

# Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín

## Characterization of halophilic bacteria producing amylase isolated from San Blas Salterns in Junin

Pamela E. Canales\*, Elizabeth L. Chávez-Hidalgo\*\*, Amparo I. Zavaleta\*\*\*

### Resumen

El objetivo de este estudio fue caracterizar bacterias halófilas con actividad amilolítica provenientes de las Salinas de San Blas-Junín, ubicadas en los Andes peruanos aproximadamente a 4100 m de altitud. Este estudio se realizó con 34 bacterias aisladas de muestras de suelos las cuales se cultivaron en agar agua de sales (SW) 5 % conteniendo extracto de levadura 0,5 % y almidón 1 %. El 41 % de bacterias mostró la capacidad de hidrolizar almidón, éstas fueron caracterizadas mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas convencionales. Tres bacterias fueron Gram-negativas y once Gram-positivas. El 21 % (3/14) creció en un amplio rango de concentración de sales, entre 5 y 20 %. El 14 % (2/14) de las bacterias presentó actividad lipolítica, proteolítica y nucleolítica, y el 29 % (4/14), presentó actividad proteolítica y nucleolítica. Las bacterias se identificaron mediante los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados, las enzimas usadas fueron *Hae III*, *BstU I*, *Hinf I* y *Cfo I*. Los genes ribosómicos 16S de siete bacterias que presentaron perfiles de ADN diferentes se amplificaron, secuenciaron y analizaron mediante programas bioinformáticos. Del análisis fenotípico y molecular de las 14 bacterias amilolíticas se obtuvieron dos grupos, uno perteneciente al género *Halomonas* (3) y el otro, al género *Bacillus* (11). Las bacterias amilolíticas caracterizadas podrían ser de potencial uso a nivel industrial.

**Palabras clave:** Salinas de San Blas, amilasas, genes ribosómicos 16S, ARDRA, *Bacillus*, *Halomonas*.

### Abstract

The aim of this study was to characterize halophilic amylolytic bacteria from San Blas Salterns-Junin, located in the Peruvian Andes at approximately 4 100 m of altitude. This study was conducted with 34 bacteria isolated from soil samples which were cultured in salt water medium (SW) 5 % containing 0,5 % yeast extract and 1 % starch. It was found that 41 % were starch-degrading bacteria, which were further characterized with conventional physiological and biochemical tests. Three bacteria were Gram-negative and eleven Gram-positive. Also, 21 % (3/14) was able to grow in a wide range of saltconcentration from 5 to 20 %. We reported that 14 % (2/14) of bacteria had all lipolytic, proteolytic and nucleolytic activity, and 29 % (4/14) had both proteolytic and nucleolytic activity. Bacteria were identified by restriction 16S ribosomal genes profiles, enzymes used were *Hae III*, *BstU I*, *Hinf I* and *Cfo I*. 16S ribosomal genes of seven isolated wick showed different DNA profiles were amplified, partial sequenced and analyzed using bioinformatic programs. By both phenotypic and molecular analysis of 14 amylolytic bacteria two groups were obtained, one belonged to the genus *Halomonas* (3) and the other, to the genus *Bacillus* (11). The characterized amylolytic bacteria could have a potential industrial use.

**Key words:** San Blas Salterns, amylases, 16S ribosomal genes, ARDRA, *Bacillus*, *Halomonas*.

**Recibido:** mayo 19 de 2014

**Aprobado:** octubre 24 de 2014

\* Químico Farmacéutica. Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 1 - Perú. p.canales.mormontoy@gmail.com.

\*\* Químico Farmacéutica, Magíster en Biotecnología. Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 1 - Perú. echavezhidalgo@yahoo.com.

\*\*\* Químico Farmacéutica, Magíster en Ciencias, Doctor en Medicina. Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 1 - Perú. azavaletap@unmsm.edu.pe.

