

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**CAPACIDAD DEGRADATIVA *in vitro* DE AZÚCARES, GRASAS
Y PROTEÍNAS POR BACTERIAS *Pseudomonas*, *Bacillus* y
Enterobacter DE LA RIZÓSFERA DE *Schoenoplectus tatora* DEL
LAGO TITICACA, 2017**

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. LISBETH MARQUEZ QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO - PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



CAPACIDAD DEGRADATIVA *in vitro* DE AZÚCARES, GRASAS Y
PROTEÍNAS POR BACTERIAS *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*
DE LA RIZÓSFERA DE *Schoenoplectus tatora* DEL LAGO TITICACA,
2017

TESIS**PRESENTADA POR:**

Br. LISBETH MARQUEZ QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADA POR:**PRESIDENTE**

M. Sc. EVA LAURA CHAUCA DE MEZA

PRIMER MIEMBRO

Mg. MARTHA ELIZABETH APARICIO SAAVEDRA

SEGUNDO MIEMBRO

M. Sc. VICKY CRISTINA GONZÁLES ALCOS

ASESOR DE TESIS

Dr. Sc. JUAN JOSÉ PAURO ROQUE

ÁREA: Ciencias Biomédicas**TEMA:** Biotecnología Microbiana**Fec****stentación:** 28 de diciembre del 2018.

DEDICATORIA

A Nuestro Señor Dios.

*Por haberme dado la vida, salud, sabiduría y fortaleza en los momentos de debilidad;
para seguir siempre adelante con el fin de lograr mis objetivos y metas trazadas.*

A mis padres

Bacilio Marquez Escobedo

Felicitas T. Quispe Vilca.

*Pilar fundamental en mi vida, por confiar y apoyarme incondicionalmente para que
no desista de mis estudios. Con mucho amor, les dedico todo mi esfuerzo en
reconocimiento a todo el sacrificio que hicieron para que pueda estudiar, se merecen
esto y mucho más, es por ellos que soy lo que soy ahora.*

A mis hermanos.

*Por todo el apoyo incondicional que recibí siempre por parte de ellos, en los momentos
importantes de mi vida.*

Lisbeth Marquez Quispe

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, la Universidad Nacional del Altiplano, y los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, por sus enseñanzas compartidas durante mi formación profesional.

De manera muy especial, a mis queridos padres por brindarme su apoyo en todo momento para la culminación exitosa de mis estudios superiores.

Al Dr. Juan José Pauro Roque, por su dirección, asesoría, amistad y apoyo incondicional durante el desarrollo de la presente Tesis.

Al jurado conformado por los docentes, M. Sc. Eva Laura Chauca de Meza, Mg. Martha Elizabeth Aparicio Saavedra, M. Sc. Vicky Cristina Gonzales Alcos, por sus sugerencias y revisión del informe final de tesis.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....	9
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2.1 Antecedentes	14
2.2 Marco teórico	18
2.2.1 Bacterias degradadoras de materia orgánica	18
2.2.2 Biodegradación bacteriana de materia orgánica.....	24
2.2.3 Tatora (<i>Schoenoplectus tatora</i>).....	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1 Área de estudio	41
3.2 Tipo de estudio	41
3.3 Muestra.....	41
3.4 Identificación de las especies bacterianas	42
3.4.1 Aislamiento de bacterias rizosféricas	42
3.4.2 Identificación de bacterias rizosféricas	43
3.4.3 Análisis estadístico de datos.....	46
3.5 Evaluación de la capacidad degradativa <i>in vitro</i> de las bacterias.....	47
3.5.1 Preparación del inóculo.....	47
3.5.2 Evaluación de bacterias del grupo fisiológico amilolítico	48
3.5.3 Evaluación de bacterias del grupo fisiológico lipolítico	48
3.5.4 Evaluación de bacterias del grupo fisiológico proteolítico	49
3.5.5 Análisis estadístico de datos.....	50
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
V. CONCLUSIONES.....	78
VI. RECOMENDACIONES	79
VII. REFERENCIAS	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características bioquímicas que diferencian especies de los géneros <i>Enterobacter</i> , <i>Cronobacter</i> y <i>Pantoea</i> (Lopardo, 2016).....	23
Tabla 2. Clave bioquímica para la taxonomía bacteriana del género <i>Pseudomonas</i> (Nicola, 2010).....	45
Tabla 3. Clave bioquímica para la taxonomía bacteriana del género <i>Bacillus</i> (Márquez, 2007).....	45
Tabla 4. Clave bioquímica para la taxonomía bacteriana del género <i>Enterobacter</i> (Nicola, 2010).....	46
Tabla 5. Recuentos bacterianos (UFC/ml) de la rizosféricas aisladas en totora, setiembre - octubre 2017.....	51
Tabla 6. Recuento (UFC/ml) por <i>Bacillus subtilis</i> degradadoras de almidón, de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017.....	59
Tabla 7. Degradación de almidón (UFC/ml) por <i>Bacillus subtilis</i> , de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017. .	60
Tabla 8. Recuento (UFC/ml) de las bacterianas degradadoras de grasas, de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017.....	63
Tabla 9. Degradación de grasas (UFC/ml) de las bacterianas, de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017. .	66
Tabla 10. Recuento (UFC/ml) bacterianas degradadoras de proteínas, de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017.....	70
Tabla 11. Degradación de proteínas (UFC/ml) de las bacterianas, de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017. .	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos en la rizósfera de la totora, setiembre – octubre 2017.	52
Figura 2. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos de la rizósfera de la totora en dos zonas de muestreo, setiembre – octubre 2017.	53
Figura 3. Prueba de Tukey de los recuentos de <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/ml) en agar almidón, setiembre – octubre 2017.	60
Figura 5. Prueba de Tukey de los recuentos de bacterias aisladas (UFC/ml) en agar Tributirina, octubre 2017.	64
Figura 6. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos (UFC/ml) en agar Tributirina según zona de muestreo, octubre 2017.	65
Figura 7. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos de la rizósfera de la totora en dos zonas de muestreo, setiembre – octubre 2017.	67
Figura 8. Prueba de Tukey de los recuentos de bacterias con actividad lipolítica según la procedencia de la zona de muestreo, setiembre – octubre 2017.	67
Figura 9. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos en agar caseína, octubre 2017.	71
Figura 10. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos en agar caseína según zona de muestreo, octubre 2017.	72
Figura 11. Prueba de Tukey de la capacidad degradativa (mm) de bacterias en agar caseína, octubre 2017.	74
Figura 12. Prueba de Tukey de la capacidad degradativa de bacterianos según zona de estudio, octubre 2017.	74
Figura 13. Toma de muestra de las raíces adventicias y rizomas subterráneas de <i>Schoenoplectus tatora</i> de los Uros Chulluni y la Reserva Nacional del Titicaca, setiembre - octubre 2017.	96
Figura 14. Lavado de las raíces adventicias y rizomas subterráneas de la tora y las diluciones, laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre – noviembre 2017.	96
Figura 15. Medios de cultivo preparadas para la identificación bacteriana, laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre – noviembre 2017.	96

