAS DE PROTEASAS
AISLADAS DE AGUAS TERMOMINERALES DEL COMPLEJO TURÍSTICO
BAÑOS DEL INCA, CAJAMARCA, PERÚ**

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

PRESENTADO POR:

BACH. KENNY DANIEL SALAZAR FERNÁNDEZ

ASESOR:

DR. MBLGO. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

CO-ASESOR:

MG. MBLGO. OMAR DANIEL PAIRAZAMÁN QUIROZ

CAJAMARCA – PERÚ

2022

COPYRIGHT ©

KENNY DANIEL SALAZAR FERNÁNDEZ

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Salazar, K. 2021. **ESPECIES DE LA FAMILIA *Bacillaceae* PRODUCTORAS DE PROTEASAS AISLADAS DE AGUAS TERMOMINERALES DEL COMPLEJO TURÍSTICO BAÑOS DEL INCA, CAJAMARCA, PERÚ** / Kenny

Daniel Salazar Fernández

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-asesor: Mg. Mblgo. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo
UNC -2022

**ESPECIES DE LA FAMILIA *Bacillaceae* PRODUCTORAS DE PROTEASAS
AISLADAS DE AGUAS TERMOMINERALES DEL COMPLEJO TURÍSTICO
BAÑOS DEL INCA, CAJAMARCA, PERÚ**

AUTOR: Bach. Kenny Daniel Salazar Fernández

ASESOR: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

CO-ASESOR: Mg. Mblgo. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

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

JURADO EVALUADOR



Presidente
Dr. Deza Arroyo, Nilton Eduardo



Secretario
M. Cs. López Orbegoso, John Víctor



Vocal
Dr. Padilla Sobrados, José Armando

Cajamarca, 2022 – Perú

Anexo 2

Universidad Nacional de Cajamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Acta de sustentación de tesis virtual, basado en el Reglamento de sustentación de tesis virtuales Resolución 944-2020 artículo 8

Siendo las 3:05 p.m. del día 23 de marzo del año 2022 se procedió a iniciar la sustentación virtual de la tesis titulada: "Especies de la familia *Bacillaceae* productoras de proteasas aisladas de aguas termominerales del Complejo Turístico Baños del Inca, Cajamarca, Perú"

presentada por el Bachiller en: Ciencias Biológicas.
Nombres y Apellidos: Kenny Daniel Salazar Fernández.

El Jurado Evaluador está integrado por:

Presidente: Dr. Nilton Eduardo Deza Arroyo

Secretario: M. Cs. John Víctor López Orbegoso

Vocal: Dr. José Armando Padilla Sobrados

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-asesor: Mg. Mblgo. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Terminado el tiempo de sustentación estipulado en el Reglamento.

El tesista ha obtenido el siguiente calificativo: Dieciséis (16) Siendo las 4:30 p.m. del día 23 del mes de Marzo del año 2022 se dio por concluido el proceso de Sustentación Virtual de Tesis.



Presidente
Dr. Deza Arroyo, Nilton Eduardo



Secretario
M. Cs. López Orbegoso, John Víctor



Vocal
Dr. Padilla Sobrados, José Armando



Asesor
Dr. Rivera Jacinto, Marco Antonio



Co-asesor
Mg. Mblgo. Pairazamán Quiroz, Omar Daniel



Tesista
Salazar Fernández, Kenny Daniel

A:

Dedico esta tesis a mis padres y a mi hermana, quienes me brindaron su apoyo innumerables veces, sin ellos no hubiera podido llegar hasta estas instancias. Su constante motivación me permitió continuar pese a las dificultades que se presentaron a lo largo del desarrollo de este producto

Agradecimiento

A Dios, a mis padres y a mi hermana por todo el apoyo brindado. A mis asesores, el Mg. Omar Pairazamán cuyos conocimientos y destrezas contribuyeron con el éxito de este proyecto, y al Dr. Marco Rivera cuya experiencia en bacteriología me permitió obtener los mejores especímenes.

Finalmente, agradezco al CONCYTEC-PROCIENCIA, que en el marco de la convocatoria de Proyectos de Investigación Básica 2019-01 financió el Proyecto Semilla “Potencial genético con aplicación biotecnológica industrial y ambiental de la microbiota termófila nativa de las fuentes geotermales de la Región Cajamarca” [número de contrato 395-2019-FONDECYT] del cual forma parte este trabajo de Tesis. Gracias a todos por permitirme hacer investigación científica y crecer profesionalmente, y sobre todo por permitirme contribuir a la ciencia en el país.

Tabla de contenido

Resumen	xv
Abstract	xvi
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	5
MARCO TEÓRICO	5
2.1 Antecedentes de la Investigación	5
2.2 Bases teóricas (Marco teórico y conceptual)	8
2.2.1 Fuentes termominerales	8
2.2.2 Microorganismos termófilos y mecanismos de adaptación a altas temperaturas	8
2.2.3 Bacterias termófilas de la familia <i>Bacillaceae</i>	11
2.2.4 Enzimas bacterianas termoestables	12
2.2.5 Proteasas	13
2.2.6 Gen 16S ARNr	14
CAPÍTULO III	16
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	16
3.1 Material biológico	16
3.2 Lugar de muestreo	16
3.3 Toma de muestra de agua de la fuente termal de El Complejo Turístico Baños del Inca	17
3.4 Caracterización físico química de las aguas de la fuente termal del complejo turístico Baños del Inca	17
3.5 Aislamiento de las bacterias de agua de fuente termal	17
3.6 Caracterización microbiológica	18
3.7 Determinación de la actividad enzimática	19
3.8 Extracción de ADN mediante shock térmico	19
3.9 Amplificación del gen 16S ARNr	20
3.10 Detección del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa	20
3.11 Secuenciación del gen 16 S ARNr e identificación de la especie	21
CAPÍTULO IV	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Análisis físico químico del agua del Complejo Termal Baños del Inca	22
4.2 Características microbiológicas de los aislados bacterianos	23

4.3 Identificación bioquímica de los aislados bacterianos	25
4.4 Evaluación de la actividad proteasa de los aislados bacterianos	26
4.5 Amplificación del gen 16S ARNr	28
4.6 Discusión	32
CAPÍTULO V	40
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
5.1 Conclusiones	40
5.2 Recomendaciones	41
LISTA DE REFERENCIAS	42
APÉNDICES	51
Apéndice 1. Lugar de muestreo	51
Apéndice 2. Enriquecimiento de la muestra	52
Apéndice 3. Siembra en medio leche descrema	53
Apéndice 4. Cepa K1	54
Apéndice 5. Cepa K2b	55
Apéndice 6. Cepa K3a	56
Apéndice 7. Cepa K3c	57
Apéndice 8. Cepa K5	58
Apéndice 9. Cepa K9	59
Apéndice 10. Cepa K10	60
Apéndice 11. Cepa 2K1a	61
Apéndice 12. Cepa 2K1b	62
Apéndice 13. Cepa 2K1c	63
Apéndice 14. Cepa 2K5a	64
Apéndice 15. Cepa 2K8a	65
Apéndice 16. Cepa 2K10b	66
Apéndice 17. Composición química de las aguas de las pozas del Complejo Turístico Baños del Inca	67
Apéndice 18. Análisis estadístico de prueba de proteasas	69
Apéndice 19. Cromatograma de secuencia 16S ARNr de aislado 2K1a	70
Apéndice 20. Parámetros físicos y químicos de las pozas del Complejo Termal Baños del Inca	71

Lista de ilustraciones

- Figura 1. Variación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas 40°C, 45°C, 50°C, 55°C y 60°C 26
- Figura 2. Temperatura óptima de actividad proteolítica de cada aislado 27
- Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, del gen 16S ARNr, marcador genético de bacterias. 28
- Figura 4. Filogenia de todos los aislados de este estudio (flechas) comparado con secuencias obtenidas del GenBank, los números de acceso se describen en el árbol filogenético. 30
- Figura 5. Filogenia de los aislados obtenidos en este estudio, de la familia *Bacillaceae* (flechas), comparado con secuencias obtenidas del GenBank, los números de acceso se describen en el árbol filogenético. 31
- Figura 6. Filogenia de los aislados obtenidos en este estudio que pertenecerían a la familia *Paenibacillaceae* (flechas) comparado con secuencias obtenidas del GenBank, los números de acceso se describen en el árbol filogenético. 32

Lista de abreviaciones

ARN: Ácido Ribonucleico

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: Polymerase Chain Reaction

Glosario

Potencial biotecnológico de microorganismos presentes en aguas termominerales

El potencial biotecnológico de los microorganismos presentes en aguas termominerales está representado por aquellos que poseen capacidades que mejoren un proceso industrial o que contribuyan con la creación de un producto (Oliart-Ros, Manresa-Presas y Sánchez-Otero, 2016). Un organismo poseerá un potencial biotecnológico cuando sea capaz de sustituir procesos que normalmente se llevan a cabo mediante reacciones químicas artificiales empleando sus propias moléculas.

Termorresistencia

La termorresistencia es una capacidad que poseen los microorganismos frente a condiciones ambientales extremas (Deák, 2014).

Termoestabilidad

Capacidad de no sufrir alteración por acción del calor (Ferrerías, 2011). Es propio de organismos termófilos, involucra un desempeño metabólico normal pese al aumento de la temperatura que en organismos mesófilos o psicrófilos desencadena una desnaturalización de proteínas, alteración de la membrana celular, y por ende, transporte

de sustancias. A diferencia de los mesófilos, los termófilos poseen enzimas más resistentes y flexibles; además, el fenómeno de estabilización entrópica explicaría la alta termoestabilidad de las enzimas termófilas (Haki y Rakshit, 2003). La presencia de chaperoninas y otros mecanismos de adaptación-residuos de glicina estabilizan la estructura secundaria tipo hélice (Petsko, 2001)- a las temperaturas altas también permiten que estos microorganismos prosperen bajo condiciones de altas temperaturas.

Pozas

Lugar donde aflora naturalmente agua subterránea, fluye de formaciones de estratos conformados por grava, arena o roca fisurada (Partida and Valladares, 2002). Se originan por infiltración de aguas superficiales en el interior de la Tierra, incrementando su temperatura a mayor profundidad terrestre; tras encontrar una fisura ascienden hasta la corteza terrestre formando las fuentes termales en sus diversas variantes.

Aguas profundas

Se definen aguas profundas a aquellas que se encuentran a 500 y 1500 metros de la superficie terrestre (Quispe, 2016). Se desarrollan en zonas con materiales poco solubles debido a su profundidad y afloran a la superficie acompañadas de gases y con temperaturas elevadas. También se las llama aguas de origen juvenil y poseen tres tipos de orígenes principales: magmático, volcánico y de reacciones químicas. Las de origen magmático como resultado de la cristalización del magma se componen de hidrógeno, vapor de agua y diversos minerales como flúor, cloro, azufre, carbono, fósforo y boro. Las de origen volcánico proceden de la destilación de la humedad de las rocas y expulsión de agua de capas profundas. Las reacciones químicas proceden de la liberación de agua

tras las reacciones intensas que ocurren en la corteza. Las aguas profundas en conjunto con las aguas superficiales y aguas fósiles, aguas que quedaron atrapadas entre formaciones de rocas, dan origen a las aguas termominerales y explican su diversa composición química y por ende microbiológica (Partida and Valladares, 2002).

**ESPECIES DE LA FAMILIA *Bacillaceae* PRODUCTORAS DE PROTEASAS
AISLADAS DE AGUAS TERMOMINERALES DEL COMPLEJO TURÍSTICO
BAÑOS DEL INCA, CAJAMARCA, PERÚ**

Resumen

El objetivo de esta tesis fue identificar especies bacterianas de la Familia *Bacillaceae* con capacidad de producir proteasas y que habitan las pozas del Complejo Turístico Baños del Inca. Se colectaron muestras de agua de 10 pozas del Complejo Turístico Baños del Inca y se las transportaron al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Cajamarca para su procesamiento y análisis. Todas las muestras se homogeneizaron por agitación manual, 100 mL de cada muestra se inoculó en caldo leche e incubó a 55 °C durante 7 días. Después de este proceso de enriquecimiento, una asada se sembró en agar leche y se incubó a 55°C por 48 h más. Los aislamientos obtenidos fueron caracterizados mediante tinción y pruebas bioquímicas estándar, y se les evaluó la capacidad de producir proteasa al formar un halo de hidrólisis en agar leche descremada, a diferentes temperaturas de incubación por 48 h. Se extrajo ADN genómico de todos los cultivos con prueba de hidrólisis positiva para amplificar el gen 16S ARNr mediante la técnica de PCR; el producto de PCR fue evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa y enviado a secuenciar a Macrogen. Se obtuvieron 14 aislamientos productores de proteasa, *Brevibacillus borstelensis* generó un halo de hidrólisis de 60 mm, a 55°C. *Anoxybacillus rupiensis* y *Aneurinibacillus thermoaerophilus* produjeron halos de 40 mm, a 55°C, respectivamente. Finalmente, las especies de la familia *Bacillaceae* productoras de proteasas aisladas de las aguas termominerales del Complejo Turístico Baños del Inca son: *Anoxybacillus rupiensis*, *Bacillus licheniformis* y *Geobacillus kaustophilus*.

Palabras clave: *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, termófilos, proteasas.

Abstract

The objective of this thesis was to identify bacterial species of the Bacillaceae Family with the capacity to produce proteases and that inhabit the pools of Complejo Turístico Baños del Inca. Water samples were collected from the 10 pools of Complejo Turístico Baños del Inca and transported to the Microbiology Laboratory of the Universidad Nacional de Cajamarca for processing and analysis. All samples were homogenized by manual stirring, 100 mL of each sample was inoculated in milk broth and incubated at 55 °C for 7 days. After this enrichment process, a roast was sown in milk agar and incubated at 55°C for 48 hours more. The isolates obtained were characterized by staining and standard biochemical tests, and the ability to produce protease was evaluated by forming a hydrolysis halo in skim milk agar, at different incubation temperatures for 48 h. Genomic DNA was extracted from all cultures with a positive hydrolysis test to amplify the 16S rRNA gene using the PCR technique; the PCR product was evaluated by agarose gel electrophoresis and sent for sequencing to Macrogen. 14 protease-producing isolates were obtained, *Brevibacillus borstelensis* generated a hydrolysis halo of 60 mm at 55°C. *Anoxybacillus rupiensis* and *Aneurinibacillus thermoaerophilus* produced halos of 40 mm, at 55 °C, respectively. Finally, the species of the Bacillaceae family that produce proteases isolated from the thermomineral waters of Complejo Turístico Baños del Inca are: *Anoxybacillus rupiensis*, *Bacillus licheniformis* and *Geobacillus kaustophilus*.

Key words: *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, proteases, thermophiles.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los países que pertenece al círculo de fuego en el Pacífico Sur, lo cual explica su alta actividad volcánica y geotérmica; esta característica se asocia a ambientes extremófilos de altas temperaturas, como las más de 500 fuentes termales, géiseres y fumarolas que existen en el país. Según el Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico (INGEMET), en la región norte conformada por los departamentos de Cajamarca y La Libertad se generan aguas termales que se originan por subducción de la placa de Nazca y la placa Sudamericana, a diferencia de la región sur conformada por Cusco, Arequipa y Tacna cuyas aguas termales son de origen volcánico y por subducción (Vargas y Cruz, 2010) . El Complejo Termal Baños del Inca, ubicado en la región Cajamarca es un centro turístico conocido desde la época del Incanato, con una temperatura promedio de 70 °C en sus aguas; sin embargo, no se encuentran reportes de microbiota bacteriana cultivable en este ambiente por lo que este componente microbiológico es aún desconocido.

Los microorganismos termófilos (45 °C a 80 °C) se estudian desde hace varias décadas, siendo Tomas Brock en la década de los sesenta quien inició estas investigaciones describiendo bacterias viviendo de forma natural en las fuentes termales y géiseres del Parque Nacional de Yellowstone; en nuestros días, la microbiología molecular se ha consolidado y ofrece diferentes herramientas que permiten la identificación de nuevos filos, géneros y nuevas especies bacterianas en los ambientes más inhóspitos y extremos. Esta investigación tiene el enfoque dirigido a estudiar e identificar un grupo de la microbiota termófila cultivable productora de proteasas, un tipo de enzima de interés industrial.