## Introducción

Los ambientes hipersalinos poseen por lo general entre 8 y 10 veces mayor concentración salina que la del agua de mar, por ello son considerados extremos, varían en términos de salinidad, composición iónica, temperatura, pH y nutrientes; influenciados por la zona geográfica, el clima, la altitud, entre otros factores. Sin embargo, a pesar de las condiciones adversas son ecosistemas dinámicos y presentan gran diversidad microbiana (Bell 2012). Los microorganismos de estos ambientes producen compuestos tales como metabolitos y enzimas extracelulares con gran potencial industrial (Delgado-García *et al.*, 2012; Enache y Kamekura, 2010). Muchas de estas enzimas pueden ser estables y activas en más de una condición extrema, como elevada salinidad y temperatura, y/o amplio rango de pH (Delgado-García *et al.*, 2012). Actualmente, diversos procesos industriales se llevan a cabo en estas condiciones exigentes como en la hidrólisis del almidón, celulosa, entre otros.

Las amilasas hidrolizan el almidón para la obtención de dextrinas y polímeros pequeños compuestos por unidades de glucosa (Gupta *et al.*, 2003). Estas enzimas poseen aplicaciones en diversas industrias como la alimentaria, textil, papelería, de fabricación de detergentes, entre otras (Aiyer 2005; Pandey *et al.*, 2000). Aunque estas enzimas son producidas por procariotas y eucariotas; la fuente bacteriana es la preferida industrialmente por su crecimiento rápido y medios de cultivo poco exigentes. Así, las bacterias productoras de amilasas más descritas pertenecen al género *Bacillus*, entre éstas: *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* (Prakash y Jaiswal, 2010). A la vez, se han reportado algunas bacterias amilolíticas halófilas como *Chromohalobacter sp.* (Prakash *et al.*, 2009), *Halobacillus sp.* (Amoozegar *et al.*, 2003), *Halomonas meridiana* (Coronado *et al.*, 2000), *Bacillus dipsosauri* (Deutch 2002) y *Micrococcus sp.* 4 (Khire 1994).

Actualmente, con el creciente desarrollo industrial surge la necesidad de buscar nuevos microorganismos productores de amilasas eficientes con mejores características catalíticas. Al respecto, Babavalian *et al.* (2013) aislaron bacterias con actividad hidrolítica del lago hipersalino Aran-Bidgol en Irán. Ghozlan *et al.* (2006) reportan la biodiversidad y capacidad hidrolítica de bacterias halófilas moderadas de diferentes ambientes hipersalinos en Alejandría-Egipto, Cojoc *et al.* (2009) estudiaron bacterias productoras de enzimas extracelulares aisladas de una mina de sal en Slanic Prahova-Rumania, Sánchez-Porro *et al.* (2003) aislaron diversas bacterias halófilas moderadas productoras de enzimas hidrolíticas de diferentes ambientes hipersalinos en España. Así también, Prakash *et al.* (2009) reportaron la producción y purificación de amilasas bacterianas.

A nivel industrial, la degradación del almidón requiere diversas condiciones catalíticas desde muy suaves hasta extremas, por ello la búsqueda de bacterias productoras de amilasas de ambientes hipersalinos permitiría obtener fuentes alternativas de enzimas con nuevas características. En ese sentido, este estudio describe las características fenotípicas y genotípicas de bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas, ubicadas en los Andes peruanos.

## Materiales y Métodos

**Muestras.** El estudio se realizó con 34 bacterias aisladas de muestras de suelos de las Salinas de San Blas ubicadas en el distrito de Ondores, provincia de Junín, departamento de Junín (Perú), aproximadamente a 4100 de altitud entre las coordenadas geográficas 11°06'25" L.S. y 76°10'58" L.O. Para el aislamiento de los microorganismos se empleó el medio líquido agua de sales (SW) 5 % suplementado con extracto de levadura 0,5 % (Dyall-Smith 2006). El medio agua de sales a la concentración final de 5 % (g/L) contiene: NaCl 40,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5,83; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5,0; KCl 1,17; NaBr 0,13; CaCl<sub>2</sub> 0,083; NaHCO<sub>3</sub> 0,03, y suplementado con extracto de levadura 0,5 %. Medios sólidos SW fueron preparados adicionando 15 g/L de agar. Después, se realizaron tres pasajes sucesivos alternando medios sólidos y líquidos de SW 5 %. Finalmente, las bacterias se conservaron en agar SW 5 % con glicerol 5 % en refrigeración.

**Selección de bacterias amilolíticas.** Las bacterias se cultivaron en placas con medio agar almidón suplementado con 5 % de sales, se incubaron a 37 °C durante 48 h. La actividad amilolítica se detectó mediante la formación de halos translúcidos alrededor de las colonias después de la adición de solución de lugol sobre las placas (Amoozegar *et al.*, 2003). Las bacterias amilolíticas fueron seleccionadas para su posterior estudio.