Figura 16. Colonias aisladas en agar <i>Pseudomonas</i> (izquierda) y agar EMB (derecha), laboratorio de Microbiología de los alimentos, durante el mes de setiembre, 2017.	97
Figura 17. Conservación de géneros aislados en tubo de ensayo con agar Muller Hinton inclinado a 4 °C, laboratorio de Microbiología de los alimentos, setiembre 2017.	97
Figura 18. Batería de coloración Gram y procesamientos de muestras para la observación de morfología y Gram, laboratorio de Microbiología de los alimentos, setiembre 2017.	97
Figura 19. Observación microscópica bacilos Gram negativos (izquierda), bacilos Gram positivos (centro), bacilos con esporas señaladas por la flecha amarilla (derecha), laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre – 2017.	98
Figura 20. Cultivo de las bacterias en pruebas bioquímicas para su identificación, laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre 2017.	98
Figura 21. Pruebas bioquímicas de identificación del género <i>Pseudomonas</i> , laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre 2017.	98
Figura 22. Crecimiento del género <i>Enterobacter aerogenes</i> en agar ENDO (izquierda) y <i>Escherichia coli</i> (derecha), laboratorio de Microbiología de los alimentos, setiembre 2017.	99
Figura 23. Crecimiento de bacterias en agar almidón (izquierda) y su revelado con lugol en la producción de amilasas (derecha), laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre - 2017.	99
Figura 24. Crecimiento de bacterias en agar Tributirina y zonas de degradación de grasas (flechas rojas), laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre - 2017.	99
Figura 25. Crecimiento de bacterias en agar caseína y zonas de degradación de la proteína (flechas rojas), laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre - 2017.	100
Figura 26. Formación de halos de degradación de almidón (F, izquierda) y de caseína (C, derecha), laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre - 2017.	100

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- °C: grados centígrados
- ATCC: American Type Culture Collection
- CS: Citrato Simmons
- C. V.: Coeficiente de varición
- EMB: Eosin Metil Blue
- et al.*: y colaboradores
- FCCBB: Facultad de Ciencias Biológicas
- g: gramos
- LIA: Lisina hierro agar
- ml: mililitro
- n: tamaño de muestra
- Nº: número
- RNT: Reserva Nacional del Titicaca
- sp: especies
- TSI: Triple azúcar hierro
- UNAP: Universidad Nacional del Altiplano - Puno

RESUMEN

La investigación se realizó en el ámbito acuático del centro poblado de Uros Chulluni y la Reserva Nacional del Titicaca, en el distrito, provincia y región Puno, durante los meses de setiembre a octubre del 2017. Los objetivos específicos fueron: a) Identificar las especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* de la rizófera de *Schoenoplectus tatora*, procedentes de la localidad de Uros Chulluni y la Reserva Nacional del Titicaca y b) Evaluar la capacidad degradativa “*in vitro*” de almidón, grasas (Tributirina) y proteínas (caseína) por *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *B. subtilis*, *E. cloacae* y *E. aerogenes* de la rizósfera de *S. tatora*. Las muestras de totora, procedieron del lago Titicaca, colectándose las raíces adventicias y tallos, siendo metodologías estandarizadas se procedieron al cultivo en agares: Pseudomonas, EMB y Mueller Hinton, la identificación de las especies bacterianas se realizó mediante pruebas bioquímicas (INS); la capacidad degradativa de las bacterias rizosféricas fueron evaluadas utilizando los sustratos almidón, azúcares y lípidos en medios específicos como el agar Tributirina y agar Caseína. Los datos fueron analizados mediante pruebas de análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey y medidas de tendencia central. Resultados: Las bacterias aisladas de *S. tatora* en zonas de estudio fueron: *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *B. subtilis*, con diferencias estadísticas entre bacterias y entre zonas ($P < 0.05$); *B. subtilis* tuvo el efecto degradativo del almidón y las bacterias *Ps. fluorescens* degradaron grasas y proteínas determinando que la capacidad degradativa de las bacterias fue significativa según bacterias y zonas ($P < 0.05$). Se concluye en que las bacterias aisladas poseen la capacidad degradativa de almidón, grasas y caseína, variando según la bacteria aislada.