Las proteasas son enzimas hidrolasas de clase III que degradan proteínas. Dependiendo del sustrato que degradan asumen distintos nombres, como por ejemplo queratinasas, gelatinasas, caseinasas. Un test clásico que permite determinar si una bacteria produce proteasas o no es la prueba de caseinasa (proteasa que degrada la caseína, proteína presente en la leche) en agar leche descremada. La literatura reporta que las proteasas son enzimas útiles en el mejoramiento de las características organolépticas de quesos o en el mejoramiento de otros productos comerciales derivados de leche como yogurt, o de bebidas energéticas; pero también tienen una gran importancia como aditivos en la industria de detergentes (Haddar, 2009). Es importante señalar que la región Cajamarca es una de las principales regiones del Perú que produce leche y productos derivados.

Un grupo particular de bacterias adaptadas a elevadas temperaturas lo constituyen algunos géneros grampositivos formadores de endospora como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Geobacillus*. Estas bacterias además de ser reportadas como parte integrante de la microbiota termófila en fuentes termales en todo el mundo, se caracterizan por sus potenciales metabolitos, entre ellas la producción de enzimas hidrolíticas (Panda, Sahu y Tayung, 2013).

Por todas estas razones, encontramos en el Complejo Termal Baños del Inca un espacio natural poco perturbado antropológicamente que constituye un hábitat adecuado para el desarrollo de bacterias grampositivas esporuladas productoras de enzimas aún desconocidas, hechos que llevan a plantearnos que posibles especies de familia *Bacillaceae* aislables de las aguas del Complejo Turístico de Baños del Inca son productoras de proteasas.

Este trabajo tiene como principal objetivo el identificar especies de la familia *Bacillaceae* productoras de proteasas aisladas de aguas termominerales del Complejo de Baños del Inca en Cajamarca-Perú. Para ello es necesario conocer los parámetros fisicoquímicos de las aguas para comprender el entorno donde viven los bacilos, identificar morfológica y bioquímicamente las bacterias termófilas formadoras de endospora y, finalmente, identificar molecularmente las especies productoras de proteasas de la familia *Bacillaceae* presentes en el agua.

El hallazgo de bacterias que producen proteasas termoestables constituye una base para la creación de una línea de investigación en microorganismos productores de enzimas termoestables en Cajamarca y representa un antecedente favorable para el desarrollo de empresas dedicadas a la obtención de enzimas termoestables, que aprovechen el potencial de las aguas termominerales no solo como atractivo turístico, sino también como fuente de sistemas biológicos con potencial biotecnológico.

Las limitaciones principales del trabajo se relacionan con el aislamiento y el cultivo microbiano de todas las especies de la familia *Bacillaceae*, puesto que podrían existir especies e inclusive géneros que no se pueden cultivar en el laboratorio como las bacterias del género *Chloroflexi* y *Tepidimonas*, presentes en aguas termales (Xian *et al.*, 2020). Por el contrario, en este trabajo solo fue posible, mediante procedimientos de microbiología convencional, aislar bacterias de los géneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus* y *Aneurinibacillus*; los cuales presentan especies capaces de producir proteasas incluso variando la temperatura de incubación sin tener en cuenta factores como el pH, sustrato de crecimiento (Remigio, 2012) y cofactores como el calcio, factores que pudieron influenciar la producción de proteasas en las bacterias.

Para realizar esta investigación se colectaron muestras de agua de las pozas del Complejo Turístico Baños del Inca, las cuales fueron inoculadas en caldo de enriquecimiento e incubadas por 7 días a 55°C. Para seleccionar las bacterias termófilas productoras de proteasas se realizó un tamizaje mediante una prueba de hidrólisis. Posteriormente, los aislados se caracterizaron mediante pruebas microbiológicas estándar y se evaluó la producción de proteasas a 40, 45, 50, 55, 60 y 65°C. Finalmente, se extrajo ADN mediante shock térmico y se amplificó el gen 16S ARNr a fin de secuenciar e identificar los aislados.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

En Armenia, en el año 2017, Panosyan usando el método de análisis de 16S ARNr en microorganismos aislados de aguas y sedimento de fuentes geotermales, encontró 135 cepas de bacilos termófilos y termotolerantes de los géneros *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina*, *Ureibacillus* y *Thermoactinomyces*; la temperatura óptima de crecimiento para termófilos obligados oscila entre 60 - 65°C, mientras que para los termotolerantes, 55°C; el pH óptimo de crecimiento se halla entre los rangos de 6.5-8.5. Concluyeron que de los microorganismos termófilos obligados *Geobacillus* y *Anoxybacillus* son los géneros dominantes; por otro lado, *Bacillus* es el género dominante dentro del grupo de los termotolerantes y *B. licheniformis* es la especie con más presencia en este grupo. Además, se reportaron cepas productoras de lipasas, proteasas, amilasas (Panosyan, 2017).

En Turquía, en el año 2009, Adiguzel *et al* usando métodos de fenotipificación (ácidos grasos), genotipificación (16S ARNr) y rep-PCR huella genómica en células bacterianas obtenida a partir de agua y lodo de fuentes termales, encontró 15 cepas de forma bacilar, móviles, termófilas moderadas, formadoras de spora, pertenecientes a los géneros *Geobacillus*, *Anoxybacillus* y *Bacillus* en dichos hábitats, concluyendo que sus pH y temperatura óptimos son 7.5-10 y 56° C respectivamente, capaces de crecer bajo concentraciones de 2-4% de sal. Concluyeron que la huella rep-PCR y el 16S ARNr son técnicas potentes para identificar y caracterizar cepas bacterianas (Adiguzel *et al.*, 2009).

En Arabia Saudi, en el año 2017, El-Gayar *et al.* analizaron microbiológicamente dos fuentes termales empleando la técnica de huella fenotípica (Phenotypic Fingerprint) determinando la presencia de los siguientes microorganismos termófilos: *Brevibacterium linens* y *Bacillus subtilis*, productoras de proteasas y amilasas con aplicaciones biotecnológicas. Demostraron que a 50°C se produjo la mayor cantidad de proteasas, mientras que la producción de amilasas fue superior a 30°C. Asimismo, encontraron que el ion calcio aumenta la producción de proteasas (El-Gayar, Al Abboud y Essa, 2017). Aún es necesario evaluar la producción de las proteasas bajo diferentes sustratos y en diferentes rangos de pH.

En Jordania, en el año 2017, Mohammad analizó 10 cepas microbianas provenientes de aguas termales mediante la técnica de análisis de 16 S ARNr, determinando que 9 de ellas identificadas como *Bacillus licheniformis* y la restante como *Thermomonas hydrothermalis*, productoras de proteasas y gelatinasas, enzimas con un gran potencial biotecnológico (Mohammad, 2017). Por otro lado, no se concluyó a qué temperatura y pH se produce mayor cantidad de enzimas.

En Indonesia, en el 2019, Ginting aisló 16 bacterias termófilas productoras de proteasas a partir de muestras de aguas termales marinas, las cuales produjeron halos de hidrólisis a 65 °C, cinco de ellas fueron identificados molecularmente y se determinó que pertenecieron a las especies *Bacillus cereus*, *B. halotolerans*, *B. megaterium*, *Aneurinibacillus migulanus* y *Pseudomonas baleárica*. Él planteó que estos organismos cumplen un rol crítico en su nicho ecológico pues descomponen y mineralizan nutrientes contribuyendo al buen funcionamiento del ecosistema, especialmente en el ciclo del

nitrógeno ya que las bacterias productoras de proteasas descomponen restos orgánicos nitrogenados en péptidos y aminoácidos, los que son tomados por otras bacterias para realizar los procesos de amonificación, nitrificación y desnitrificación (Ginting, 2020).

En India, en el 2012, Panda *et al* empleó la técnica de análisis de 16S ARNr en una cepa productora de proteasas aislada del sedimento de fuentes termales, identificando una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* capaz de crecer a 90°C. Se estudió su contenido de GC concluyéndose que es superior al contenido de mesófilos, pero inferior al de hipertermófilos (Panda, Sahu y Tayung, 2013). En este estudio hace falta evaluar la producción de las proteasas a diferente temperatura, pH, sustratos.

En Ecuador, en el 2017 Andueza y su equipo analizaron fuentes termales empleando técnicas de análisis metagenómico reportando la presencia de hongos y bacterias termófilas. Las bacterias gramnegativas tuvieron mayor presencia y pertenecían a los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas*. Por otro lado, se identificaron escasos géneros de bacterias grampositivas, *Bacillus* y *Staphylococcus*. Pero, ambos grupos eran productores de enzimas amilolíticas, celulíticas, lipolíticas, proteolíticas y degradadoras de derivados de hidrocarburos (Andueza, 2018). Sin embargo, no se evaluó el efecto de la temperatura, el pH en la producción de las enzimas.

En Perú, en la región Tacna se asilaron 2 bacterias productoras de proteasas a partir de sedimentos de geiseres en Candarave (Naquiche, Zúñiga y Ferrer, 2015), luego mediante el análisis de secuencias del gen 16S ARNr fueron identificadas como *Bacillus licheniformis* con un 99% de porcentaje de similitud y *Geobacillus thermoparaffinivorans*

con un 99% de porcentaje de similitud. Por un lado, *Bacillus licheniformis* produjo un halo de hidrólisis de 46mm a 50 °C mientras que *Geobacillus thermoparaffinivorans* generó un halo de 85 mm a 60 °C. El pH óptimo de la actividad proteolítica se encontró entre 7.7 y 8.0.

2.2 Bases teóricas (Marco teórico y conceptual)

2.2.1 Fuentes termominerales

La biotecnología tomó un nuevo rumbo luego del descubrimiento de la bacteria *Thermus aquaticus*, aislada de aguas termales del Parque Nacional de Yellowstone por Thomas Brock capaces de crecer a 70 °C, de la cual posteriormente se aisló una polimerasa termoestable cuyo efecto repercutirá en la mejora de la PCR. Con el pasar de los años se han descubierto nuevas especies aisladas de aguas termales (Pentecost, Jones y Renaut, 2003) que poseen enzimas termoestables con diversas aplicaciones biotecnológicas (Gupta, 2017). Los diferentes minerales procedentes del arrastre que genera el agua en el interior terrestre son nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de ciertos microorganismos, y es gracias a la exposición a estos sustratos químicos que desarrollan metabolitos con una gran prospección biotecnológica (Haki y Rakshit, 2003).

2.2.2 Microorganismos termófilos y mecanismos de adaptación a altas temperaturas

Son organismos que no solo toleran altas temperaturas, 50 – 121°C, si no que requieren de estas condiciones para crecer y sobrevivir. Pueden ser aislados a partir de fuentes termales o del mar profundo (Mohammad, 2017). Se clasifican en termófilos moderados

(40 – 60°C), extremotermófilos (60 – 85°C) e hipertermófilos (superiores a 85°C) (Mehta y Satyanarayana, 2013).

Los microorganismos termófilos han desarrollado y combinado diferentes estrategias para combatir los efectos de la temperatura en sus componentes celulares, así se tiene:

Solutos compatibles: Conocidos también como termosolutos son compuestos que se encuentran en altas concentraciones en el citoplasma de termófilos y están cargados negativamente. Protegen enzimas, ácidos nucleicos y moléculas termolábiles como el ATP de la desnaturalización térmica.

Estabilización de proteínas: Las proteínas necesitan conservar su estructura tridimensional y la integridad de su centro activo para mantener su estabilidad. Para lograrlo, las proteínas de termófilos poseen superficies más polares, núcleo más apolar y mejor empaquetado, un mayor número de interacciones iónicas, puentes disulfuro y optimización de estructuras secundarias en comparación con las proteínas mesófilas. En resumen, las proteínas son más pequeñas con un núcleo hidrofóbico muy compacto con mínimas cavidades internas y sin bucles externos.

Los termófilos poseen proteínas conocidas como chaperoninas, las cuales son termoestables, resistentes a la desnaturalización y proteólisis, que se encargan de restaurar el plegamiento y la función de las proteínas que han sufrido daños o alteraciones por el calor (Haki y Rakshit, 2003).

Modificaciones de membranas celulares: Los lípidos poseen un papel muy importante en los termófilos dado que deben adaptarse a las fluctuaciones de la temperatura del ambiente sin perder su estabilidad química y deben evitar disolverse por las altas temperaturas, crean ambientes hidrofóbicos y mantienen rígida a la célula para sobrevivir en altas temperaturas.

La termoadaptación de las membranas en arqueas se debe a la unión de hidrocarburos ramificados al glicerol mediante enlaces éter; en hipertermófilos la bicapa se sustituye por una monocapa de cadenas transmembrana de fitanil (C₄₀) que cubre todo el ancho de la membrana; y en bacterias termófilas las membranas se fortalecen al aumentar la cantidad de ácidos grasos saturados y mientras más ramificados sean, mayor será la elevación de los puntos de fusión (Madigan, 2015).

Estabilización de ácidos nucleicos: El ADN de los microorganismos en general sufre daños significativos cuando se sometido a temperaturas altas, los efectos se manifiestan como desnaturalización de su arquitectura, incremento de la unión covalente de metabolitos reactivos o alteración química de sus componentes; además, un alto contenido de guanina citocina no impide el daño por efecto del calor.

En termófilos son las altas concentraciones de sales, la unión de proteínas catiónicas en arqueas y mecanismos de reparación del ADN quienes impiden la degradación o el deterioro de la molécula. En bacterias hipertermófilos y algunos termófilos la responsable de proteger al ADN es una topoisomerasa especial conocida como ADN girasa reversa, capaz de introducir superenrollamientos positivos en el ADN.

Por otro lado, la protección del ARN está relacionada a modificaciones post-transcripcionales y a un alto contenido de guanina citosina en la estructura secundaria (Ferrerías, 2011).

2.2.3 Bacterias termófilas de la familia *Bacillaceae*

La familia *Bacillaceae* es un taxón del phylum *Firmicutes*, que incluye a bacterias grampositivas caracterizadas por tener forma bacilar y por producir cuerpos de resistencia conocidos como endosporas. La mayoría de los miembros de este grupo viven en el suelo bajo la forma de endosporas, pero también están presentes en aguas termales gracias a que desarrollaron adaptaciones a altas temperaturas como alteración de membrana o mejor plegamiento de proteínas; al vivir bajo estas condiciones las enzimas que producen son termoestables. Los géneros más representativos de esta familia corresponden a: *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Halobacillus*.

Bacillus es uno de los géneros más representativos de la familia *Bacillaceae*. Estos bacilos -4 a 10um-, grampositivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos, productores de esporas -centrales en *B. licheniformis* o subterminales como en *B. subtilis* (Reimer, 2018). Esta última característica es llamativa debido a que les confiere resistencia a condiciones desfavorables; destacando su termorresistencia, motivo por el cual es un indicador de esterilidad. Ya que este género presente múltiples especies se la clasifica en subgrupos, así tenemos: *B. polymyxa*, *B. subtilis* (que incluye a *B. cereus* y *B. licheniformis*), *B. brevis* y *B. anthracis*. Así pues, son escasos las especies que producen daño a los seres humanos, como es el caso de *B. cereus* que produce toxinas eméticas y disentéricas, aunque estos efectos se manifiestan en su mayoría en pacientes inmunodeprimidos (Bartram, 2004). También se debe considerar a *B. anthracis* que produce carbunco tanto en animales como

en personas. Otras especies como *B. thuringiensis* tienen un efecto fitopatógico. Además, existen aquellas que producen antibióticos como la bacitracina, secretada por *Bacillus subtilis* (Bergey, 2009; Dowd, 2017).

Geobacillus es otro género cuyas especies estuvieron asociadas al género *Bacillus*, pero, que tras análisis de ADN ribosomal se determinó que eran filogenéticamente diferentes. Este género de bacilos termófilos – 2 a 4 um- forman esporas subterminales y terminales, presentan movilidad y poseen flagelos peritricos, son quimiorganótrofos (Reimer, 2018). Entre sus especies representativas destacan *G. stearothermophilus* empleado en el control de calidad de procesos de autoclavado, asimismo *G. thermoglucosidasius* productor de xilanasas termoestables (Brumm, 2015). Las bacterias de este género pueden producir amilasas, xilanasas, proteasas y lipasas (Tayyab, Rashid y Akhtar, 2011).

2.2.4 Enzimas bacterianas termoestables

Una enzima es un catalizador de origen biológico, es decir, una molécula capaz de disminuir la energía de activación de una reacción química aumentando la velocidad de reacción, es de naturaleza proteica y no sufre alteración durante su accionar (Madigan, 2015). Sin embargo, su cinética puede verse afectada por la temperatura, el pH, la concentración de sustrato.