**Características fisiológicas.** Se realizó la tinción Gram y se determinaron las características morfológicas de las colonias. Además, se evaluó la capacidad de crecimiento de las bacterias a concentraciones salinas de 0, 5, 10, 15 y 20 %, p/v; y a pH de 5, 6, 7, 8 y 9. Ambas pruebas se realizaron en medio líquido SW suplementado con 0,5 % de extracto de levadura.

**Actividades hidrolíticas extracelulares.** Se realizaron diversos ensayos en medios sólidos, todos a la concentración de 5 % de sales, según se describe a continuación.

La actividad proteolítica se determinó en placas de agar SW 5 % suplementado con skim milk 1 % y extracto de levadura 0,2 %. La formación de halos translúcidos alrededor de las colonias después de 48 h de incubación a 37 °C indicó la producción de proteasas (Ardakani *et al.*, 2012).

La actividad lipolítica se determinó en placas de agar SW 5 % suplementado con tributirina 1 %, tritón X-100 0,1 % y extracto de levadura 0,2 %. Las placas se incubaron a 37 °C por 48 h. La formación de halos alrededor de las colonias indicó la producción de lipasas (Sharma *et al.*, 2001).

La actividad celulolítica se evidenció en placas de agar SW 5 % suplementado con carboximetilcelulosa 1 % y extracto de levadura 0,2 %. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 h. Se usó solución rojo de congo 1 % como revelador. La formación de halos alrededor de las colonias indicó la presencia de celulasas (Teather y Wood, 1982).

La producción de DNasa se determinó en agar DNA suplementado con 5 % de sales, las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se empleó como revelador HCl 0,1N. La formación de halos alrededor de las colonias se reportó como actividad positiva (Onishi *et al.*, 1983).

**Amplificación de los genes ribosómicos 16S.** Se extrajo el ADN de las bacterias de acuerdo al método de solventes orgánicos según lo descrito por Chávez-Hidalgo (2010). Los genes ribosómicos 16S fueron amplificados usando cebadores universales específicos para el dominio Bacteria 16SBF 5'-AGAGTTTGATCATG-GCTCAG-3' y 16SBR 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'. El volumen final de la reacción de amplificación fue de 25 µL, y contenía 50 µM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP, KCl 50 µM, Tris/HCl 10 µM, tritón X-100 0,1 % (v/v), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Taq ADN-polimerasa 1,5 U y ADN 50 ng.

Las condiciones de reacción fueron: 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 45 s, 55 °C por 1 min y 72 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 7 min. Luego, los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X. Se empleó como marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb (Invitrogen).

**ARDRA.** Los productos amplificados de los genes ribosómicos 16S se cortaron con 5 U de enzima de restricción por µg de producto amplificado. Las enzimas fueron: *Hae III*, *BstU I*, *Hinf I* y *Cfo I* (Fermentas). Las condiciones de reacción usadas fueron según las especificaciones del fabricante, a excepción del tiempo de incubación que fue de 8 h a 37 °C. Luego de este periodo los productos de la digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve 3:1 al 3 % con buffer TBE 0,5X, los fragmentos de ADN se visualizaron por coloración con bromuro de etidio en un transiluminador UV a 254 nm. Se utilizó como marcador de peso molecular DNA φX174/*Hae III*. El análisis de los perfiles de restricción se realizó comparando los perfiles de ADN de una cepa con respecto a otra. La similitud de los perfiles fue estimada mediante el coeficiente de concordancia simple y el dendrograma

de similitud obtenido mediante el análisis de agrupamiento de pares por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA).

**Secuenciamiento y análisis filogenético.** Las bacterias que presentaron perfiles de ADN ribosómico 16S distintos fueron secuenciadas parcialmente. Se solicitó el servicio de secuenciación del Instituto de Medicina Tropical "Alexander Von Humbolt" de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) mediante el programa BLAST (Zhang *et al.*, 2000).