Palabras clave: Bacterias, biodegradación, compuestos orgánicos, totora.

ABSTRACT

The research was conducted in the aquatic environment of the center of Uros Chulluni and the Titicaca National Reserve, in the district, province and Puno region, during the months of September to October 2017. The specific objectives were: a) Identify the species of the genera *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Enterobacter* of the rhizosphere of *Schoenoplectus tatora*, from the locality of Uros Chulluni and the Titicaca National Reserve and b) Evaluate the in vitro degradability of starch, fats (Tributyrin) and proteins (casein) by *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *B. subtilis*, *E. cloacae* and *E. aerogenes* of the rhizosphere of *S. tatora*. The samples of totora, came from Lake Titicaca, collecting the adventitious roots and stems, being standardized methodologies were proceeded to cultivation in agars: Pseudomonas, EMB and Mueller Hinton, the identification of bacterial species was performed by biochemical tests (INS); The degradative capacity of rhizospheric bacteria was evaluated using starch substrates, sugars and lipids in specific media such as Tributirin agar and Casein agar. The activities were analyzed by analysis of variance (ANOVA), Tukey test and measures of central tendency. Results: Bacteria isolated from *S. tatora* in study areas were: *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* and *B. subtilis*, with statistical differences between bacteria and between zones ($P < 0.05$); *B. subtilis* had the degradative effect of starch and the bacteria *Ps. fluorescens* degraded fats and proteins determining that the degradation capacity of the bacteria was significant according to bacteria and zones ($P < 0.05$). It is concluded that the isolated bacteria possess the degradative capacity of starch, fats and casein, varying according to the isolated bacterium.

Key words: Bacteria, biodegradation, organic compounds, totora.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias presentes en la rizósfera de la totora (*Schoenoplectus tatora*), actúan purificando el agua mediante procesos aerobios de degradación, gracias al transportar grandes cantidad de oxígeno desde los tallos hasta las raíces y rizomas, donde es usado por dichos microorganismos, además del oxígeno en la zona radicular, las bacterias son favorecidas por exudados de las plantas en la misma zona, como fuente de nutrientes y energía, interaccionando con la planta e influyendo en su crecimiento y en la defensa frente a fitopatógenos, entre ellos se mencionan a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*, entre otros, los cuales poseen una gran versatilidad metabólica y se utilizan como bacterias modelo para analizar la colonización competitiva de la rizósfera de diversos tipos de planta y muchas de ellas sintetizan enzimas con capacidad degradativa de compuestos orgánicos, tales como los azúcares, grasas y proteínas.

Las aguas residuales domésticas, entre los principales compuestos se pueden hallar proteínas (40 – 60%), carbohidratos (25 – 50%) y grasas y aceites (10%), la urea y el amoníaco como fuentes de nitrógeno y las proteínas, puede aportar azufre, hierro y fósforo (5%), otros compuestos importantes son los azúcares como la glucosa, lactosa, sacarosa, fructosa y galactosa; y los ácidos como el acético, propiónico, butírico, láctico y cítrico, también, se pueden encontrar celulosa, almidón y lignina, glicerina y ácidos grasos, lo cuales pueden ser degradados por bacterias presentes en las rizósferas de las plantas acuáticas.

Es por ello que se aislaron, identificaron y experimentaron su capacidad degradativa de las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* a partir de la rizósfera de la totora (*Schenoplectus tatora*), con la finalidad de evaluar su capacidad degradativa de azúcares (almidón), grasas (Tributirina) y proteínas (caseína), y que en el futuro podrían ser utilizados en procesos de biorremediación de aguas residuales.

Los resultados de la investigación, indica que las bacterias aisladas a partir de la rizósfera de la totora, degradaron materia orgánica entre ellos almidón, grasas y caseína, estos resultados contribuyen al conocimiento de la existencia de bacterias con capacidad degradativa, las cuales podrían ser usadas en procesos de tratamiento de aguas residuales, para la disminución de su composición química en materia orgánica. Por tal razón esta investigación tuvo los siguientes objetivos específicos:

- Identificar las especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* de la rizófera de *Schoenoplectus tatora*, procedentes de la localidad de Uros Chulluni y la Reserva Nacional del Titicaca.
- Evaluar la capacidad degradativa “*in vitro*” de almidón, grasas (Tributirina) y proteínas (caseína) por *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* de la rizósfera de *Schoenoplectus tatora*.

I. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

La actividad solubilizadora de fosfatos y la promoción del crecimiento vegetal mediante la producción de ácido indolacético por microorganismos rizosféricos de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* determinándose las bacterias *Enterobacter* sp., *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* (Sánchez *et al.*, 2018), *Pseudomonas aeruginosa* en ciertos efluentes grasos recolectados de locales de expendio de comida rápida y comprobaron que a 37 °C, un tiempo de 24 h y un pH inicial de 7, el microorganismo producen enzimas satisfactoriamente y que a tiempos mayores a 24 h (48 y 72 h) la actividad de enzima decrece, debido a la acción de otras enzimas por medio de los cuales *Pseudomonas* consume también los ácidos grasos liberados y por consiguiente se reduce la cantidad de NaOH usada para el punto final (Huane & Rivera, 2014).