Los microorganismos extremófilos poseen enzimas que funcionan a temperaturas superiores a 100°C (Suarez, 2002), estas enzimas son termoestables y son importantes catalizadores en las fermentaciones industriales, procesos o tecnologías que hacen uso de microorganismos o de sus productos (Lagarda, 2006). Su empleo mejora algunas

características como la textura en los productos de la industria de alimentos (amilasas, proteasas) o contribuyen con la obtención de la materia prima como en la industria del papel (celulasas).

Las enzimas termoestables se clasifican en tres grupos: las de clase I son estables a temperaturas de síntesis de 55 – 65°C, pero inactivas a temperaturas superiores; las de clase II son enzimas inactivas a temperaturas de síntesis a menos que el sustrato esté presente; y las de clase III son enzimas altamente resistentes al calor y estables a temperatura superior a la de síntesis (Forero, 2017).

Las enzimas termoestables poseen muchas ventajas, en primer lugar, estas enzimas están mejor adaptadas a procesos industriales que demandan temperaturas elevadas. Además, poseen mayor resistencia a solventes orgánicos, pH y detergentes. Por otro lado, disminuyen la posibilidad de contaminación de mesófilos, al aumentar la temperatura (Ferrerías, 2011). Presentan mayor estabilidad y vida media, por lo que su reposición en los procesos disminuye. Finalmente, permite emplear temperaturas que aumenten el coeficiente de difusión del sustrato, disminuyendo la viscosidad de este, aumentando el rendimiento causado por el incremento de la solubilidad de sustratos y productos, favoreciendo la formación de productos (Haki y Rakshit, 2003).

2.2.5 Proteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos de proteínas; poseen una gran diversidad de usos en la industria: detergentes, curtiembre, en la industria de alimentos emplean proteasas neutras ya que producen menos amargura en

los productos, además también son utilizados en la producción de cosméticos y el diagnóstico médicos (Panda, Sahu y Tayung, 2013); motivo por el cual constituyen el 60% del mercado mundial de enzimas.

Según el pH óptimo de acción, se tiene proteasas neutras que tiene una alta afinidad por aminoácidos hidrofóbicos – con radicales no polares como la alanina, la leucina, la isoleucina, la valina, la prolina, la fenilalanina, el triptófano y la metionina-. Las proteasas alcalinas, presentan mejor rendimiento en pH básico y su temperatura óptima se presenta a 60°C (Rubiano, 2006); por otro lado, se encuentran las proteasas ácidas que se desempeñan exitosamente en pH ácidos. De acuerdo a una clasificación adicional según el sitio de acción se tiene endopeptidasas y exopeptidasas. Las exopeptidasas rompen los enlaces peptídicos más próximos a los extremos terminales amino o carboxilo, criterio para subclasificarlas en aminopeptidasas y carboxipeptidasas. Las endopeptidasas rompen los enlaces peptídicos distantes de los extremos terminales, se subclasifican según el grupo funcional que está presente en el sitio activo de la enzima: serinproteasas, aspárticoproteasas, cisteínproteasas y metaloproteasas (Sawant y Nagendran, 2014; Gomri, 2018).

2.2.6 Gen 16S ARNr

El gen 16S ARNr codifica la subunidad menor de los ribosomas procariotas, posee un peso molecular aproximado de 1500 pb; es poseedor de secuencias conservadas y no conservadas o hipervariables, sus nueve regiones hipervariables (V1-V9) suministran información útil para estudios de filogenética y por eso es empleado como un marcador molecular para la identificación bacteriana debido a que contiene variabilidad y

divergencia genética significativa a nivel de especie, posee sitios conservados y una longitud ideal para secuenciar de forma sencilla, precisa y reproducible (Valenzuela-gonzález, 2015).

El gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa, ha comenzado a tener participación en análisis filogenéticos e identificación de bacterias, especialmente cuando se estudian aislamientos estrechamente relacionados. Junto con el gen 16S ARNr, el *rpoB* ha ayudado a delinear nuevas especies bacterianas y refinar el análisis de la comunidad bacteriana (Costa Torres, 2013).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por los microorganismos presentes en las muestras de agua colectadas de las pozas del Complejo Turístico Baños del Inca. La unidad de análisis de este proyecto estará constituida por cada una de las bacterias termófilas que crezcan sobre los medios de cultivo empleados en el laboratorio.

3.2 Lugar de muestreo

El Complejo Turístico Baños del Inca está ubicado en el distrito de Baños del Inca a 15 minutos de la ciudad de Cajamarca, provincia y región de Cajamarca, Perú, comprende un conjunto de pozas de uso privado, piscinas y servicios de tratamiento terapéutico (Ministerio de Comercio Exterior y Turismo, 2017). Su geolocalización corresponde a una latitud de -7.16667 , una longitud de -78.4636 $7^{\circ} 9' 42''$ Sur, $78^{\circ} 27' 49''$ Oeste y una altitud de 2 667 m.s.n.m. La temperatura en torno al Complejo Turístico Baños del Inca oscila entre 3 y 22°C; presenta una humedad relativa de 65% durante el año; sin embargo, los meses de julio, agosto y setiembre son los meses de menor humedad (Municipalidad Distrital de Los Baños del Inca, 2017). Sus aguas pertenecen a la familia de las cloruradas (98 – 101 mg/L), con temperatura de 68 - 71 °C y pH de 6.6 -7.1. Por su temperatura y pH son aguas profundas, que se mezclan con aguas subterráneas, motivo por el cual presenta una baja concentración de Cl y Na (Huamaní, 2000).

3.3 Toma de muestra de agua de la fuente termal de El Complejo Turístico Baños del Inca

Para la toma de muestra se utilizó la metodología descrita por (American Public Health Association, 1999). Se colectaron 10 muestras de agua (350 mL cada una) en frascos estériles de 450 mL de capacidad con tapa rosca. Estas muestras fueron tomadas de cada una de las pozas (espacio cercado por donde brota agua caliente), a una profundidad de 10 cm bajo la superficie. Se determinó la temperatura y pH de los puntos de muestreo, utilizando un termómetro de canastilla y un pH-metro calibrado. Estas muestras fueron rotuladas de acuerdo al número de pozas previamente asignado y posteriormente trasladadas en caja de tecnopor hasta el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Biología y Biotecnología de la Universidad Nacional de Cajamarca. El tiempo estimado del transporte de las muestras fue de 15 minutos.

3.4 Caracterización físico química de las aguas de la fuente termal del complejo turístico Baños del Inca

Se determinó la concentración de iones en el agua de la fuente termal del Complejo Turístico Baños del Inca. La empresa SGS – Perú con sede en la ciudad de Cajamarca fue la responsable de realizar la caracterización, para ello utilizó espectrofotometría de absorción atómica. Para el análisis se preparó un frasco estéril con agua compuesta por las 10 muestras y se acidificó a un pH de 3.0 con ácido nítrico 1 N, de esta forma se entregó a la empresa para el análisis.

3.5 Aislamiento de las bacterias de agua de fuente termal

Se tomaron 100 mL de agua de cada frasco, luego se mezcló y homogenizó cada muestra de agua con 100 mL de medio de enriquecimiento estéril en un matraz de 500 mL de

capacidad, conformado por extracto de levadura (1.5%), sulfato de magnesio (0.01%), cloruro de sodio (0.1%) y fosfato monobásico de potasio (0.1%) y agua de la fuente esterilizada para enriquecer el medio (Andueza, 2018). La mezcla se agitó por 2 minutos y se incubó a 55°C por 7 días.

Después del paso de enriquecimiento, se procedió a homogenizar el cultivo por agitación manual por un periodo de 5 minutos, para posteriormente ser expuestos a 80 °C por 10 minutos para seleccionar bacterias formadoras de esporas (Panosyan, 2017). Luego, se continuó con el aislamiento, previa dilución seriada hasta 10^{-3} , inoculando por agotamiento, con un asa bacteriológica en anillo graduada (10 uL), de las dos últimas diluciones en placas con Agar Leche. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 55 °C por 48 horas. Se reportó como bacterias productoras de proteasas a aquellas colonias que presentaron halo de hidrólisis alrededor de la colonia. Las colonias fueron subcultivadas de dos a tres veces de forma sucesiva para aislar las bacterias y garantizar su pureza. Finalmente, suspensiones turbias del cultivo fueron conservadas en ultracongelación (-86°C) empleando glicerol como crioprotector; además se conservaron cultivos en viales con agar nutritivo a 4 °C, para su posterior análisis.

3.6 Caracterización microbiológica

Los aislados bacterianos fueron cultivados en 5mL de caldo nutritivo (suspensión bacteriana), se sembró por picadura cada aislado, en agar nutritivo y se incubó a 55 °C. Después de 24 horas, se realizó la descripción de la morfología de la colonia bacteriana, además, se determinó sus características tintoriales a través de las coloraciones Gram y Wirtz (para esporas) evaluando la presencia de bacilos grampositivos y esporulados,

respectivamente. Se caracterizaron bioquímicamente los aislados bacterianos utilizando los medios diferenciales TSI, LIA, agar citrato de Simmons y agar SIM para evaluar la capacidad de fermentar azúcares, decarboxilar la lisina, utilizar el citrato como única fuente de carbono y evidenciar movilidad, respectivamente. La incubación durante estas evaluaciones fue a 55 °C por 24 horas.

3.7 Determinación de la actividad enzimática

Se reactivaron los aislados en agar nutritivo a 45 °C por 24 horas. Luego, se inoculó cada aislado en agar leche descremada (5%) y se incubó a diferentes temperaturas (40, 45, 50, 55, 60 y 65 °C) por 48h. Posteriormente, al observarse la aparición de halos de hidrólisis alrededor de colonias se evidenció la actividad proteolítica. La actividad proteolítica fue medida, restando al diámetro del halo de hidrólisis, el diámetro de la colonia (en milímetros). Esta evaluación se realizó a cada aislado bacteriano caracterizado previamente, por duplicado, utilizando un vernier (Mohammad, 2017).

3.8 Extracción de ADN mediante shock térmico

El ADN genómico fue extraído de cada aislado bacteriano, previamente cultivado en agar nutritivo por un tiempo de 18 a 24 horas. En un microtubo de 1.5 mL (estéril y de primer uso) se adicionó 150 µL de agua grado molecular y se incorporaron un número de entre 6 a 8 colonias. Luego, los microtubos fueron sellados y se los expuso a 95 °C en baño maría por 15 minutos, para posteriormente ser congelados a -20°C por 10 minutos y ser centrifugados a 10 000 rpm por 10 minutos. Se tomaron 80µL de cada sobrenadante de cada aislado bacteriano y se los conservó a -20°C hasta realizar la reacción en cadena de

la polimerasa (PCR). La calidad y concentración de ADN fue medida en NanoDrop a una longitud de onda entre 240 y 260 nm (Hernandez, Lobo, Martínez, 2009).

3.9 Amplificación del gen 16S ARNr

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S ARNr, fueron utilizados los iniciadores universales 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA-3') y 1492r (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') (Lane, 1991; Green y Sambrook, 2012); para ello se preparó un master mix de PCR a partir del kit KOD Hot Start DNA Polymerase (Toyobo – Millipore). La composición de cada reacción fue: 5 uL de buffer 10x, 3 uL de MgSO₄ 25 mM, 5 uL de dNTPs 20 mM, 1.5 uL del forward 10 uM, 1.5 uL del reverse 10 uM, 1 uL de ADN polimerasa, 1 uL de ADN templado y se completó hasta 50 uL con agua grado molecular. Los tubos fueron colocados en el termociclador Bio-Rad, las condiciones de termociclado iniciaron con la activación de la polimerasa a 95°C por 2 min seguido de 35-38 ciclos de: desnaturalización del templado a 95°C por 20 s, hibridación de los iniciadores a la temperatura Melting más baja de los primers (54°C x 30 s) y extensión a 70°C por 20 s. Finalmente, una extensión final a 70°C por 5 min.

3.10 Detección del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización en gel de los productos de PCR se utilizó la metodología descrita por Green y Sambrook (2012) en un sistema de electroforesis horizontal. Se preparó agarosa al 1% con buffer TBE 0.5x y 5 uL de colorante SYBR-Safe para teñir el gen de interés. La mezcla homogenizada fue adicionada al molde de electroforesis horizontal y dejada enfriar para obtener el gel. Tras colocar el gel en la cubeta de electroforesis horizontal, se mezcló 5 uL de cada producto de PCR con 1 uL de *loading* buffer, luego

se inoculó en el carril respectivo del gel. Paralelamente se corrió un marcador de peso molecular de 100 pb. El corrido electroforético fue a 100 V, 500 mA, por 30 minutos. Las bandas generadas fueron observadas en un transiluminador de luz UV.

3.11 Secuenciación del gen 16 S ARNr e identificación de la especie

Los productos de PCR del gen 16S ARNr de los aislados bacterianos grampositivos obtenidos, con perfil de producción de halos de hidrólisis, fueron secuenciados bidireccionalmente mediante el método Sanger en Macrogen (Korea). Las secuencias parciales del gen 16S ARNr obtenidas fueron sometidas a análisis mediante la herramienta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Altschul *et al.* 1990; Altschul *et al.* 1997) para determinar las especies bacterianas más cercanas a cada uno de los aislados. Secuencias del gen 16S ARNr de las especies cercanas con porcentajes de similitud mayor a 99 % fueron recuperadas de la base de datos de nucleótidos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) del NCBI, e incorporadas en un archivo multi-FASTA junto con las secuencias *query* (secuencias obtenidas en este estudio); todas las secuencias se alinearon y editaron con el programa AliView (Larsson, 2014). Finalmente, para establecer las relaciones filogenéticas y la construcción del árbol filogenético se empleó el programa bioinformático MEGA 10.2 (Dudley y Kumar, 2007), utilizando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987) con 500 bootstrap y valores preestablecidos en el programa.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis físico químico del agua del Complejo Termal Baños del Inca

Se determinó que la temperatura promedio del agua de las pozas fue de 70 °C y tuvo pH promedio de 6.7. El análisis químico del agua arrojó las concentraciones de diferentes elementos metálicos cuyos resultados se aprecian en la tabla 1 y en el apéndice 17.

Tabla 1. Principales elementos presentes en las aguas de la fuente termal del Complejo Turístico Baños del Inca y sus concentraciones.

Elemento	Concentración (mg/L)	Concentración (mM)
Aluminio Total	<0.003	<0.0001
Bario Total	0.1411 ± 0.0127	0.001
Cadmio Total	<0.00003	<0.000001
Calcio Total	47.388 ± 4.739	1.18
Cobalto Total	<0.00003	<0.000001
Cobre Total	<0.00009	<0.00002
Estaño Total	<0.00010	<0.0001
Magnesio Total	6.962 ± 0.835	0.29
Manganeso Total	0.27449 ± 0.01921	0.005
Mercurio Total	<0.00009	<0.0000004
Sodio Total	123.147 ± 13.546	5.35
Zinc Total	0.0148 ± 0.0015	0.0023

Los resultados presentados en la tabla 1 nos muestran las condiciones químicas del hábitat de la microbiota presente en la fuente termal de interés, donde habitan las especies bacterianas formadoras de endospora y productoras de proteasas que se han aislado en este trabajo. Se detectaron concentraciones elevadas de sodio (123.147 mg/L), calcio

(47.38 mg/L) y magnesio (6.96 mg/L) lo que nos indica que el agua es dura, muy similar a las descritas en otras fuentes termales cajamarquinas, reportadas por INGEMET (Huamaní, 2000). Lo resaltante es que estos elementos se encuentran asociados a sales y pueden estar a disposición de los microorganismos para ser utilizados como un suministro de cofactores enzimáticos (Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2}), asociados en la estabilidad de la membrana celular (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+}).

4.2 Características microbiológicas de los aislados bacterianos

Se aislaron 14 bacterias de interés con características morfológicas diferentes de las aguas de las pozas del Complejo Termal Baños del Inca. La caracterización microbiológica de los aislados bacterianos revela que las colonias obtenidas tienen borde irregular en algunos casos, y en otros es regular, la mayoría son de color crema, y todas se presentan como bacilos grampositivos formadores de endospora con diferentes ubicaciones dentro de la célula vegetativa (Tabla 2). La caracterización microbiológica se realizó en agar nutritivo y la observación microscópica se realizó a 100x utilizando aceite de inmersión.

Tabla 2. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias aisladas del Complejo Turístico Baños del Inca.