El alineamiento múltiple de las secuencias de las bacterias y de las obtenidas en la base de datos se realizó con el programa CLUSTALX versión 2.1 (Jeanmougin *et al.*, 1998), el alineamiento fue editado manualmente con el programa BIOEDIT versión 7.0.5.3. El árbol filogenético fue construido con el programa MEGA versión 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) empleando los métodos neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) y minimum-evolution (Rzhetsky y Nei, 1993). El análisis de bootstrap de 1000 repeticiones fue usado para evaluar la estabilidad relativa de las ramas del árbol filogenético (Felsenstein 1985).

## Resultados y Discusión

A nivel mundial, existen numerosos ambientes hipersalinos conteniendo gran diversidad de bacterias con potencial biotecnológico, sin embargo, los estudios realizados son aún escasos.

**Selección y caracterización de bacterias amilolíticas.** Las bacterias fueron aisladas a partir de muestras de suelos de las Salinas de San Blas ubicadas en los Andes peruanos aproximadamente a 4 100 m de altitud, entre las coordenadas geográficas 11°06'25" L.S. y 76°10'58" L.O. Las condiciones ambientales en este lugar son agrestes, con temperatura promedio de 6 °C y fuerte radiación solar durante el día (Morales 1998); a pesar de estas condiciones existe diversidad de microorganismos. Así, Maturrano *et al.* (2006) estudiaron la diversidad microbiológica de las Salinas de Maras (Cusco) ubicadas también en los Andes peruanos. A la vez, Flores *et al.* (2010) reportaron bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas provenientes de los ambientes salinos de Maras, Pilluana, Chilca y Paracas.

El 41 % (14/34) de las bacterias de las Salinas de San Blas presentó actividad amilolítica. Estas bacterias se denominaron como ESB 30, ESB 31, ESB 32, ESB 34, ESB 37, ESB 42, ESB 51, ESB 53, ESB 61, ESB 66, ESB 68, ESB 71, ESB 73 y ESB 79. De igual forma, Babavalian *et al.* (2013) describen que el 39 % de bacterias aisladas del lago hipersalino Aran-Bidgol en Irán fueron productoras de amilasas. Además, Cojoc *et al.* (2009) reportaron que el 32 % de las bacterias aisladas de

una mina salina en Slanic Prahova-Rumania fueron productoras de amilasas. Por otra parte, las 14 bacterias produjeron diversos tamaños de halos de hidrólisis en placas con agar almidón, el 21 % entre dos y tres cm de diámetro, el 36 % entre 1 y 2 cm, y el 43 % menor a 1 cm (tabla 1).

Todas las cepas fueron bacilos, tres Gram-negativos y once Gram-positivos, asimismo la morfología de las colonias fue variada. Trece de las bacterias fueron capaces de crecer en medios a pH entre 5 y 9. Además, tres crecieron en un amplio rango salino entre 5 y 20 %. De acuerdo a la clasificación propuesta por Kushner (1978), el 43 % de las bacterias fueron halófilas moderadas y el 57 % halotolerantes (tabla 1). En general, los bacilos Gram-positivos presentaron capacidad hidrolítica más diversa que los Gram-negativos, además de la actividad amilolítica presentaron capacidad proteolítica, lipolítica y nucleolítica, mientras que los Gram-negativos sólo exhibieron actividad amilolítica y nucleolítica.

**Actividad hidrolítica de las bacterias.** La capacidad para producir cuatro diferentes enzimas hidrolíticas fue evaluada cualitativamente en las 14 bacterias productoras de amilasas. No se detectó ninguna bacte-

ria capaz de degradar celulosa, posiblemente debido a la baja cantidad de este polímero en el ambiente hipersalino. Dos bacterias presentaron cuatro actividades hidrolíticas combinadas (amilolítica, lipolítica, proteolítica y nucleolítica), cuatro presentaron tres y cinco mostraron dos actividades hidrolíticas (tabla 2). Al respecto, Sánchez-Porro *et al.* (2003) reportaron sólo cuatro bacterias con cinco hidrolasas (amilasa, proteasa, lipasa, DNasa y pululanasa), 36 con tres y 20 con dos de 122 bacterias halófilas moderadas aisladas de ambientes hipersalinos en España. En el estudio de Babavalian *et al.* (2013), de 83 bacterias halófilas moderadas se reportaron bacterias que produjeron desde dos hasta ocho hidrolasas.