Las bacterias lipolíticas endógenas de un residuo graso industrial para tratar biológicamente con un consorcio bacteriano preparado con las cepas de *Pseudomonas* (cepas 1 y 2), *Bacillus* (cepas 3 y 4) y *Enterobacter* (cepa 5), en 21 días y a temperatura ambiente, degradó 341.5 mg de grasa (91.4% de degradación), la carga bacteriana superó 10^{10} UFC/ml, la DBO₅ 20° y DQO disminuyeron en un 33.6% y 59.8%, por tanto, fueron efectivas en eliminar el 90% del volumen de residuos grasos y olores desagradables de trampas de grasa de empresas procesadoras de cerdos y aves, representando una herramienta útil para el tratamiento de estos residuos (González *et al.*, 2012); debido a que las lipasas son las enzimas más utilizadas en

procesos biotecnológicos y en procesos químicos, la investigación se enfocó en la búsqueda de nuevos microorganismos con propiedades lipolíticas deseadas (Aceves & Castañeda, 2012).

Se obtuvo 22 aislamientos bacterianos capaces de hacer disponible el fósforo (P) a partir de fosfato tricálcico, de los cuales siete mantuvieron su capacidad solubilizadora a la quinta resiembra, los cuales fueron nominados como UNBS1 a UNBS7 (Patiño & Sánchez, 2012); las aguas poseen contaminantes como carbohidratos, proteínas y ácidos grasos y los agentes biológicos poseen ventajas en la eliminación de estos contaminantes, y aislaron 58 cepas bacterianas de la rizósfera de hidrófitas *Typha dominguensis*, para la remoción de materia orgánica, de los cuales 13 cepas seleccionadas removieron el DQO, 21 cepas mostraron respuestas satisfactorias para asimilar diferentes fuentes de carbono e hidrolizar proteínas y lípidos, en un tiempo de 72 horas, concluyendo que dichas cepas podrían ser utilizadas potencialmente en un sistema de tratamiento de aguas y contribuir a la remediación de efluentes (Salgado *et al.*, 2012),

La totora (*Schoenoplectus tatora*), es útil para actuar a modo de soporte para el desarrollo de biopelículas de microorganismos que actúan purificando el agua mediante procesos aerobios de degradación, transportar grandes cantidades de oxígeno desde los tallos hasta las raíces y rizomas, donde es usado por dichos microorganismos, además del oxígeno en la zona radicular, las bacterias son favorecidas por exudados de las plantas en la misma zona (Delgadillo *et al.*, 2010); existe un gran número de microorganismos que sintetizan lipasas, sólo algunas especies de bacterias se evaluaron en la producción de lipasas adaptadas al frío, entre las cepas productoras de

lipasas a temperaturas bajas se tiene a *Acinetobacter* sp., *Achromobacter lipolyticum*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus sphaericus*, *Photobacterium lipolyticum*, *Morexella* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Psychrobacter okhotskensis*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus epidermidis* (Joseph *et al.*, 2007),

Los microorganismos con un alto potencial para producir lipasas habitan principalmente los desechos o residuos de aceites vegetales utilizados en la elaboración de frituras, industrias de productos lácteos, suelos contaminados con aceites y alimentos deteriorados, a partir de éstos nichos se han aislado bacterias, hongos filamentosos, levaduras y actinomicetos, entre los que sobresalen los géneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Candida* y *Geotrichum* sp, por su capacidad para producir lipasas extracelulares, facilitando la recuperación de estas enzimas a partir del medio de cultivo (Ertugrul *et al.*, 2007); según 3 cepas en un proceso de compostaje de materia orgánica, L1, L2 y L3 de las cuales L1 presentó antagonismo, la cepa L3 presentó actividad enzimática lipolítica, el compost obtenido resultó con N orgánico 1.59%, P 1.32%, K 2.53% y respecto a *Escherichia coli* y *Salmonella* sp presentaron una disminución en su cantidad porque alcanzaron una temperatura máxima de 65.2 °C en la sexta semana (Cepeda & Valencia, 2007),

El seleccionar cepas microbianas de diferente hábitat, con capacidad amilolítica experimentó con boniato (*Ipomea batata* Lam.) fresco rallado, ajustados a pH de 4, 5, 6, 7 y 8 (con soluciones al 10% de HCl y NaOH) y se colocó en cuatro ambientes diferentes, por un período de cinco días y obtuvieron 32 cepas puras, de ellas el 31.2% con capacidad amilolítica, de los cuales los hongos presentaron mayores

índices de potencia seguidos por las bacterias (Rodríguez *et al.*, 2006); grupos bacterianos asociados a las raíces de las plantas acuáticas *Pistia* sp, *Eichhornia* sp y *Azolla* sp y entre los géneros bacterianos se encuentran *Acinetobacter* sp, *Aeromonas* sp, *Citrobacter* sp, *Chromobacterium* sp, *Enterobacter* sp, *Flavimonas* sp, *Klebsiella* sp, *Kluyvera* sp, *Pseudomonas* sp, *Morganella* sp, *Pantoea* sp, *Providencia* sp, *Serratia* sp, *Stenotrophomonas* sp y *Rahnella* sp, a algunos se les atribuye alguna relación con la depuración natural de las aguas residuales especialmente en procesos desnitrificantes y eliminación de fosfatos y algunos son patógenos (Rojas, 2005),