Codificación del aislado bacteriano	Borde de la colonia	Color	Gram	Espora
K1	Irregular	Crema	+	Central deformante
K2b	Irregular	Marrón	+	Subterminal deformante
K3a	Regular	Crema	+	Central deformante
K3c	Regular	Crema	+	Central deformante
K5	Regular	Crema	+	Central deformante
K6	Irregular	Crema	+	Central no deformante
K9	Irregular	Crema	+	Central deformante
K10	Irregular	Crema	+	Central deformante
2K1a	Regular	Rosado	+	Terminal no deformante
2K1b	Regular	Amarillo	+	Terminal deformante
2K1c	Irregular	Crema	+	Central deformante
2K5a	Irregular	Crema	+	Subterminal deformante
2K8a	Regular	Crema	+	Subterminal deformante
2K10b	Arborescente	Crema	+	Central deformante

Los resultados descritos en la tabla 2 muestran que todas las bacterias de interés fueron grampositivas formadoras de endospora. Estos resultados pueden ser explicados en parte por la exposición de las muestras de agua colectadas a un tratamiento térmico de 80 °C por 10 minutos, en donde se estimula la expresión de esta característica, la misma que en general suele ser el mecanismo o forma celular bacteriana mediante el cual algunas bacterias resisten a condiciones extremas; cabe mencionar que también se aislaron bacterias gramnegativas y grampositivas no formadoras de endospora que, dado los fines de esta investigación, no han sido descritas. Parte de la caracterización de este tipo de bacterias se hace también describiendo la disposición de la endospora, como se muestra en la información descrita en la tabla 2 (espora terminal, subterminal, central/ deformante o no deformante); toda la información en su conjunto sirve para caracterizarlas de mejor forma. Dentro de las bacterias formadoras de endospora se encuentran los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus* y *Clostridium*.

4.3 Identificación bioquímica de los aislados bacterianos

En la tabla 3 se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas orientadas a la identificación de los 14 aislados bacterianos. Las pruebas utilizadas tienen como base observar la utilización de sustratos específicos, por ejemplo, fermentación de azúcares en los medios TSI (glucosa, lactosa y sacarosa), KIA (glucosa y lactosa) y caldo con sacarosa, decarboxilación de la lisina en el medio LIA, utilización del citrato como fuente de carbono en medio citrato de Simmons y, en el caso del medio SIM, detectar principalmente la movilidad bacteriana (evidencia de flagelo). Estas pruebas fueron realizadas a 55 °C por 24 horas.

Tabla 3. Caracterización microbiológica de aislados de la fuente termal del Complejo Turístico Baños del Inca.

Aislado	Pruebas bioquímicas					
	Utilización de citrato	Fermentación de carbohidratos			Decarboxilación de lisina	Movilidad
		Glucosa	Sacarosa	Lactosa		
K1	No	Sí	No	No	No	No
K2b	No	Sí	No	No	No	No
K3a	No	Sí	No	No	No	No
K3c	No	Sí	No	No	Sí	No
K5	No	Sí	No	No	Sí	No
K6	No	Sí	No	No	Sí	No
K7	No	Sí	No	No	Sí	No
K9	No	Sí	No	No	Sí	No
K10	No	Sí	No	No	Sí	No
2K1a	Sí	Sí	No	No	Sí	No
2K1b	No	Sí	No	No	Sí	No
2K1c	No	Sí	No	No	Sí	No
2K5a	No	Sí	No	No	No	No
2K8a	No	Sí	No	No	Sí	No
2K10b	No	Sí	No	No	No	Sí

4.4 Evaluación de la actividad proteasa de los aislados bacterianos

En la figura 1 se aprecia de forma general el diámetro de los halos hidrólisis en agar leche, producidos por cada aislado a diferentes temperaturas. Se destaca la variación en los diámetros de los halos a diferentes temperaturas para cada uno de los aislados.

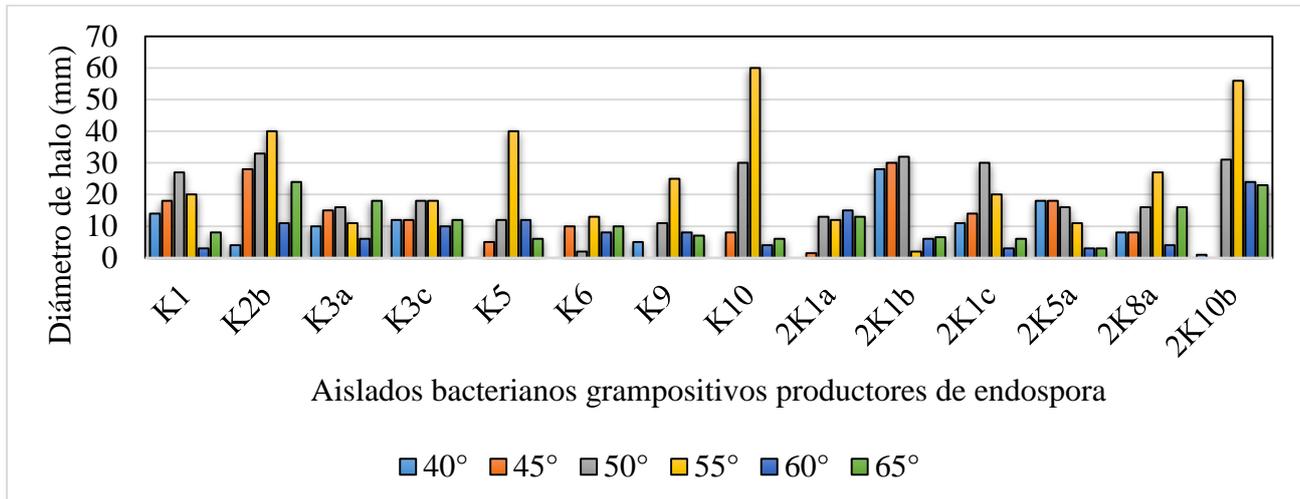


Figura 1. Variación de la actividad enzimática proteasa de los aislados bacterianos a diferentes temperaturas de incubación (40°C, 45 °C, 50°C, 55°C y 60°C).

A partir de la figura 1 se puede resaltar que el aislado K10 produjo un halo de hidrólisis de 60 mm en 48 horas a 55 °C, mostrando diferencia significativa en relación a las demás longitudes de diámetro de halo de hidrólisis ($p < 0.005$, apéndice 18). Los aislados 2K10b, K2b y K5 también mostraron halos de hidrólisis de diámetro importante. Los demás aislados degradaron el sustrato empleado (caseína), pero en menor escala, lo que indica en primer lugar que nos encontramos frente a géneros o especies diferentes con actividades enzimáticas variadas.

En la figura 2. se muestra la distribución de los aislados respecto de la temperatura óptima de actividad proteolítica.

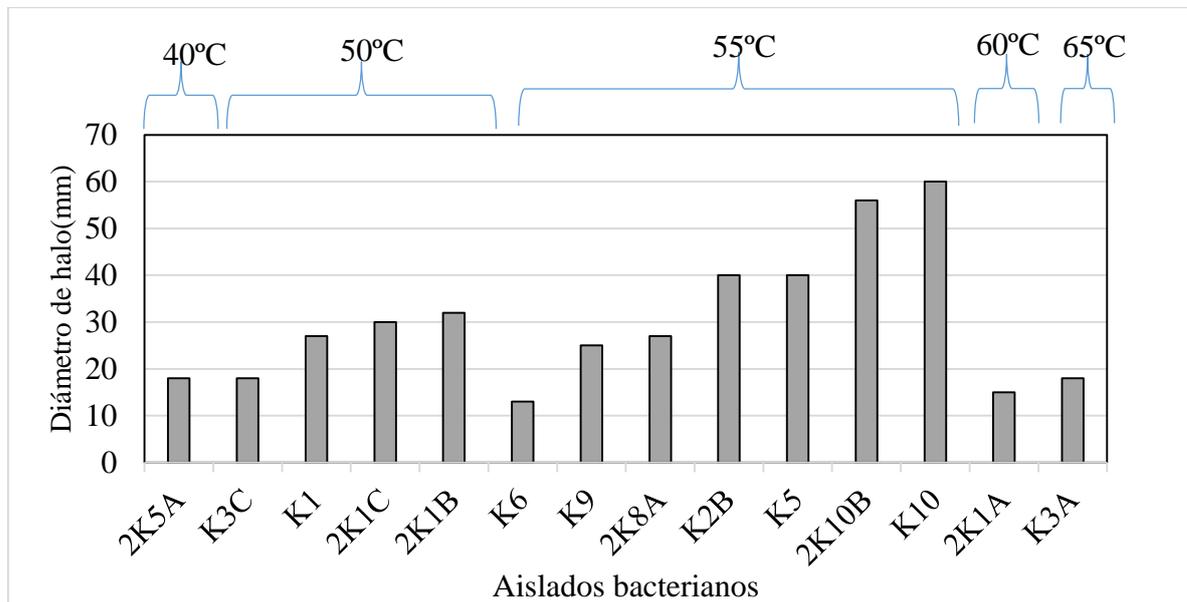


Figura 2. Temperatura óptima de actividad proteolítica de cada aislado.

Se detectaron las temperaturas óptimas para la actividad enzimática de las proteasas de las 14 especies bacterianas analizadas, mostrando en la mayoría de los casos una mayor actividad hidrolítica a temperaturas de 50 y 55°C. Esta figura nos resalta que no todas las bacterias pueden ser consideradas como atractivas desde el punto de vista industrial, por lo que el aislado K10, podría ser considerado para estos fines. Aunque definitivamente falta más investigación respecto de estos aislados, como la determinación de pH y el efecto de ciertos cofactores, nos brinda un panorama alentador.

4.5 Amplificación del gen 16S ARNr

En la figura 3 se muestra la amplificación de las secuencias del gen 16S ARNr para el dominio bacteria (1 500 pb). Este resultado confirma que todos los aislados caracterizados pertenecen al dominio bacteria.

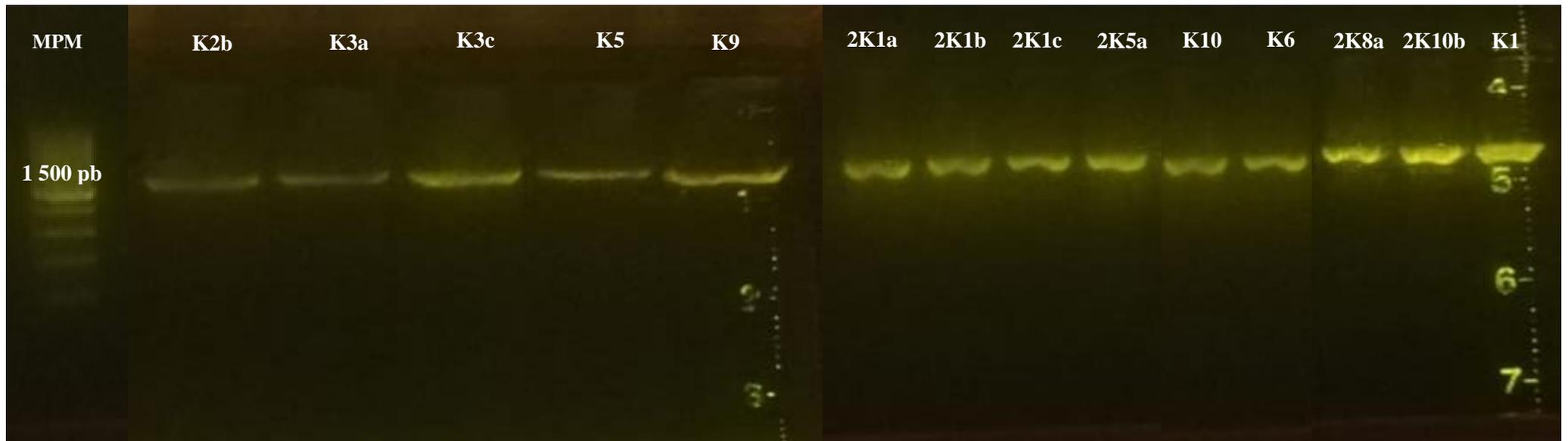


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, del gen 16S ARNr, marcador genético de bacterias. Se utilizó los oligonucleótidos universales 27F, 1492R. MPM: marcador de peso molecular, carril 1.

Tabla 4. Secuencias consenso analizadas con la herramienta BLAST-N del NCBI.

Código de aislado	Longitud	% de similitud	Cobertura	E valor	Posible especie bacteriana	N° de acceso Genbank
K1	1463	99.78	100%	0	<i>Anoxybacillus rupiensis</i> strain TS_04	KJ842629.1
K2b	1463	99.93	100%	0	<i>Anoxybacillus rupiensis</i> strain TS_04	KJ842629.1
K3c	1524	99.78	100%	0	<i>Brevibacillus borstelensis</i> strain Gp-1	MT292327.1
K9	1394	99.86	100%	0	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> strain Lhs-9	MH368249.1
K10	1524	99.92	100%	0	<i>Brevibacillus borstelensis</i> strain Gp-1	MT292327.1
2K1b	1428	99.86	100%	0	<i>Brevibacillus borstelensis</i> strain UICC B-78	LC107509.1
2K1a	1438	99.93	100%	0	<i>Geobacillus kaustophilus</i> strain ML-1	MT251494.1
K5	1232	99.74	100%	0	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> strain M5_4	MN330039.1
2K1c	1425	100	100%	0	<i>Brevibacillus</i> sp. B2	FJ268957.1
2K5a	1404	99.85	100%	0	<i>Bacillus licheniformis</i> strain NAST09	JX281697.1
2K8a	1394	100	100%	0	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> strain Lhs-9	MH368249.1

En la tabla 4 se muestra los resultados obtenidos con la herramienta de alineamiento local BLASTn, de las secuencias consenso del gen 16S ARNr de los aislados de este estudio, que fueron obtenidas después de la edición de las mismas en el programa Aliview. Los aislados K1 y K2b presentan secuencias 16S ARNr homólogas a la especie *Anoxybacillus rupiensis* strain TS_04, los aislados K3c, K10 a la especie *Brevibacillus borstelensis* strain Gp-1, y el aislado 2K1b a la especie *Brevibacillus borstelensis* strain UICC B-78;

el aislado 2K1c se homologa mejor a la especie *Brevibacillus sp. B2*, las cepas K9 y 2K8a a la especie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain Lhs-9, mientras que la cepa K5 a la especie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain M5_4; la cepa 2K1a se homologa mejor con la especie *Geobacillus kaustophilus* strain ML-1 y el aislado 2K5a con la especie *Bacillus Licheniformis* strain NAST09.