**Análisis ARDRA.** El producto amplificado de los genes ribosómicos 16S midió aproximadamente 1400 pb, después la digestión con las enzimas de restricción produjo fragmentos de diferentes tamaños. Con *Hae III* se obtuvieron fragmentos entre 118 y 603 pb; *BstU I*, de 61 a 1335 pb; *Hinf I*, de 120 a 1353 pb; y *Cfo I*, de 155 a 1306 pb (figura 1). Un total de 5, 4, 6 y 5 perfiles de restricción fueron identificados con *Hae III*, *BstU I*, *Hinf I* y *Cfo I*, respectivamente.

**Tabla 1.** Características fenotípicas de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas-Junín

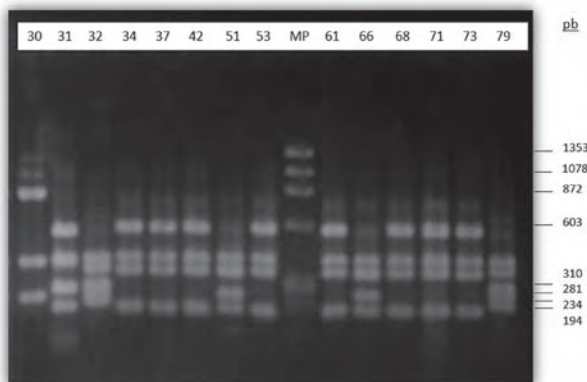
Bacterias	Características						
	Morfología	Tinción Gram	Color de la colonia	Forma de la colonia	Rango de sales (% p/v)	Rango de pH	Tamaño de halo de hidrólisis (mm)*
ESB 30	bacilo	+	crema claro	redonda	5-15	5-9	26
ESB 31	bacilo	-	crema	redonda	5-20	5-9	9
ESB 32	bacilo	-	amarillo tenue	amorfa	5-20	5-9	18
ESB 34	bacilo	+	crema oscuro	redonda	0-15	5-9	24
ESB 37	bacilo	+	crema	redonda	0-10	5-9	6
ESB 42	bacilo	+	crema	redonda	0-15	5-8	17
ESB 51	bacilo	+	anaranjado	redonda	5-15	5-9	8
ESB 53	bacilo	+	crema amarillo	redonda	0-15	5-9	25
ESB 61	bacilo	+	crema	redonda	0-15	5-9	8
ESB 66	bacilo	+	crema claro	amorfa	0-10	5-9	17
ESB 68	bacilo	+	crema claro	redonda	5-10	5-9	8
ESB 71	bacilo	+	crema amarillo	redonda	0-15	5-9	15
ESB 73	bacilo	+	amarillo tenue	redonda	0-10	5-9	12
ESB 79	bacilo	-	amarillo tenue	amorfa	5-20	5-9	8

\* En placas de agar almidón.

**Tabla 2.** Hidrólisis de sustratos de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas-Junín

Cepa bacteriana	Hidrólisis de sustratos			
	Tributirina	Caseína	CMC*	DNA
ESB 30	+	+	-	+
ESB 31	-	-	-	+
ESB 32	-	-	-	-
ESB 34	-	+	-	+
ESB 37	-	+	-	-
ESB 42	-	+	-	+
ESB 51	-	+	-	+
ESB 53	-	+	-	+
ESB 61	-	+	-	-
ESB 66	-	-	-	-
ESB 68	-	+	-	-
ESB 71	+	+	-	+
ESB 73	-	+	-	-
ESB 79	-	-	-	-

\* CMC: carboximetilcelulosa.