2.2 Marco teórico

2.2.1 Bacterias degradadoras de materia orgánica

a. Genero *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* sp. se identifica por ser bacilos Gram negativos rectos o curvados con un tamaño de 0.5 – 1.0 x 1.5 – 5.0 μm ; no presentan formación de esporas; son aerobias habiendo algunas capaces de usar el nitrato como aceptor final de electrones, crecen quimioorganotróficamente a pH neutro siendo bacterias mesofílicas y móviles por la presencia de uno o varios flagelos polares; este género está ampliamente distribuido en el medio ambiente por su capacidad de usar diferentes fuentes de carbono y tener bajos requerimientos nutricionales; algunas especies de estas se consideran patógenos importantes para plantas, animales y el hombre (Hendricks, 2000), su clasificación taxonómica es:

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Pseudomonadales
Familia	: Pseudomonadaceae
Género	: <i>Pseudomonas</i>
Especies	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (Lopardo, 2016).

Actualmente en el grupo fluorescente esta: *P. fluorescens*, *P. putida*, grupo filogenético gamma de las proteobacterias, ha sido de gran interés, origina un extenso rango de enzimas y metabolitos que pueden tener un efecto antagónico sobre numerosos fitopatógenos mediante la inducción de resistencia sistémica cuando impulsa compuestos de defensa situados en diferentes lugares donde ataca el patógeno (Saravanakumar *et al.*, 2007), como es la producción de ácido salicílico (Saikia *et al.*, 2003).

De igual forma estas bacterias originan el crecimiento vegetal mediante la producción de sideroforos, moléculas de bajo peso molecular que les permiten obtener micronutrientes limitantes para su desarrollo y crecimiento como es el hierro (Mercado & Bakker, 2007), producción de fitohormonas y solubilización del fosfato mineral principalmente por la elaboración de ácidos orgánicos, aunque otros mecanismos se han propuesto como la producción de sustancias quelantes como ácidos inorgánicos (ácido sulfhídrico, ácido nítrico y ácido carbónico) (Dey *et al.*, 2004); así mismo para la mineralización del fósforo orgánico se ha descrito la elaboración de fosfatasas ácidas y fosfatasas alcalinas donde hidrolizan los enlaces fosfoanhídrido o fosfoéster de los compuestos (Rodríguez & Fraga, 1999).

b. Género *Bacillus*

Género *Bacillus* sp. es un grupo de bacilos de gran importancia, Gram positivos rectos de tamaño de 0.5 – 2.5 x 1.2 – 10 µm; tienen esporas ovales o redondas, móviles por flagelos peritricos, aerobios o anaerobios facultativos, crecen quimioorganotróficamente encontrándose en ambientes con diferente pH, temperatura y salinidad presentan un metabolismo fermentativo; y son catalasa positiva; ubicuos en

un amplio rango de hábitat (Hendricks, 2000), gracias a la producción de una pared celular de múltiples capas, se establecen esporas resistentes a condiciones de estrés, secreción de antibióticos y enzimas, su clasificación taxonómica es:

Dominio	: Bacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Bacilli
Orden	: Bacillales
Familia	: Bacillaceae
Género	: <i>Bacillus</i>
Especies	: <i>Bacillus subtilis</i>

Bacillus lichiniiformis

Bacillus firmus

Bacillus alvei

Bacillus sphaericus

Bacillus megaterium (Lopardo, 2016).

Especies de *Bacillus* sp., poseen una actividad biocontroladora frente a la amplia clase de patógenos, por medio de tres mecanismos: antagonismo, promoción de crecimiento del vegetal (Rodríguez *et al.*, 1999) o la estimulación de las defensas de esta (Choudhary & Johri, 2009), siendo la obtención de toxinas y antibióticos de la familia de las surfactinas, iturinas y fengicinas las más significativas (Ahmad *et al.*, 2008).

La actividad proteolítica de las bacterias lácticas usadas como fermentos en la elaboración de queso no es tan elevada como la de otros grupos de microorganismos,

como los géneros *Bacillus*, *Proteus* y *Pseudomonas*, sin embargo, su sistema proteolítico es muy variado y está formado por proteinasas y peptidasas extracelulares (ligadas a la pared o a la membrana celular) e intracelulares, capaces de degradar completamente las caseínas a aminoácidos (Mou *et al.*, 1975), la actuación del sistema proteolítico comienza por la acción de las proteinasas extracelulares sobre las caseínas de la leche y sobre los productos derivados de la acción del cuajo y las proteinasas de la leche sobre las caseínas. A continuación, los productos originados por las proteinasas extracelulares son degradados por las peptidasas que liberan péptidos pequeños y aminoácidos, estos productos son transportados al interior de la célula donde se terminan de degradar por las peptidasas intracelulares y las enzimas responsables del catabolismo de los aminoácidos (Gómez, 1996).

c. Bacterias *Enterobacter*

Es un género de bacterias Gram negativas facultativamente anaeróbicas pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae. Muchas de estas bacterias son patógenas y causa de infección oportunista, otras son descomponedores que viven en la materia orgánica muerta o viven en el cuerpo humano como fracción de una población microbiana normal (Prescott, 2004), ciertas enterobacterias patógenas causan infección especialmente al tracto respiratorio y tracto urinario, su clasificación taxonómica es:

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae

Género : *Enterobacter*

Especies : *Enterobacter cloacae*

Enterobacter aerogenes

Enterobacter asburiea

Enterobacter cowanii (Lopardo, 2016).