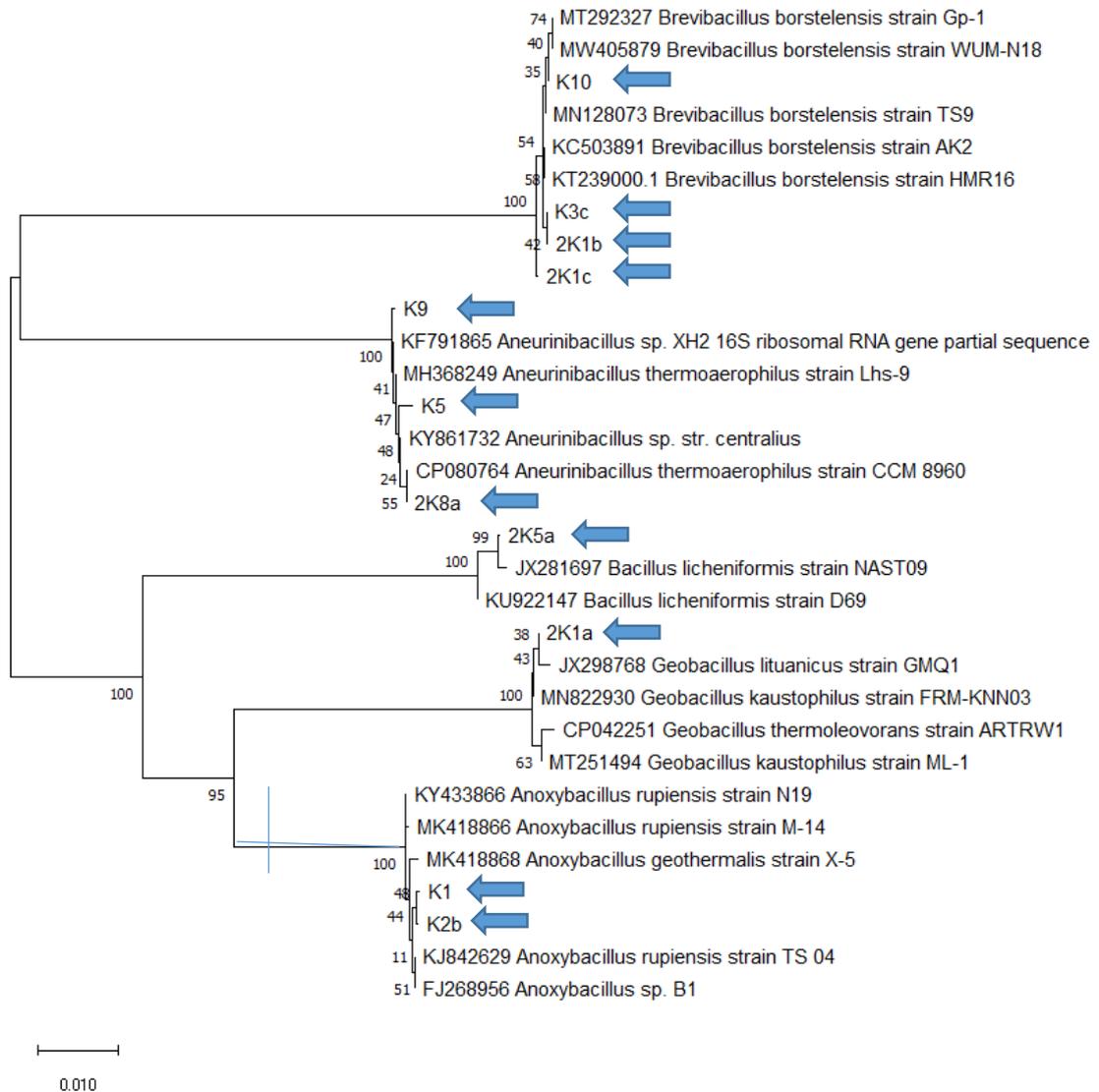


Figura 4. Filogenia de todos los aislados de este estudio (flechas) comparado con secuencias obtenidas del GenBank, los números de acceso se describen en el árbol filogenético.

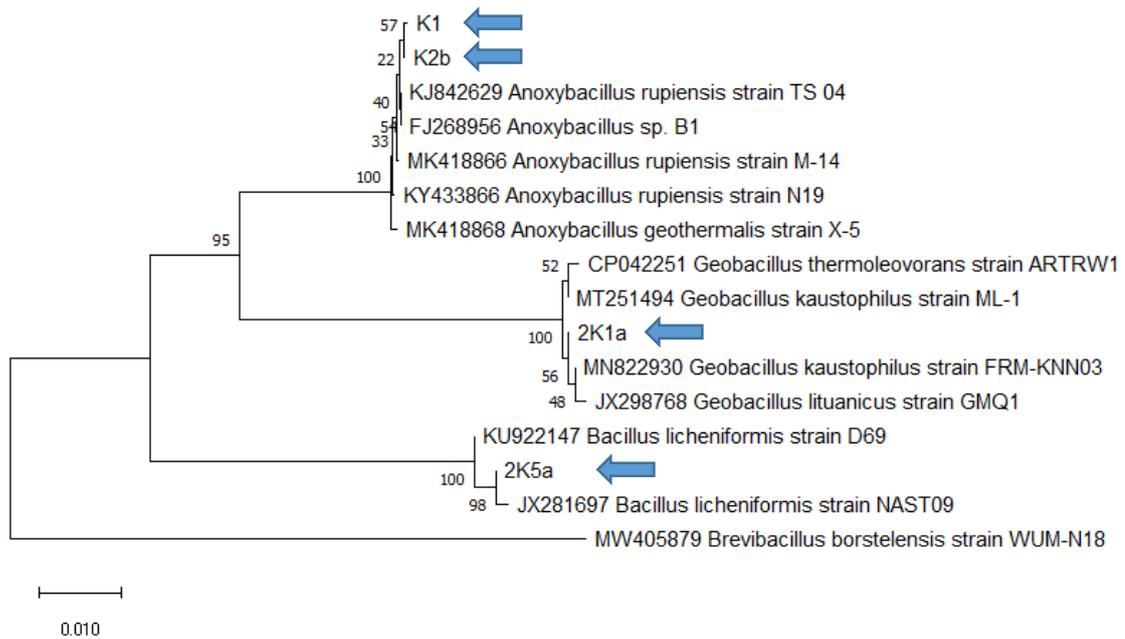


Figura 5. Filogenia de los aislados obtenidos en este estudio, de la familia *Bacillaceae* (flechas), comparado con secuencias obtenidas del GenBank, los números de acceso se describen en el árbol filogenético.

En la figura 4 se muestra la relación filogenética de todos los aislados obtenidos en esta investigación, en un árbol filogenético de bacterias formadoras de endospora, con diversas secuencias obtenidas de la base datos de genes y secuencias más grande de la actualidad, el GenBank. El valor *bootstrap* corresponde a 500 réplicas, la barra de 0.01 representa un 1% de divergencia entre especies. En la figura 5, por otro lado, se muestran las posiciones de los diferentes aislados en un árbol filogenético de bacterias que pertenecerían a la familia *Bacillaceae*; el valor *bootstrap* corresponde también a 500 réplicas con un 1% de divergencia entre especies, donde *Brevibacillus borstelensis* strain WUM-N18 fue utilizado como *outgroup* del árbol. Finalmente, en la figura 6 se muestran las posiciones de los diferentes aislados en un árbol filogenético de bacterias que pertenecerían a la familia *Paenibacillaceae* con *bootstrap* de 500 réplicas, la barra de 0.5 representa un 50% de divergencia entre especies, donde *Staphylococcus aureus* ATCC12600 sirvió como *outgroup* del árbol.

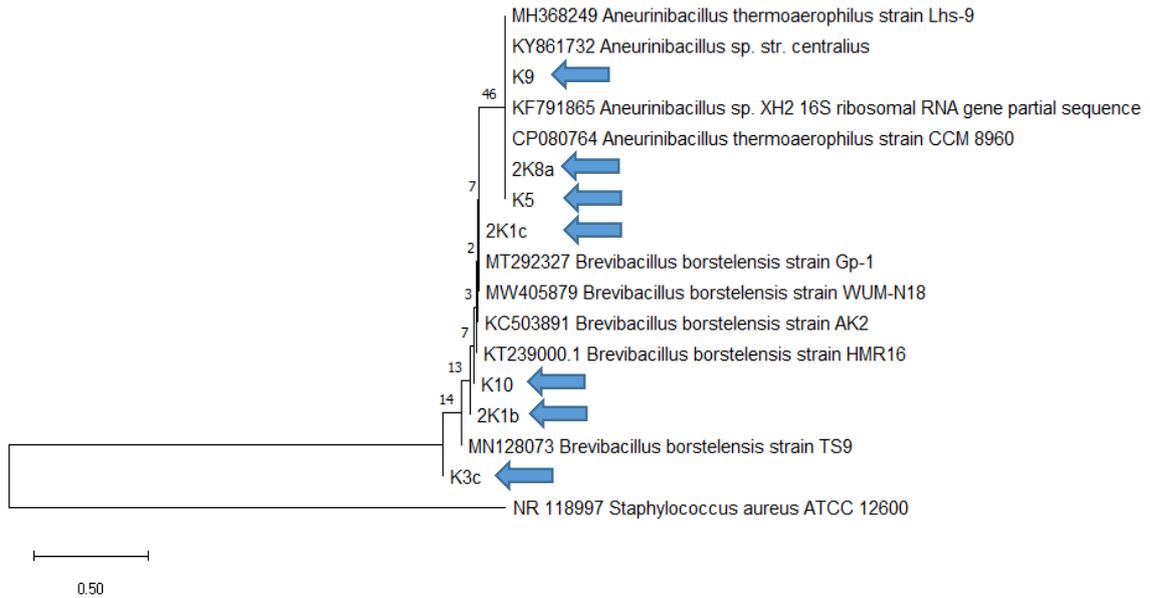


Figura 6. Filogenia de los aislados obtenidos en este estudio que pertenecerían a la familia *Paenibacillaceae* (flechas) comparado con secuencias obtenidas del GenBank, los números de acceso se describen en el árbol filogenético.

4.6 Discusión

Los resultados del análisis físico químico del agua de las pozas, muestran datos interesantes en relación a los brindados por INGEMET hace 21 años (Huamaní, 2000), en donde se aprecian algunas diferencias. En primer lugar, existe un grupo de elementos que aumentaron su concentración (apéndice 17) como es el caso del sodio (de 90 a 123.147 ± 13.546 mg/L), magnesio (de 1 a 6.962 ± 0.835 mg/L), manganeso (de 0.22 a 0.2745 ± 0.01921 mg/L), estroncio (de 0.75 a 0.8136 ± 0.0732 mg/L), rubidio (de 0.01 a 0.0451 ± 0.0045 mg/L), y boro (de 0.35 a 2.448 ± 0.294 mg/L). Este último podría sobrepasar los límites permisibles establecidos en los Estándares de Calidad de Agua cuyo valor permitido es 2.4 (Ministerio del Ambiente, 2017). También se observan descensos en las concentraciones (apéndice 17) de potasio (de 9 a 7.11 mg/L), calcio (de 61 a 47.388 mg/L), arsénico (de 0.012 a 0.0099 mg/L), bario (de 0.15 a 0.144mg/L), litio (de 0.35 a 0.2936 mg/L) y cesio (de 0.15 a 0.0049 mg/L). La variación de las concentraciones de estos elementos ocurre debido a que las aguas que brotan del

Complejo Turístico Baños del Inca son subterráneas y nacen por un proceso de subducción, y por lo tanto, su composición puede variar en relación a las condiciones meteorológicas (Instituto Nacional de Defensa Civil, 2005).

La presencia de distintos elementos en diferentes concentraciones hace que el agua del Complejo Turístico Baños del Inca disponga de sales minerales que las bacterias pueden utilizar como cofactores enzimáticos, indispensables para mayor expresión de enzimas hidrolíticas. Se conoce que los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} tienen efecto positivo en la producción y actividad de enzimas proteolítica (El-Gayar, Al Abboud y Essa, 2017). Además, es importante señalar que los procariontes que viven en fuentes termales necesitan de ciertos elementos para evitar la desnaturalización de sus ácidos nucleicos y proteínas al mantener la conformación activa de las enzimas a altas temperaturas. Esta afirmación tiene validez experimental ya que al realizar el cultivo empleando agua destilada como diluyente no hubo crecimiento bacteriano, sin embargo, el crecimiento es importante cuando se usó agua de la fuente termal (experimentos no mostrados); es decir, aunque se requiere de un estudio específico, es posible que la presencia de minerales en el agua termal sea un factor que permite que los organismos puedan crecer y desarrollarse en hábitats difíciles.

El calcio es un ion que induce, estabiliza y protege a las enzimas de cambios conformacionales (Sousa, 2007). En *Bacillus circulans*, la actividad proteolítica es regulada positivamente por los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} y Na^{+} aumentando en 30, 15, 10 y 2% respectivamente, cuando la concentración es 10 mM; por otro lado, se genera un efecto negativo cuando los iones el Zn, Cu, Hg, Co, Cd y Al están presentes a una concentración 10 mM, disminuyendo la actividad en 4, 16, 8, 10, 6 y 4% respectivamente

(Subba, 2009). En *B. licheniformis*, los iones Na, Ca, Zn, Mg y Ba aumentan la actividad proteolítica en 2.4, 15.5, 4.65, 13 y 11.5 % respectivamente, cuando la concentración es 5 mM; por otro lado, se genera un efecto negativo cuando los iones el Mn, Hg, Co, Cu están presentes a una concentración 5 mM, disminuyendo la actividad en 6.5, 29.85, 1 y 5.2% respectivamente (Jellouli, 2011).

Los resultados del análisis de agua con la que se prepararon los medios de cultivo evidencian la presencia de sodio, calcio, magnesio, manganeso, zinc y bario; iones que contribuyen de manera positiva a la producción de proteasas. Del mismo modo, la casi ausencia de iones negativos como el cobre, mercurio, cadmio y aluminio contribuyeron a que la actividad proteolítica no disminuya. La incorporación del agua de la fuente termal en la preparación de los medios de cultivo fue importante para lograr el desarrollo de las bacterias productoras de endospora y la producción de proteasas. La capacidad proteolítica de los aislados está relacionada con la descomposición y mineralización del nitrógeno transformando restos proteicos en péptidos y aminoácidos, contribuyendo con el ciclo del nitrógeno del ecosistema acuático termal al disponibilizarlo para otros microorganismos que también participan en el ciclo.

Los aislados bacterianos presentaron diversas formas de colonia en agar leche, por ejemplo, las colonias de *Anoxybacillus rupiensis* son de borde regular, redondas y cremas, las colonias de *Brevibacillus borstelensis* son de color crema, borde regular, pero al pasar las 48 horas, crecen de forma ramificada y produce una pigmentación marrón. En el caso del aislado 2K1b (especie homóloga a *B. borstelensis*) y a diferencia de otros *Brevibacillus* reportados, posee un color amarillo que se desvanece al superar los 50 °C, pero retoma su color si la temperatura vuelve a descender; este pigmento amarillo estaría

relacionado a la regulación metabólica de la célula, y definitivamente se debe continuar investigando esta característica. Las colonias homólogas a *Bacillus licheniformis* crecen de manera irregular y poseen un rápido crecimiento, bastando 5 horas de incubación para observar la presencia de colonias; además, se observó que estas colonias forman pequeñas burbujas de aire que se asemejan a las ya descritas para *B. subtilis*. Las colonias de aislados homólogos de *Geobacillus kaustophilus* fueron regulares y presentaron pigmento rosado.

Los aislados obtenidos presentaron distinto modo de crecimiento en medio líquido, generando dos grupos, los que producen biofilms y aquellos que no lo hacen; la formación de biofilms solo en la superficie o interface medio-aire indica que los aislados son aeróbicos. Los aislados que generaron este tipo de biofilms fueron homólogos a las especies *Anoxybacillus rupiensis*, *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, y *B. licheniformis*; *G. kaustophilus* y *Brevibacillus borstelensis* no generan biofilms.

Un rasgo común de las bacterias aisladas es la formación de endosporas que en su mayoría fueron subterminales o terminales. Según Rubiano, 2006, las bacterias del género *Anoxybacillus*, incluyendo la especie *A. rupiensis*, aisladas de ambientes termales, producen endosporas terminales o subterminales, son anaerobios facultativos, quimiorganotróficos de metabolismo fermentativo y son productoras de proteasas, además Goh sostiene que son inmóviles en ciertos medios de cultivo (Goh *et al.*, 2014). Este género tiene una nutrición versátil, consumen carbohidratos como sacarosa, fructosa, glucosa y no producen sulfuro de hidrógeno. La colonia codificada como 2K1a homóloga de *G. kaustophilus* no es móvil, puede metabolizar al citrato como fuente de carbono,

decarboxila la lisina y metaboliza tanto a la glucosa como a la sacarosa y la lactosa, según el trabajo de Tayyab y colaboradores (2011) estas características bioquímicas coinciden con *G. kaustophilus* confirmando lo encontrado en el análisis molecular de las secuencias 16S ARNr de los respectivos aislados. Otras investigaciones describen también el aislamiento e identificación de especies de *Aneuribacillus* y *Brevibacillus* de fuentes termales, con capacidad para decarboxilar la lisina (Mehta y Satyanarayana, 2013; Gomri, 2018).

En relación a la generación de halos de hidrólisis, nuestros resultados pueden ser comparados a los descritos en los geiseres de Candarave en Tacna, fundamentalmente por la metodología empleada, aunque los hallazgos son distintos. Para empezar, las aguas de las pozas del Complejo Turístico Baños del Inca se encuentran a aproximadamente 2800 msnm, con temperaturas de entorno de 65 a 71 °C, además, sus aguas fluyen a partir de un proceso de subducción en la cordillera, a diferencia de las aguas del campo geotermal de Candarave – Tacna que se encuentran a aproximadamente 4400 msnm, con temperatura promedio aproximada de 80 °C y aguas generadas por procesos de subducción asociadas a vulcanismo. Estas diferencias no solo describen ambientes geotermales de condiciones ambientales distintas, sino que dejan entrever que la microbiota también lo sea, ampliando la diversidad de la microbiota termal con potencial utilidad en el país.