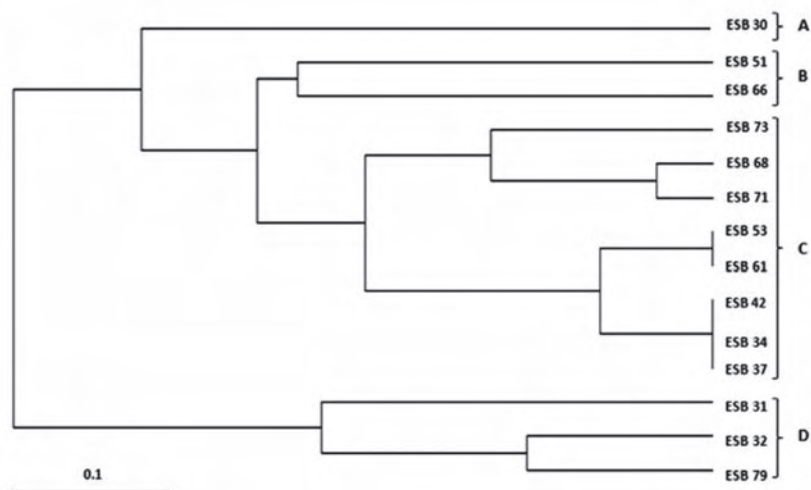
**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Se observan los patrones de bandas producto de la digestión de los genes ribosómicos 16S con *Cfo I*. 30, ESB 30; 31, ESB 31; 32, ESB 32; 34, ESB 34; 37, ESB 37; 42, ESB 42; 51, ESB 51; 53, ESB 53; 61, ESB 61; 66, ESB 66; 68, ESB 68; 71, ESB 71; 73, ESB 73; 79, ESB 79, MP, marcador de peso molecular DNA  $\phi$ X174/*Hae III*.

Del análisis de los perfiles de restricción usando el coeficiente de concordancia simple y el UPGMA se obtuvo el dendrograma de similitud. El dendrograma de similitud muestra que las bacterias en su mayoría se asocian con un nivel de similitud de 75 % en cuatro grupos denominados como A, B, C y D. Sólo la cepa ESB30 formó un grupo individual (figura 2).

ARDRA es una técnica para el análisis de la estructura de comunidades microbianas cuando se cumplen determinadas condiciones que eliminan las falsas similitudes, como el uso de varias enzimas de restricción o de genes de rápida evolución. En el dendrograma de similitud obtenido se observan dos brazos principales, luego a partir de los cuales se diferencian los grupos A, B, C y D. Estos brazos principales coinciden con las dos grandes ramas que los géneros *Bacillus* y *Halomonas* forman en el árbol filogenético. Así también, se puede señalar que las cepas ESB 32 y ESB 79 se encuentran estrechamente relacionadas entre ellas en el árbol filogenético, al igual que en el análisis ARDRA. Es así que, la topología del dendrograma obtenido a partir de los perfiles de ADN es similar a la basada en las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 16S (figuras 2 y 3). Esto muestra que el análisis de los patrones de ADN de genes considerados cronómetros moleculares es consistente con las secuencias nucleotídicas. ARDRA ha mostrado ser útil en la agrupación de aislamientos bacterianos de diversos orígenes para su posterior identificación (Yeon *et al.*, 2005).

**Secuenciamiento y análisis filogenético.** En base al análisis molecular y a las características fenotípicas, las bacterias fueron identificadas como miembros de los géneros *Halomonas* y *Bacillus* (figura 3).

Las tres bacterias Gram-negativas fueron identificadas como miembros del género *Halomonas*, mientras que



**Figura 2.** Dendrograma de similitud de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas-Junín. Obtenido de la comparación de los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados.

las once bacterias Gram-positivas, como miembros del género *Bacillus*. Sánchez-Porro *et al.* (2003) reportó resultados similares, señalando como géneros Gram-negativos predominantes *Salivibrio* y *Halomonas*, y como Gram-positivos predominantes, *Bacillus* y *Salibacillus*. Resultados diferentes describieron Rohban *et al.* (2009) quienes reportan como género Gram-negativo predominante a *Salicola* y entre los Gram-positivos, los géneros *Virgibacillus* y *Thalassobacillus* de bacterias halófilas aisladas del lago hipersalino Howz Soltan-Irán. Las características propias de cada ambiente hipersalino puede influir en la diversidad microbiana e incluso en las características que los microorganismos pueden desarrollar (Bell 2012); es por ello que al comparar los estudios de ambientes hipersalinos, la diversidad y características de los microorganismos varía.