Fermentan la glucosa, reducen nitratos y nitritos, citocromooxidasa negativos y catalasa positivos, son móviles (excepto *E. asburiae*) la mayoría descarboxilan la ornitina (excepto *E. cowanii*), degradan los azúcares en el medio TSI con producción de ácido en el fondo del tubo y en el pico, generalmente con abundante fabricación de gas, que desplaza la columna del medio de cultivo, no producen SH₂, en la Tabla 1 se observan las características bioquímicas que distinguen las especies del género *Enterobacter*, *Cronobacter* y *Pantoea*. A partir del comportamiento en las pruebas de arginina dihidrolasa (ADH), lisina descarboxilasa (LDC) y ornitina descarboxilasa (ODC), con un mínimo número de pruebas adicionales se pueden distinguir algunas especies de *Enterobacter*. *E. aerogenes* y *E. cloacae* se diferencia por la descarboxilación de la lisina, positiva y negativa respectivamente (Prescott, 2002).

E. gergoviae y *E. aerogenes*, tienen un patrón de descarboxilación similar: (LDC +, ODC +, ADH-), se pueden diferenciar con la hidrólisis de la urea y con el agregado de dos azúcares (adonitol y sorbitol). *E. gergoviae* no fermenta adonitol ni sorbitol y es ureasa fuertemente positiva, mientras que *E. aerogenes* fermenta los dos azúcares y es ureasa negativa. *E. asburiae* es bioquímicamente similar a *E. cloacae*, pero es la única especie inmóvil del género y da negativa la prueba de Voges Proskauer (Lopardo, 2016).

Tabla 1. Características bioquímicas que diferencian especies de los géneros

Enterobacter, *Cronobacter* y *Pantoea* (Lopardo, 2016).

ESPECIES	LDC	ADH	ODC	VP	SAC	ADO	SBL	RAM	ESC	MEL	PIG	MDG
HUMANAS												
<i>E. aerogenes</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>p. agglomerans</i>	-	-	-	V	V	-	V	V	V	V	V	-
<i>E. amnigenus</i> <i>biogroupo 1</i>	-	-	V	+	+	-	-	+	+	+	-	V
<i>E. asburiae</i>	-	V	+	-	+	-	+	-				
<i>E. cancerogenus</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>E. cloacae subsp</i> <i>cloacae</i>	-	+	+	+	+	V	+	+	V	+	-	V
<i>E. cowanii</i>	-	-	-	+	+	-	+	+				-
<i>E. gergoviae</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>E. hormaechei</i> <i>subsp hormaechei</i>	-	V	+	+	+	-	-	+	-	-	-	V
<i>E. kobei</i>	-	+	+	-	+	-		+	V	+	-	+
<i>C. sakazakii</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
AMBIENTALES												
<i>E. amnigenus</i> <i>biogroupo 2</i>	-	V	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>E. cloacae Subsp.</i> <i>disolvens</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>E. nimipresuralis</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>E. pyrinus</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>E. radicitans</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-

LDC: Lisina descarboxilasa, ODC:Ornitina descarboxilasa, ARG: Arginina dihidrolasa, VP: Voges Proskauer, SAC: Sacarosa, ADO: Adonitol, SBL; Sorbitol, RAM: L-ramnosa, ESC: esculina, MEL, Melibiosa, PIG: Pigmento amarillo, MDG:a-metil-D-glucosido,+:>90%, V de 11 a 89%, -: <10%

E. pyrinus se diferencia de *E. gergoviae* por su crecimiento en caldo cianuro de potasio, la producción de ácido a partir de mio-inositol y la no fermentación de rafinosa.

E. hormaechei es bioquímicamente similar a *E. cancerogenus* excepto que es ureasa positiva, sacarosa, positivo y esculina negativo. *E. ludwigii* y *E. hormaechei*, especies que previamente pertenecían al complejo *E. cloacae*, se pueden separar de éste mediante crecimiento en α metil – D – glucopiranosido y putrescina y 3-hidroxitubirato, respectivamente (Farmer *et al.*, 1989), las tres subespecies de *E.*

hormaechei (que corresponden a los grupos VI, VII y VIII del complejo *E. cloacae*) se pueden separar a través de la fermentación de adonitol, dulcitol y D-sorbitol (Koneman, 2001).

Aún no se han consensuado marcadores moleculares específicos para la identificación del género *Enterobacter*. Como ocurre con las demás enterobacterias las secuencias de los genes del ARNr 16S presentan similitudes mayores del 97 – 98% razón por la cual esta molécula tiene bajo poder de discriminación a nivel de especie (Ryan & Ray, 2011), es recomendable realizar un análisis de secuencia de genes adicionales que codifiquen proteínas, el análisis de secuencia multilocus (MLSA) basado en los genes *recN* (recombinación y reparación de proteínas), *rpoA* (subunidad α de la ARN polimerasa) y *thdF* (oxidación de tiofeno y furano) parece ser una alternativa útil para una correcta asignación de las especies (Brady *et al.*, 2010).