Como resultado de nuestro trabajo observamos que el asilado K10, homólogo a la especie termal *Brevibacillus borstelensis* strain Gp-1, tiene el mejor halo de hidrólisis a 48 h (60 mm de diámetro a 55 °C); este resultado definitivamente destaca del conjunto de bacterias aisladas así como el de los aislados homólogos a *B. licheniformis* y *Geobacillus*

thermoparaffinivorans incubados a 48 horas en agar leche cuya mayor actividad hidrolítica fue de 50 mm a 50 °C y 85 mm a 60°C (Naquiche, Zúñiga y Ferrer, 2015). A pesar de la diferencia clara entre ambos resultados, se debe considerar que falta un proceso de bioprospección más profundo, ya que se deben considerar otras muestras donde la diversidad microbiana sea diferente y donde se puedan considerar procesos de optimización, como, por ejemplo, con el empleo de sales de calcio. Sin duda, estos resultados abren nuevos horizontes no solo en conocer a las bacterias que allí viven, sino también en las capacidades metabólicas y enzimáticas que poseen.

En el estudio realizado por Panosyan en aguas geotermales se aislaron termófilos que pertenecían a los géneros *Bacillus* (*B. licheniformis*), *Anoxybacillus* (*A. rupiensis*), *Brevibacillus* (*B. borstelensis*) (Panosyan, 2017). Los aislados identificados en este trabajo homólogos a *B. licheniformis*, *Anoxybacillus rupiensis* y *B. borstelensis* coinciden con las especies obtenidas por Panosyan en Armenia. Adiguzel en Turquía aisló del agua de fuentes termales diversas especies de los géneros *Geobacillus* (*G. stearothermophilus*) y *Anoxybacillus* (*A. flavithermus*) (Adiguzel *et al.*, 2009). En India, Jordania y Arabia Saudita, a partir de muestras de agua se aislaron bacterias que pertenecían al género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*) (El-Gayar, Al Abboud y Essa, 2017; Mohammad, 2017; Panda, Sahu y Tayung, 2013). Los datos anteriores conducen a plantear que del agua de las fuentes termales se pueden aislar especímenes de los géneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus* y *Anoxybacillus*, todos contienen especies con distintas o similares capacidades enzimáticas reportadas en la literatura. El género *Aneurinibacillus* ha sido reportado por Ginting en Indonesia, especies fueron aisladas de aguas termales y llaman la atención puesto que hay pocos estudios relacionados a este género y la producción de proteasas extracelulares (Ginting, 2020);

en esta investigación se obtuvieron tres especímenes homólogos a este género con capacidad proteolítica importante que por lo expuesto por Ginting tienen mucho por estudiar.

El árbol filogenético de la figura 4. presenta cinco clados donde es evidente la divergencia genética existente entre los géneros *Brevibacillus* y *Aneurinibacillus* respecto de los géneros *Bacillus*, *Geobacillus* y *Anoxybacillus* puesto que pertenecen a dos familias distintas, la *Paenibacillaceae* y la *Bacillaceae*, respectivamente. La ubicación de los aislados K1 y K2b entre las especies del género *Anoxybacillus* obtenidas de aguas termales ratifica su identificación como la especie *Anoxybacillus rupiensis*, su clado tiene una divergencia marcada frente a 2K1a, clado de *Geobacillus*; la que aumenta más si se la compara con 2K5a, clado de *Bacillus*.

Mención aparte merece el aislado 2K1c, cuya divergencia de las otras especies es tan alta que podría tratarse de un nuevo espécimen del género *Brevibacillus*, esta afirmación es reforzada si se considera que no se han reportado especies productoras de enzimas termoestables de *Brevibacillus* aisladas de fuentes termales de Perú y en América, cabe recalcar que las secuencias de *B. borstelensis* empleadas tienen como fuente de origen aguas termales de India (códigos GenBank: MT292327, MN128073) Arabia Saudí (KC503891) y pueden producir enzimas termoestables (Shahinyan, 2015).

El árbol filogenético de la figura 5 muestra que los aislados K1 y K2b pertenecen al clado de los *Anoxybacillus* que poseen proteasas termoestables como los aislados de Sumatra del Sur (KJ842629) (Yohandini, 2015). El aislado 2K5a agrupado en el clado de *Bacillus* podría producir no solo proteasas termoestables sino también lecitinasas, gelatinasas y

celulasas (Mohammad, 2017), convirtiéndolo en un espécimen con gran potencial biotecnológico. Finalmente, en este árbol es notoria la divergencia genética de los tres clados que pertenecen a la familia *Bacillaceae* frente al *outgroup*, *Brevibacillus borstelensis*.

El árbol filogenético de la figura 6 posee clados de la familia *Paenibacillaceae*, y se empleó como *outgroup* a *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 dando como resultado una amplia divergencia genética entre las familias *Paenibacillaceae* y *Staphylococcaceae*. Los aislados K5, 2K8a Y K9 pertenecerían al clado de los *Aneurinibacillus* dotados de la capacidad productora de proteasas termoestables y que pueden ser aislados a partir de fuentes termales (Verma, 2017; Mei-yun, 2018); asimismo, pueden sintetizar polihidroxicanoatos -bioplásticos (Pernicova, 2020), una capacidad muy valorada en el mundo, dada las políticas actuales de reducción de plásticos y de búsqueda de alternativas amigables con el ambiente.

Como se menciona en párrafos anteriores, las aguas termales albergan una gran variedad de microorganismos con grandes cualidades como los aislados en este trabajo que no solo poseen proteasas termoestables, sino que podrían ser capaces de producir bioplásticos u otras enzimas termoestables que también tienen un alto potencial biotecnológico.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Las especies de la familia *Bacillaceae* productoras de proteasas aisladas de las aguas termominerales del Complejo Turístico Baños del Inca son: *Anoxybacillus rupiensis*, *Geobacillus kaustophilus* y *Bacillus licheniformis*.

Las aguas de las fuentes termales presentan iones Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+} que contribuirían con la producción de proteasas termoestables en estos aislados.

Los aislados bacterianos grampositivos productores de endosporas producen proteasas en un amplio espectro de temperaturas.

El aislado bacteriano grampositivo codificado como K10, destacó por generar un diámetro de halo de hidrólisis de 60 ± 3.4 milímetros.

5.2 Recomendaciones

Este trabajo permitió establecer una importante proyección en la explotación del potencial biotecnológico de los aislados obtenidos e identificados, en un futuro próximo, a partir de la caracterización enzimática, optimización de procesos y el escalamiento de proteasas termoestable, actividades que se aprovecharían en el campo industrial.

En futuras investigaciones se recomienda incluir la prueba de la capacidad de reducción de nitratos a nitritos de los aislados bacterianos, puesto que son una de las características principales de las bacterias del género *Anoxybacillus*; ampliar el análisis a muestreos de sedimento y tapetes microbianos de las aguas del Complejo Turístico Baños del Inca y, finalmente, se sugiere realizar no solo la secuenciación del gen 16S ARNr, sino de marcadores adicionales e incluso del genoma completo a fin de conocer todo el potencial biotecnológico de los aislados.

LISTA DE REFERENCIAS

- Acaro, D. y Anduenza, F. (2020) Microbiología Del Agua Termal Del Balneario Ilaló. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 1(1), pp. 18–25. doi: <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i1.2178>.
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, N. y Sahin, F. (2009) Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods*, 79(3), pp. 321–328. doi: 10.1016/j.mimet.2009.09.026.
- American Public Health Association (1999) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. United States of America. doi: ISBN 9780875532356.
- Andueza, F. (2018) Microbiología de las aguas termales del Ecuador. *Microbiology of the thermal waters of Ecuador*. Ecuador, p. 5. https://www.researchgate.net/publication/324418862_Microbiologia_de_las_aguas_termales_del_Ecuador
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3):403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17):3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Bartram, J. (2004) Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. *Emerging Issues in Water and Infectious Disease*, p. 271. doi:10.2166/9781780405940
- Bergey, D. H. (2009) *Bergey's manual of systematic bacteriology - Vol 3: The Firmicutes*, Springer-Verlag New York Inc. doi: 10.1007/b92997.

- Brumm, P. (2015) Complete genome sequences of *Geobacillus* sp. Y412MC52, a xylan-degrading strain isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park. *Standards in Genomic Sciences*, 10(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s40793-015-0075-0.
- Costa Torres, L. F. (2013) Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(3), pp. 272–279. doi: 10.1590/0074-0276108032013003.
- Deák, T. (2014) Food Technologies: Pasteurization, en *Encyclopedia of Food Safety*, pp. 219–224. doi: 10.1016/B978-0-12-378612-8.00257-2.
- Dowd, F. J. (2017) Pharmacology of Specific Drug Groups: Antibiotic Therapy. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*, pp. 457–487. doi: 10.1016/B978-0-323-39307-2.00033-3.
- Dudley, T. y J, Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 1596-1599. doi: 10.1093/molbev/msm092
- El-Gayar, K. E., Al Abboud, M. A. y Essa, A. M. M. (2017) Characterization of thermophilic bacteria isolated from two hot springs in Jazan, Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(2), pp. 743–752. doi: 10.22207/JPAM.11.2.13.
- Ferreras, E. (2011) *Expresión y estudio de enzimas termoestables de interés biotecnológico*. Universidad Autónoma de Madrid. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=27244>
- Forero, L. (2017) *Aislamiento y caracterización de microorganismos termófilos con potencial biotecnológico del manantial termomineral Santa Mónica del*

- municipio de Choachi (Cundinamarca)*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. <https://repository.udistrital.edu.co/handle/11349/6578>
- Gomri, M. (2018) Production and Characterization of an Extracellular Acid Protease from Thermophilic *Brevibacillus* sp. OA30 Isolated from an Algerian Hot Spring. *Microorganisms*, 6(2), p. 31. doi: 10.3390/microorganisms6020031.
- Green, M. y Sambrook, J. (2012) *Molecular cloning - A laboratory manual*. Fourth edi. Edited by J. Inglis et al. New York: Inglis, Jhon.
- Ginting, E. L. (2020) Identification of Proteolytic Thermophiles from Moinit Coastal Hot-Spring, North Sulawesi, Indonesia. *Geomicrobiology Journal*, 37(1), pp. 50–58. doi: 10.1080/01490451.2019.1662524.
- Goh, K. M., Gan, K., Chan, K.G., Chan, G. F., Shahar, S., Chong, C. S., Kaharm U. M. y Chai, K. P. (2014) Analysis of *Anoxybacillus* genomes from the aspects of lifestyle adaptations, prophage diversity, and carbohydrate metabolism, PLOS ONE, 9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0090549.
- Gupta, V. (2017) Bio-prospecting Bacterial Diversity of Hot Springs in Northern Himalayan Region of India for Laccases. *Indian Journal of Microbiology*, 57(3), pp. 285–291. doi: 10.1007/s12088-017-0656-2.
- Haddar, A. (2009) Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technology*, 100(13), pp. 3366–3373. doi: 10.1016/j.biortech.2009.01.061.
- Haki, G. D. y Rakshit, S. K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89(1), pp. 17–34. doi: 10.1016/S0960-8524(03)00033-6.
- Hernandez Y., Lobo E., Martínez S., L. Z. (2009) Evaluación de diferentes métodos

de extracción de ADN de micoplasmas para su empleo en el diagnóstico por PCR.

Salud animal, 31(2), pp. 108–114.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-

570X2009000200006

Huamaní, A. (2000) *Aguas Termales y Minerales en el Norte del Perú*. Lima.

<https://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/20.500.12544/344#:~:text=Por%20e>

[star%20ubicadas%20cerca%20de,Ba%C3%B1os%20Jerez%2C%20Quilcate%2](https://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/20.500.12544/344#:~:text=Por%20e)

[C%20Yumagual%2C](https://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/20.500.12544/344#:~:text=Por%20e)

Instituto Nacional de Defensa Civil (2005) *Programa de prevención y medidas de*

mitigación ante desastres de la ciudad Baños del Inca. Perú.

<https://sigrid.cenepred.gob.pe/sigridv3/documento/975>

Jellouli, K. (2011) Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification,

characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp

waste deproteinization. *Process Biochemistry*, 46(6), pp. 1248–1256. doi:

10.1016/j.procbio.2011.02.012.

Lagarda, G. G. (2006) Microbiología industrial. *Revista Latinoamericana de*

Microbiología. Washington, D.C. USA: Organización de los Estados

Americanos. doi: 996831255X.

Lane, D. J. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse

transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic*

Bacteriology, 41(2), pp. 240–246. doi: 10.1099/00207713-41-2-240.

Larsson, A. (2014) AliView : a fast and lightweight alignment viewer and editor for

large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), pp. 1–3. doi:

10.1093/bioinformatics/btu531.

Madigan, M. (2015) *Brook: Biology of microorganisms*. 14th edn. Edited by K.

- Churchman et al. Boston, USA: Pearson Education. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- Mehta, D. y Satyanarayana, T. (2013) *Diversity of hot environments and thermophilic microbes*. Second, *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles*. Second. Edited by T. Satyanarayana, J. Littlechild, y Y. Kawarabayasi. Exeter, UK: Springer. doi: 10.1007/978-94-007-5899-5_1.
- Mei-yun, L. (2018) Isolation and identification of producing-protease thermophiles from hot springs se-enriched in Yichum. *Science and Technology of Food Industry*, 39(12), pp. 142–176.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3696853/>
- Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (2017) *MINCETUR renueva Complejo Turístico Baños del Inca con inversión de S/ 17 millones, 2017*. Disponible en: <https://www.mincetur.gob.pe/mincetur-renueva-complejo-turistico-banos-del-inca-con-inversion-de-s-17-millones/>.
- Ministerio del Ambiente (2017) *Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua, El Peruano*. Perú. Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>.
- Mohammad, B. T. (2017) Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as potential producers of thermostable enzymes. *International Journal of Microbiology*, 2017, p. 12. doi: 10.1155/2017/6943952.
- Municipalidad Distrital de Los Baños del Inca (2017) *Plan de Desarrollo Concertado del Distrito de Los Baños del Inca 2016 al 2021, con perspectiva al 2030*. Perú.
- Naquiche, A., Zúñiga, A. y Ferrer, C. (2015) Caracterización de dos bacterias

- termófilas (Bp- 2 Y Bp-4) con capacidad proteolítica aislados en los géiseres de Candara . Ve . Tacna – Perú. *Ciencia y Desarrollo*, 9, pp. 49–53.
<https://doi.org/10.33326/26176033.2015.19.481>
- Oliart-Ros, R. M., Manresa-Presas, Á. y Sánchez-Otero, M. G. (2016) Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *Ciencia UAT*, 11(1), pp. 79–90.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079
- Panda, M. K., Sahu, M. K. y Tayung, K. (2013) Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(2), pp. 159–165. doi: 10.1017/S1468109911000090.
- Panosyan, H. H. (2017) Thermophilic bacilli isolated from armenian geothermal springs and their potential for production of hydrolytic enzymes. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 3(7), pp. 248–253. doi: 10.25141/2475-3432-2017-7.0239.
- Partida, L. y Valladares, K. (2002) *Uso de las aguas termales como coagulante en la clarificación del agua*. Universidad Nacional de Ingeniería.
https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UUNI_024721a3c7f5ad9500bdc70476834d9b
- Pentecost, A., Jones, B. y Renaut, R. W. (2003) What is a hot spring?, *Canadian Journal of Earth Sciences*, 40(11), pp. 1443–1446. doi: 10.1139/e03-083.
- Pernicova, I. (2020) Introducing the newly isolated bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an auspicious thermophilic producer of various polyhydroxyalkanoates (PHA) copolymers-1. *Polymers*, 12, pp. 1–13. doi: 10.3390/polym12061235