En estudios similares, se identificaron bacterias halófilas productoras de amilasas, tal como Babavalian *et al.* (2013) quienes identificaron como principales géneros amilolíticos *Halobacillus*, *Thalassobacillus* y *Halomonas*. Ellos también identificaron representantes del género *Bacillus* pero con crecimiento débil en pH neutro y sin crecimiento a valores más bajos de pH, a diferencia de nuestro estudio donde todas las cepas de *Bacillus* crecieron desde pH 5 hasta 8-9. También reportaron la producción de proteasas y lipasas en algunas cepas amilolíticas de *Halomonas*, a diferencia de nuestro estudio dónde sólo reportamos DNasa en cepas amilolíticas de *Halomonas*. Así también, Rohban *et al.* (2009) reportaron como productores de amilasas, los géneros *Salicola*, *Halovibrio*, *Halomonas*, *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Piscibacillus* y *Salinicoccus*. A diferencia de nuestro estudio, algunos representantes de *Halomonas* mostraron actividad celulolítica. Es así que las cepas aisladas

de las Salinas de San Blas tienen características propias de acuerdo a las condiciones en dicha salina.

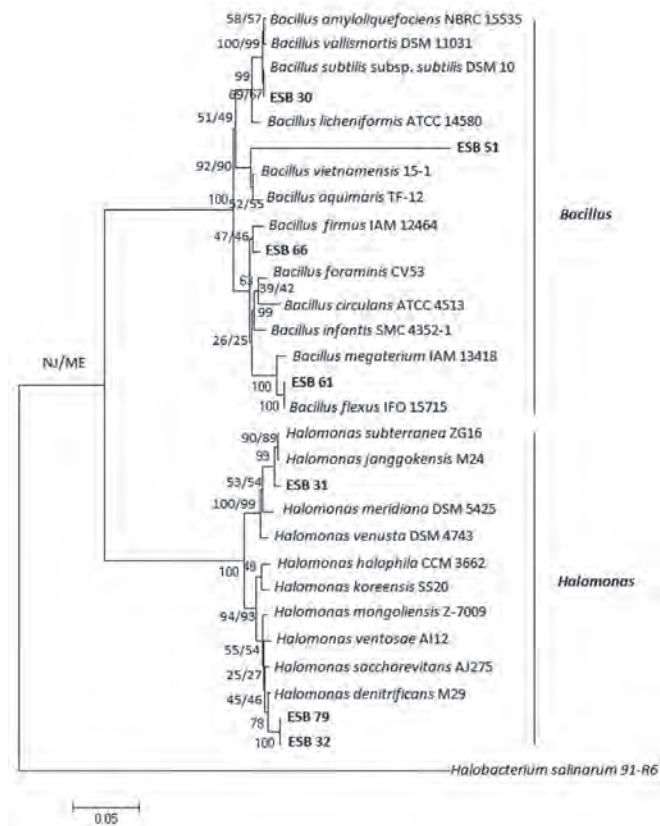
Cabe mencionar que el género *Bacillus* detectado en este estudio es ampliamente reconocido como productor de enzimas para diversos procesos industriales (Prakash y Jaiswal, 2010; Nascimento y Martins, 2004). Muchos microorganismos halófilos presentan actividad hidrolítica combinada, lo cual representa una ventaja para varios procesos industriales, como en el tratamiento de residuos que contienen alta salinidad. Las amilasas y otras enzimas provenientes de microorganismos halófilos se espera que muestren actividades óptimas en condiciones extremas. Así, este estudio permite tener un mayor conocimiento sobre la diversidad y capacidad hidrolítica de bacterias halófilas aisladas de ambientes hipersalinos peruanos. Muchas de sus enzimas podrían ser activas bajo condiciones extremas, lo cual las convertiría en fuentes promisorias para uso industrial, para lo cual se requerirían estudios posteriores.

## Conclusiones

De las Salinas de San Blas, Ondores-Junín, se aislaron 14 bacterias con actividad amilolítica, pertenecientes 11 al género *Bacillus* y 3 a *Halomonas*. Estos microorganismos crecen en diversos rangos salinos y dos de ellos son capaces de producir proteasas, lipasas y DNasas.

## Agradecimientos

Este estudio fue financiado parcialmente con los contratos 017-Fincyt-PIBAP-2008, y VRI-UNMSM 2012.



**Figura 3.** Árbol filogenético mostrando la posición de las bacterias de las Salinas de San Blas-Junín. Basado en la comparación de las secuencias parciales de los genes ribosómicos 16S y analizado con Mega 5.0.