2.2.2 Biodegradación bacteriana de materia orgánica

a. Biodegradación de azúcares (almidón)

El almidón se localiza en casi todas las plantas, está compuesto por amilosa, constituida por 1000 a 5000 moléculas de amilopectina y glucosa, constituido por 6000 a 20000 unidades de glucosa (Allinge *et al.*, 1976), los microorganismos amilolíticos utilizan enzimas reductoras para producir azúcares simples, dentro de estos se identifican bacterias como *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, y *Streptomyces* sp (Sánchez *et al.*, 2005), en el engranaje del metabolismo celular, las bacterias liberan al medio parte de su batería enzimática para usar los sustratos disponibles (Sasson, 1984), la exoenzima amilasa es la que se liberan (Reddy *et al.*, 2004), éstas

desempeñan un papel fundamental en el uso del almidón como fuente energética (Gupta *et al.*, 2003).

Para que obtenga dextrinas y polímeros pequeños constituido por unidades de glucosa se hidroliza el almidón con la enzima amilasa (Gupta *et al.*, 2003), estas enzimas presentan aplicaciones en diferentes industrias alimentarias, textil, papelera, de fabricación de detergentes, entre otras (Aiyer 2005); sin embargo, estas enzimas son producidas por eucariotas y procariota; la fuente bacteriana es elegida por la industria por un crecimiento rápido y medios de cultivo poco exigentes, las bacterias del género *Bacillus* son productora de la amilasa, entre éstas se mencionan a *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* (Prakash & Jaiswal, 2010), hay reportes de unas bacterias amilolíticas halófilas como *Chromohalobacter* sp. (Prakash *et al.*, 2009), *Halobacillus* sp. (Amoozegar *et al.*, 2003), *Bacillus dipsosauri* (Deutch 2002). *Halomonas meridiana* (Coronado *et al.* 2000) y *Micrococcus* sp. (Khire 1994).

Con el aumento del desarrollo industrial nace la necesidad de buscar microorganismos nuevos que originan las amilasas eficientes con excelentes características catalíticas, al respecto, Babavalian *et al.* (2013), aislaron bacterias del lago hipersalino Aran-Bidgol en Irán con actividad hidrolítica. Ghozlan *et al.* (2006), consiguen bacterias halófilas moderadas de otros ambientes hipersalinos en Alejandría – Egipto con su biodiversidad y capacidad hidrolítica (Cojoc *et al.* 2009) y estudiaron a bacterias que ocasionan enzimas extracelulares aisladas de una mina de sal en Slanic Prahova – Rumania, (Sánchez *et al.* 2003), otras bacterias halófilas moderadas que causan enzimas hidrolíticas de distintos ambientes hipersalinos fueron aislados en

España, así también Prakash *et al.* (2009), obtuvieron la producción y purificación de amilasas bacterianas.

A nivel industrial el almidón para su degradación exige otras condiciones catalíticas desde muy suaves hasta extremas, por eso la búsqueda de bacterias productoras de amilasas de ambientes hipersalinos que permita conseguir fuentes alternativas de enzimas con nuevas características, en tal sentido, este estudio describe sus características genotípicas y fenotípicas a las bacterias amilolíticas aisladas de Salinas de San Blas que está ubicada en los Andes peruanos (Canales *et al.*, 2014).

b. Biodegradación de grasas

Se emplea para hidrolizar lípidos causando glicerol y ácidos grasos, las reacciones más importantes en las cuales las lipasas con reacciones quirales están comprometidas debido a la posibilidad de resolver mezclas racémicas (Sánchez, 1999), el mecanismo de acción de las lipasas consiste en la hidrólisis de un ácido graso en presencia de alcohol obteniendo un éster y liberando agua, así mismo el mecanismo catalítico de las lipasas se basa en un sistema de intercambio de cargas que consta de 4 etapas, tras la unión del sustrato, se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica en el enlace éster del lípido, lo que lleva a la rotura del enlace y a la formación de un intermediario entre el ácido graso y la serina nucleofílica, posteriormente se libera el alcohol y se produce un segundo ataque nucleofílico por la molécula de agua que ataca el enlace éster del mediador transitorio, lo que produce la liberación del ácido graso y la regeneración del centro catalítico (Bornscheuer, 2002).

Las enzimas lipasas son de rápida producción, poseen actualmente nuevas aplicaciones en la industria de hidrocarburos en síntesis orgánica y han expandido su penetración en la producción farmacéutica ya que son más fáciles de producir las lipasas bacterianas y fúngicas modificado por tecnología de DNA recombinante (Snellman & Cowell, 2004), ambientalmente la lipasa es utilizada en inoculantes como depurador de tratamientos cloacales y como tratamiento en residuos sólidos para hidrolizar grasa y líquidos como una alternativa de renovación de productos de origen químico (Sánchez, 1999).

Una de las grandes aplicaciones que se obtienen del uso de estos microorganismos es la hidrólisis enzimática como es el caso el uso de las lipasas inmovilizadas como catalizador biológico de materia orgánica y grasas presentes en los efluentes que por medio de métodos convencionales químicos y físicos son de elevado costo de realizar (Prats, 2012), así es como aparece la biotecnología ambiental, como una alternativa limpia y con bajo precio en comparación a los tratamientos convencionales que se saturaban rápidamente, se consumían recursos internos y no cumplían con los objetivos deseados (Rodríguez *et al.*, 2006).

Los hábitats naturales de estos microorganismos son los suelos de cultivo de palma aceitera o en la misma planta específicamente en el fruto de donde se extrae el aceite; del fruto de palma se han logrado aislar la mayor diversidad de microorganismos lipolíticos como bacteria Gram negativo y Gram positivo pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, respectivamente, como productora de lipasa extracelular, como también se han encontrado hongos lipolíticos (Flores *et al.*, 2010) recientemente se ha logrado aislar un microorganismo del fruto de

palma identificado como *Mucor* sp para producir lipasas conde fue cultivado en un medio compuesto de sales y aceite de girasol como fuente de carbono (Hiol & Deyris 2002).