- Petsko, G. (2001) Structural basis of thermostability in hiperthermophilic proteins. *Methods in enzymology*, 334, pp. 469–478. doi: 10.1016/s0076-6879(01)34486-5
- Quispe, A. (2016) *Estudios de Exploración en Aguas Profundas : Caso Peruano*. doi: 10.13140/RG.2.2.23451.67369.
- Reimer, L. C. (2018) BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis. *Nucleic Acids Research*, pp. 1–6. doi: 10.1093/nar/gky879.
- Remigio, Z. (2012) Isolation and characterization of a protease-producing thermophilic bacterium from an African hot spring. *African Journal of Biotechnology*, 11(62), pp. 12571–12578. doi: 10.5897/AJB12.142.
- Rubiano, C. (2006) *Aislamiento y caracterización de microorganismos termofílicos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá)*. Pontificia Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8265>
- Saitou N.y Nei M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sawant, R. y Nagendran, S. (2014) Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3(6), pp. 568–579. doi: 10.3390/biom3040923.
- Shahinyan, G. S. (2015) Isolation and characterization of lipase-producing thermophilic bacilli from geothermal springs in Armenia and Nagorno-Karabakh. *Biological Journal of Armenia*, 2(67), pp. 6–15. https://www.researchgate.net/publication/280626173_Isolation_and_characterization_of_lipase-producing_thermophilic_bacilli_from_geothermal_springs_in_Armenia_and_Na

gorno-Karabakh

- Sousa, F. (2007) A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(7), pp. 1772–1781. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.12.017.
- Suarez, C. (2002) Las enzimas termoestables y sus aplicaciones industriales. *BioTecnología*, 7(1), pp. 7–23. https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers19-08/010048943.pdf
- Subba, C. (2009) Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*, 44(3), pp. 262–268. doi: 10.1016/j.procbio.2008.10.022.
- Tamariz, C. R. (2002) Diversidad de bacterias termotolerantes celulíticas y xilanolíticas de fuentes termales del Callejón de Huaylas. *The Americas*, 8(3), p. 367. <http://repositorio.concytec.gob.pe/handle/20.500.12390/2091>
- Tayyab, M., Rashid, N. y Akhtar, M. (2011) Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: Cloning and characterization of the lipase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(3), pp. 272–278. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.11.015.
- Valenzuela-González, F. (2015) The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities El gen ARNr. *Ciencias Marinas*, 41(4), pp. 297–313. <http://www.scielo.org.mx/pdf/ciemar/v41n4/0185-3880-ciemar-41-04-00297-en.pdf>
- Vargas, V. y Cruz, V. (2010) Geothermal Map of Perú, Proceedings World Geothermal Congress, (Abril), pp. 25–29. <https://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/20.500.12544/2079>
- Verma, A. (2017) Thermostable protease production by *Aneurinibacillus*

- thermoaerophilus MCW220, isolated from a hot water spring. *Applied Biological Research* 1, 2(January 2015). doi: 10.5958/0974-4517.2015.00023.3.
- Xian, W. D., Salam, N., Li, M., Zhou, E., Yin, Y. y Ming, Y. (2020) Network-directed efficient isolation of previously uncultivated Chloroflexi and related bacteria in hot spring microbial mats, *npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41522-020-0131-4.
- Yohandini, H. (2015) Isolation and phylogenetic analysis of thermophile community within Tanjung Sakti Hot Spring, South Sumatera , Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, (October), pp. 1–6. doi: 10.1016/j.hjb.2015.10.006.
- Zavaleta, A. (2006) Potencial biotecnológico de los microorganismos extremófilos. *Ciencia e Investigación*, 9(2), p. 2006. <https://doi.org/10.15381/ci.v9i2.5952>

APÉNDICES

Apéndice 1. Lugar de muestreo

Mapa de ubicación



Fuente: Google Maps

Apéndice 2. Enriquecimiento de la muestra



Incubación de muestras



Enriquecimiento efectivo, presencia de biofilms

Apéndice 3. Siembra en medio leche descrema



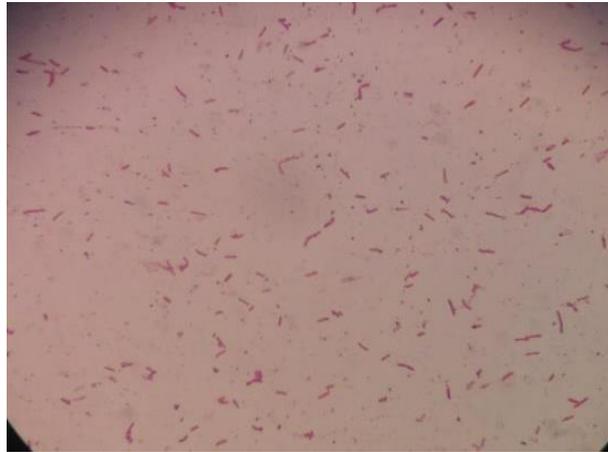
Medios de enriquecimiento, selectivo y alícuotas.



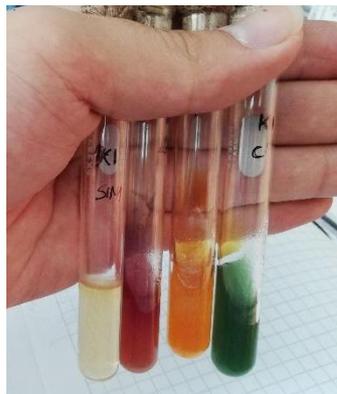
Placas sembradas en medio leche descremada.