## Referencias bibliográficas

- Aiyer, P.V. 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*. 4(13):1525-1529.
- Amoozegar, M.A.; Malekzadeh, F.; Malik, K.A. 2003. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of Microbiological Methods*. 52(3):353-359.
- Ardakani, M.R.; Poshtkouhian, A.; Amoozegar, M.A.; Zolgharnein, H. 2012. Isolation of moderately halophilic *Pseudoalteromonas* producing extracellular hydrolytic enzymes from persian gulf. *Indian Journal of Microbiology*. 52(1):94-98.
- Babavalian, H.; Amoozegar, M.A.; Pourbabae, A.A.; Moghaddam, M.M.; Shakeri, F. 2013. Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. *Microbiology*. 82(4):466-474.
- Bell, E.; editor. 2012. *Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival*. Wallingford: CABI, p 554.
- Chávez-Hidalgo, E.L. 2010. Bacterias halófilas moderadas con actividad lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana-San Martín. Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Cojoc, R.; Merciu, S.; Popescu, G.; Dumitru, L.; Kamekura, M.; Enache, M. 2009. Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. *Romanian Biotechnological Letters*. 14 (5):4658-4664.
- Coronado, M-J.; Vargas, C.; Hofemeister, J.; Ventosa, A.; Nieto, J.J. 2000. Production and biochemical characterization of an  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiology Letters*. 183(1):67-71.
- Delgado-García, M.; Valdivia-Urdiales, B.; Aguilar-González, C.N.; Contreras-Esquivel, J.C.; Rodríguez-Herrera, R. 2012. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(13): 2575-2580.
- Deutch, C.E. 2002. Characterization of a salt-tolerant extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Letters in Applied Microbiology*. 35(1):78-84.
- Dyall-Smith, M.; editor. 2006. *The halohandbook. Protocols for haloarchaeal genetics*. Melbourne: University of Melbourne. p 144.
- Enache, M.; Kamekura, M. 2010. Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Romanian Journal of Biochemistry*. 47(1):47-59.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(4):783-791.
- Flores, M.L.; Zavaleta, A.I.; Zambrano, Y.; Cervantes, L.; Izaguirre, V. 2010. Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. *Ciencia e Investigación*. 13(1):42-46.
- Ghozlan, H.; Deif, H.; Kandil, R.A.; Sabry, S. 2006. Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 52(2):63-72.
- Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 38(11):1599-1616.
- Jeanmougin, F.; Thompson, J.D.; Gouy, M.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*. 23(10): 403-405.

- Khire, J.M. 1994. Production of moderately halophilic amylase by newly isolated *Micrococcus* sp. 4 from a salt-pan. *Letters in Applied Microbiology*. 19(4): 210-212.
- Kushner, D.J.; editor. 1978. *Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria*. In *Microbial Life in Extreme Environments*. London: Academic Press, p 317-368.
- Maturrano, L.; Santos, F.; Rosselló-Mora, R.; Antón, J. 2006. Microbial diversity in Maras Salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(6):3887-3895.
- Morales, D. 1998. Importancia de las Salinas de San Blas durante el periodo formativo en la Sierra Central del Perú. *Boletín de Arqueología PUCP*. (2): 273-288.
- Nascimento, W.C.A.D.; Martins, M.L.L. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35(1-2):91-96.
- Onishi, H.; Mori, T.; Takeuchi, S.; Tani, K.; Kobayashi, T.; Kamekura, M. 1983. Halophilic nuclease of a moderately halophilic *Bacillus* sp.: production, purification, and characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 45(1):24-30.
- Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C.R.; Soccol, V.T.; Singh, D.; Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 31:135-152.
- Prakash, B.; Vidyasagar, M.; Madhukumar, M.S.; Muralikrishna, G.; Sreeramulu, K. 2009. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochemistry*. 44(2):210-215.
- Prakash, O.; Jaiswal, N. 2010.  $\alpha$ -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160(8):2401-2414.
- Rohban, R.; Amoozegar, M.A.; Ventosa, A. 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 36(3): 333-340.
- Rzhetsky, A.; Nei, M. 1993. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*. 10(5):1073-1095.
- Saitou, N.; Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4):406-425.
- Sánchez-Porro, C.; Martín, S.; Mellado, E.; Ventosa, A. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*. 94(2):295-300.
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19(8):627-662.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28(10):2731-2739.
- Teather, R.M.; Wood, P.J. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 43(4):777-780.
- Yeon, S-H.; Jeong, W-J.; Park, J-S. 2005. The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *The Journal of Microbiology*. 43(1):1-10.
- Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7(1-2):203-214.