Apéndice 4. Cepa K1

Coloración Gram

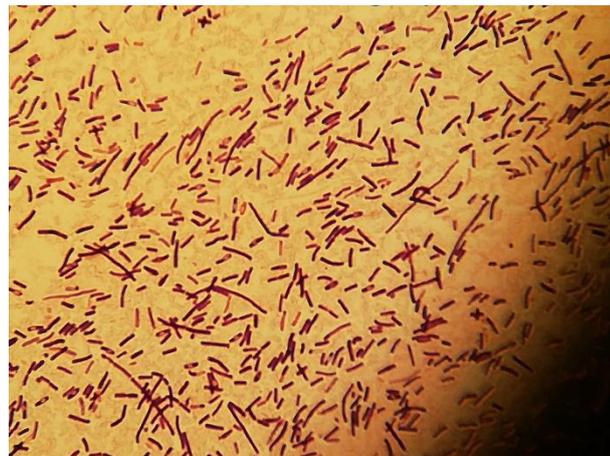


T° óptima de proteasa: 50°C



Pruebas bioquímicas

Apéndice 5. Cepa K2b



Coloración Gram

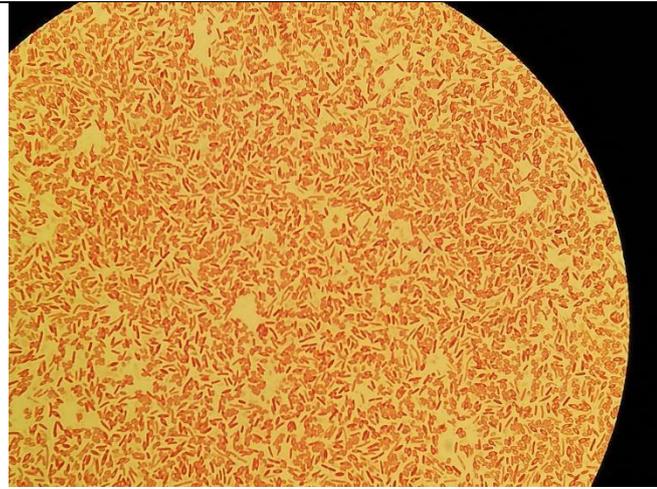


T° óptima de proteasa: 55°C

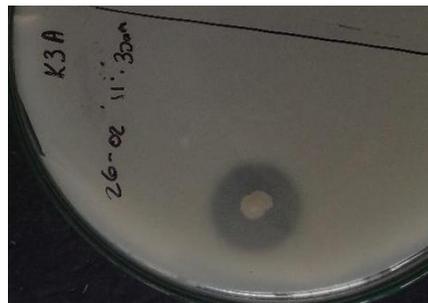


Pruebas bioquímicas

Apéndice 6. Cepa K3a



Coloración Gram

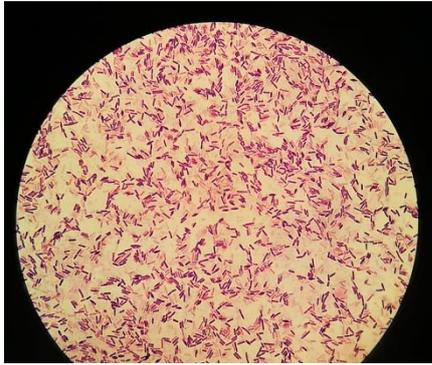


T° óptima de proteasa: 50°C

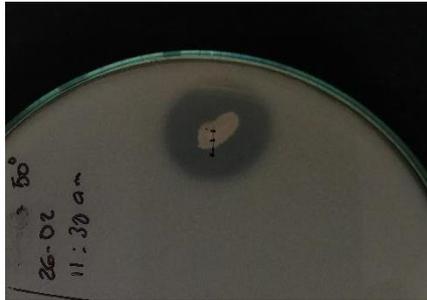


Pruebas bioquímicas

Apéndice 7. Cepa K3c



Coloración Gram

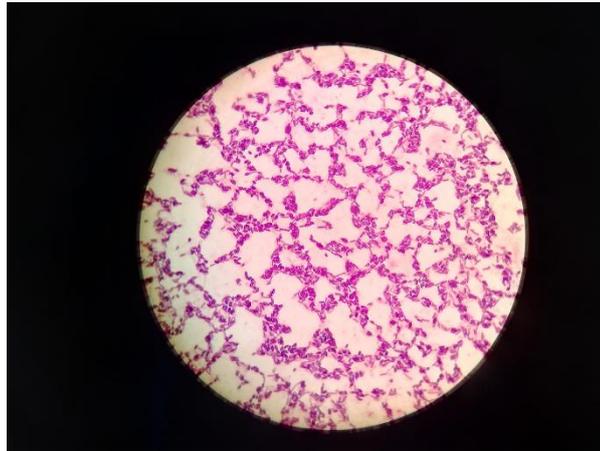


T° óptima de proteasa: 50°C

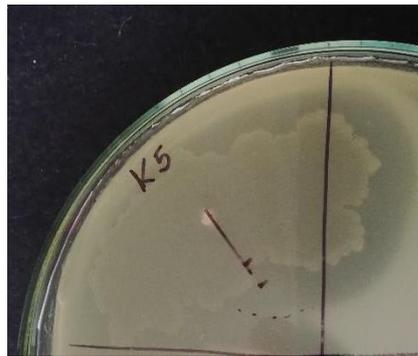


Pruebas bioquímicas

Apéndice 8. Cepa K5



Coloración Gram

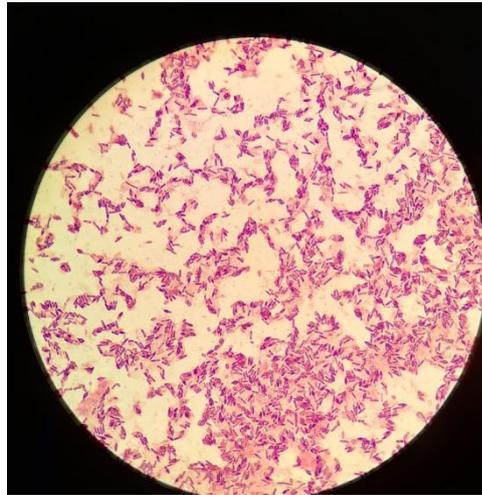


T° óptima de proteasa: 55°C



Pruebas bioquímicas

Apéndice 9. Cepa K9



Coloración Gram

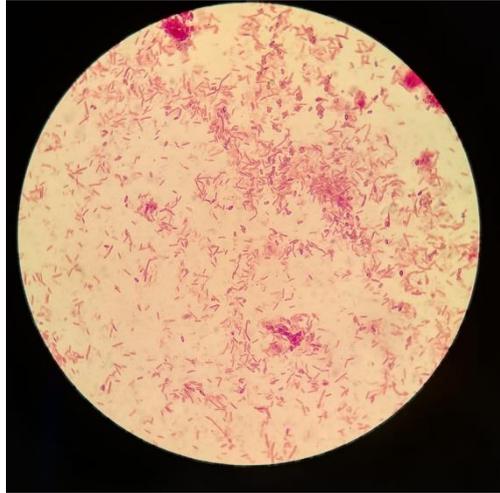


T° óptima de proteasa: 55°C

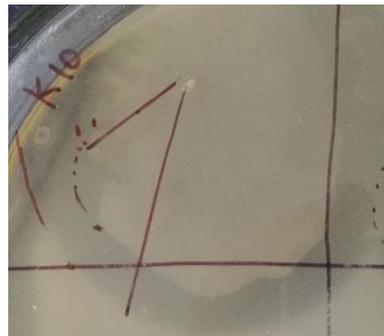


Pruebas bioquímicas

Apéndice 10. Cepa K10



Coloración Gram

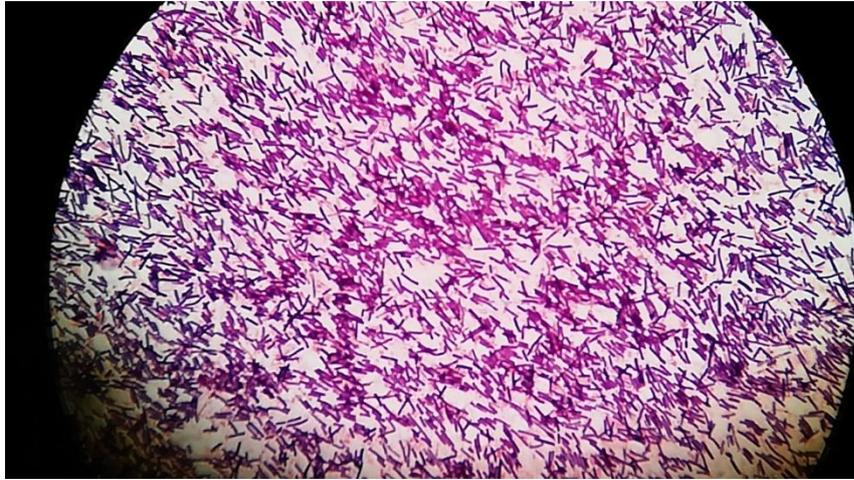


T° óptima de proteasa: 55°C

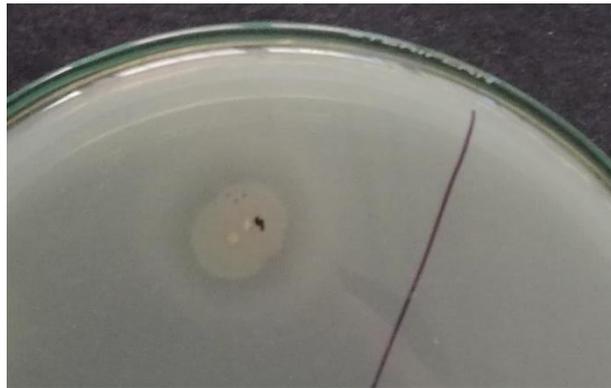


Pruebas bioquímicas

Apéndice 11. Cepa 2K1a

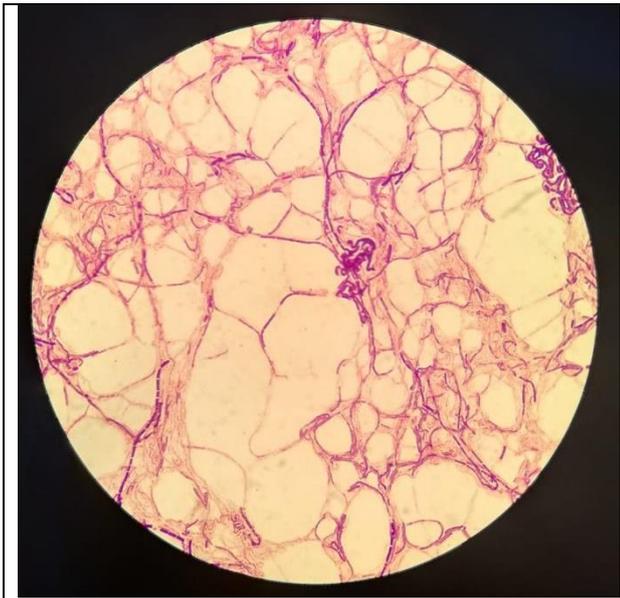


Coloración Gram



T° óptima de proteasa: 50°C

Apéndice 12. Cepa 2K1b



Coloración Gram

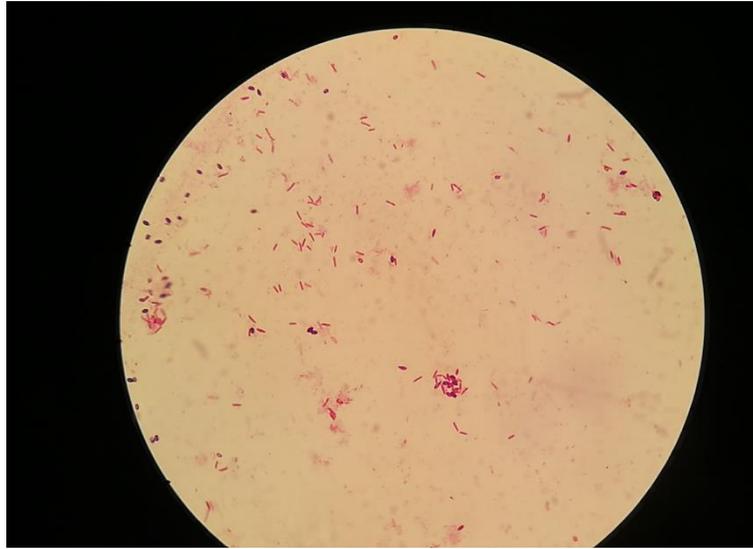


T° óptima de proteasa: 40°C



Pruebas bioquímicas

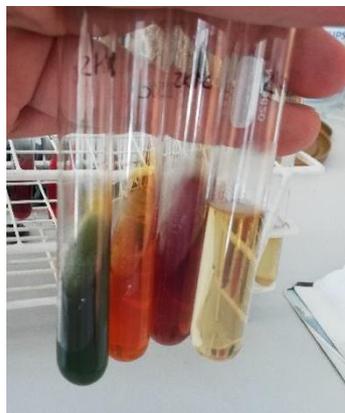
Apéndice 13. Cepa 2K1c



Coloración Gram

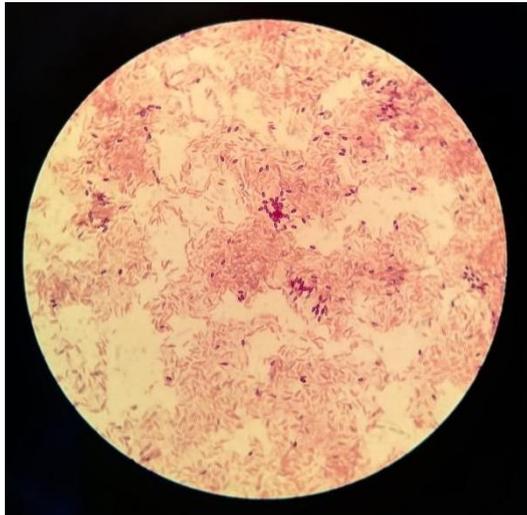


T° óptima de proteasa: 50°C



Pruebas bioquímicas

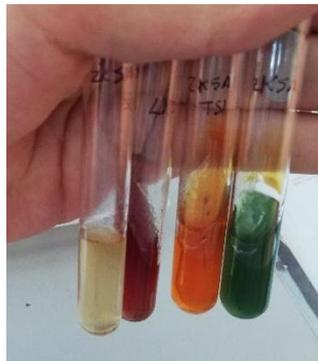
Apéndice 14. Cepa 2K5a



Coloración Gram

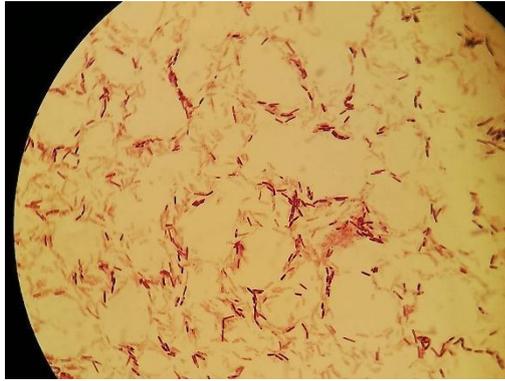


T° óptima de proteasa: 55°C

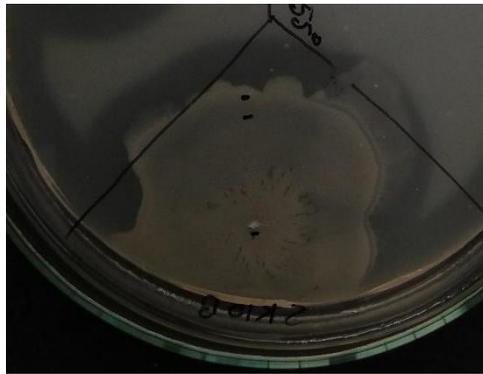


Pruebas bioquímicas

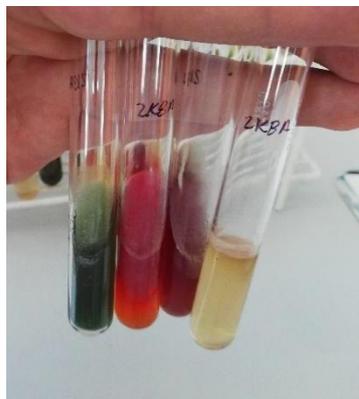
Apéndice 15. Cepa 2K8a



Coloración Gram

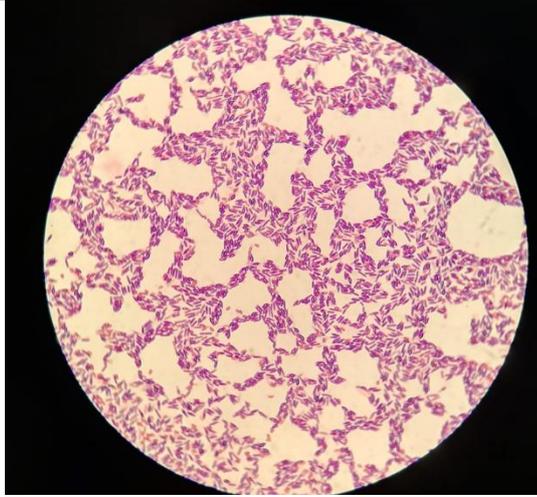


T° óptima de proteasa: 55°C

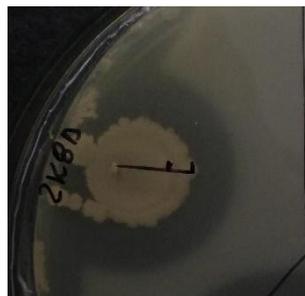


Pruebas bioquímicas

Apéndice 16. Cepa 2K10b



Coloración Gram



T° óptima de proteasa: 55°C



Pruebas bioquímicas

Apéndice 17. Composición química de las aguas de las pozas del Complejo Turístico Baños del Inca

Elemento	Resultados	Unidad
Aluminio Total	<0.003	mg/L
Antimonio Total	0.01832 ± 0.00513	mg/L
Arsénico Total	0.00990 ± 0.00109	mg/L
Bario Total	0.1411 ± 0.0127	mg/L
Berilio Total	<0.00006	mg/L
Bismuto Total	<0.00003	mg/L
Boro Total	2.448 ± 0.294	mg/L
Cadmio Total	<0.00003	mg/L
Calcio Total	47.388 ± 4.739	mg/L
Cerio Total	<0.00024	mg/L
Cesio Total	0.0491 ± 0.0123	mg/L
Cobalto Total	<0.00003	mg/L
Cobre Total	<0.00009	mg/L
Cromo Total	<0.0003	mg/L
Estaño Total	<0.00010	mg/L
Estroncio Total	0.8136 ± 0.0732	mg/L
Fósforo Total	<0.047	mg/L
Galio Total	0.00014 ± 0.00001	mg/L
Germanio Total	<0.0006	mg/L
Hafnio Total	<0.00015	mg/L
Hierro Total	0.0253 ± 0.0020	mg/L
Lantano Total	<0.0015	mg/L
Litio Total	0.2936 ± 0.0264	mg/L
Lutecio Total	<0.00006	mg/L
Magnesio Total	6.962 ± 0.835	mg/L
Manganeso Total	0.27449 ± 0.01921	mg/L

Mercurio Total	<0.00009	mg/L
Molibdeno Total	<0.00006	mg/L
Niobio Total	<0.0015	mg/L
Níquel Total	<0.0006	mg/L
Plata Total	<0.000010	mg/L
Plomo Total	<0.0006	mg/L
Potasio Total	7.11 ± 0.57	mg/L
Rubidio Total	0.0451 ± 0.0045	mg/L
Selenio Total	<0.0013	mg/L
Sílice Total	82.94 ± 9.95	mg/L
Silicio Total	38.77 ± 4.65	mg/L
Sodio Total	123.147 ± 13.546	mg/L
Talio Total	<0.00006	mg/L
Tantalio Total	<0.0021	mg/L
Teluro Total	<0.003	mg/L
Torio Total	<0.00019	mg/L
Titanio Total	0.0023 ± 0.0003	mg/L
Uranio Total	<0.000010	mg/L
Vanadio Total	0.0025 ± 0.0004	mg/L
Wolframio Total	0.0130 ± 0.0022	mg/L
Yterbio Total	<0.00006	mg/L
Zinc Total	0.0148 ± 0.0015	mg/L
Zirconio Total	<0.00045	mg/L

Fuente: Laboratorio SGS-Cajamarca

Apéndice 18. Análisis estadístico de prueba de proteasas

→ Prueba T

Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Par 1	Halo_48h	14,9524	84	13,13040	1,43264
	Halo_24h	7,8214	84	7,68061	,83802

Correlaciones de muestras emparejadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	Halo_48h & Halo_24h	84	,767	,000

Prueba de muestras emparejadas

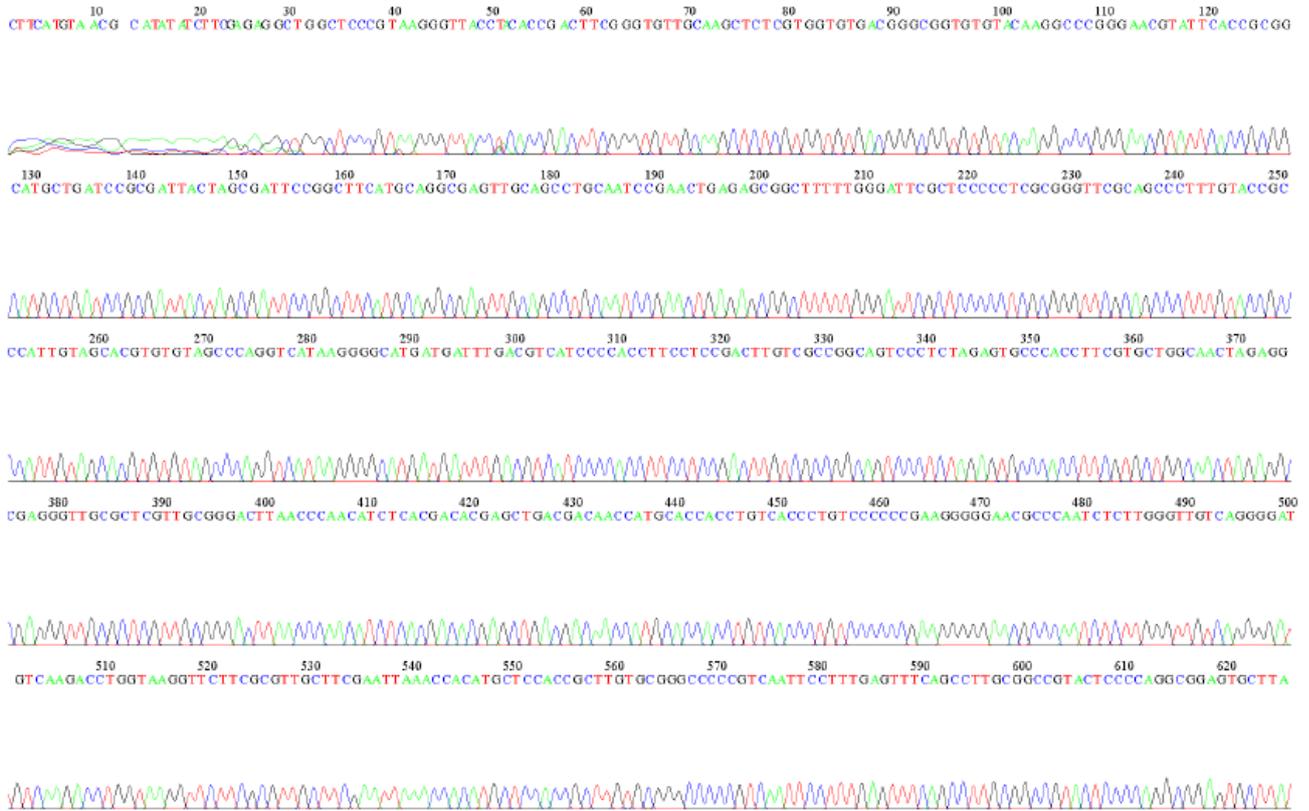
		Diferencias emparejadas							
		Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	Halo_48h - Halo_24h	7,13095	8,76023	,95582	5,22987	9,03204	7,461	83	,000

El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa IBM SPSS Statistics 25.

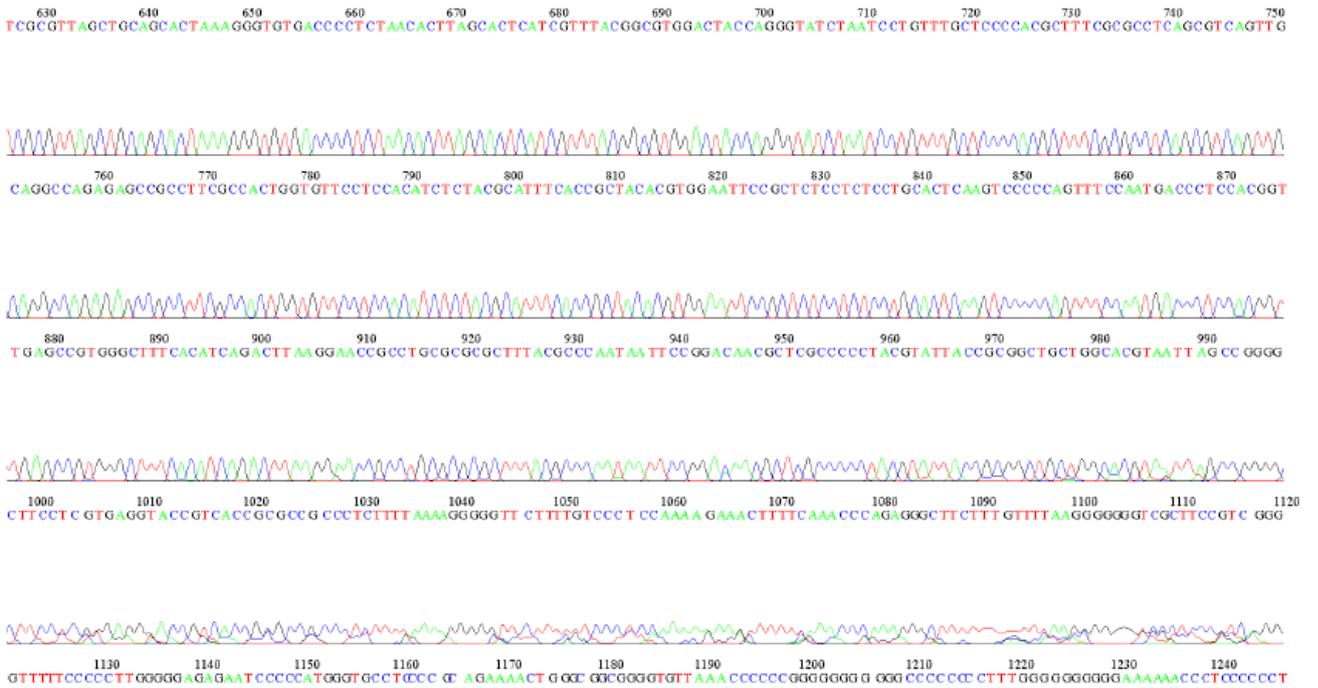
Apéndice 19. Cromatograma de secuencia 16S ARNr de aislado 2K1a



File: 18_1492R.ab1 Run Ended: 2021/11/2 21:5:59 Signal G:1278 A:1113 C:2848 T:1431
 Sample: 18_1492R Lane: 41 Base spacing: 15.996087 1367 bases in 16503 scans Page 1 of 2



File: 18_1492R.ab1 Run Ended: 2021/11/2 21:5:59 Signal G:1278 A:1113 C:2848 T:1431
 Sample: 18_1492R Lane: 41 Base spacing: 15.996087 1367 bases in 16503 scans Page 2 of 2



Apéndice 20. Parámetros físicos y químicos de las pozas del Complejo Termal Baños del Inca