Las lipasas son un grupo de enzimas que tiene la capacidad de hidrolizar triglicéridos y otras variedades de lípidos existentes en el aceite de la palma aceitera, además son capaces de catalizar otras reacciones de transesterificación, aminólisis, esterificación, transferencia de acilos (García & Quintero 2000), en la actualidad los mercados de las lipasas son de origen animal; aunque ya existen lipasas provenientes de fuentes microbianas, que se han logrado aislar de especies como *Mucor mihei*, *Aspergillus niger*, *Geotricum candidum*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas* sp, *Rhizopus oryzae* y *R. niveus* (Morales & Muñoz 2005).

Las lipasas bacterianas, ya comprobada su versatilidad en medios orgánicos, en los últimos años se ha ido incrementando el número de aplicaciones, pero en el campo industrial más significativa en la actualidad lo constituye el campo de los detergentes, también se han empleado desde los años noventa, en la composición de otros productos, como disolventes de limpieza, en la industria de productos lácteos y como tensoactivos en muchas formulaciones de alimentos (salsas, helados, mayonesa) (Fabián, 2015), se ha llegado a purificar y caracterizar algunas lipasas bacterianas como las de *Pseudomonas alcaligenes* M-1 que secreta lipasas alcalinas las cuales tienen excelentes características para la remoción de manchas de grasas, la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* LP 602 fue aislada de aguas domésticas (Peña, 2006).

c. Biodegradación de proteínas

Las enzimas proteasas son las que catalizan la degradación de proteínas al hidrolizar los enlaces peptídicos, de acuerdo al criterio adoptado por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, donde las enzimas se clasifican en grupos dependiendo de la reacción catalizadora, las proteasas pertenecen al Grupo 3 (hidrolasas), subgrupo 4, estas enzimas se encuentran presente en todos los organismos vivos cumpliendo diversas funciones a nivel celular (Madigan *et al.*, 2006), sus funciones comprenden desde los procesos generales de digestión de las proteínas de la dieta hasta procesos específicos y muy regulados, como la activación de zimógenos y modulación de la liberación de hormonas y otros productos bioactivos, como consecuencia de sus diversas funciones y niveles en los que actúan (Xu *et al.*, 2014).

Los microorganismos también producen una gran variedad de enzimas proteolíticas, muchas de ellas con fines nutricionales, la degradación proteica comienza a nivel extracelular produciendo aminoácidos y péptidos de hasta 35 aminoácidos, lo que pueden utilizarse como nutrientes, a su vez, muchos microorganismos infecciosos, como los patógenos oportunistas, producen y secretan proteasas como factores de virulencia que les facilitan la colonización de diferentes nichos (Madigan *et al.*, 2000), un ejemplo muy conocido es *Pseudomonas aeruginosa*, esta bacteria produce y secreta varios factores de virulencia, entre ellos una proteasa alcalina (degrada varias proteínas asociadas a la inmunidad innata en vertebrados) y la elastasa (degradar las fibras elásticas de las paredes vasculares) (Veesenmeyer *et al.*, 2009).

Además de su papel esencial para el desarrollo de diversos procesos metabólicos y regulatorios, las enzimas proteolíticas son muy utilizadas a nivel industrial, en este sentido, las proteasas microbianas (debido a su mayor estabilidad, facilidad de manejo y menor costo de producción) suelen preferirse frente a las enzimas de origen animal o vegetal, en el año 2013 el mercado de enzimas industriales valía cerca de US\$ 4.8 billones y la expectativa es que alcance los US\$ 7.1 billones para el año 2018 según el reporte de la BBC Research “Global Markets for Enzymes in Industrial Applications” (Madigan *et al.*, 2006), dentro del mercado global de enzimas, las proteasas son el grupo más representado y encuentran aplicaciones en la industria de detergentes, alimenticia, farmacéutica, textil, entre otras, se calcula que el mercado mundial de proteasas representa el 60% del total de enzimas comercializadas (Fullana, 2014).

Serín – proteasas. Estas proteasas se caracterizan por presentar un residuo de serina (Ser) en su sitio activo, responsable del ataque nucleofílico sobre el carbonilo del enlace peptídico blanco, la subtilisina Carlsberg producida originalmente por *Bacillus licheniformis* es la peptidasa modelo de uno de ellos (clan SB), esta proteasa posee una amplia especificidad de sustrato, una temperatura óptima de 60 °C y se utiliza en formulaciones detergentes (Prescott, 2002).

Los microorganismos, debido a su gran diversidad fisiológica y bioquímica, y su susceptibilidad a ser genéticamente manipulados, constituyen la principal fuente de enzimas proteolíticas, estas enzimas tienen aplicaciones en diversos campos industriales, siendo la industria de detergentes y alimenticia sus principales mercados, a su vez, considerando las tendencias actuales de implementar tecnologías

ambientalmente amigables (Madigan *et al.*, 2006), la utilización de enzimas proteolíticas se ha extendido a otras industrias, algunos procesos químicos que usualmente se realizaban en condiciones de temperatura y pH extremos, o altas presiones, pueden realizarse por reacciones enzimáticas en condiciones más moderadas (Rao *et al.*, 1998), las enzimas presentan la ventaja de catalizar reacciones altamente específicas y tener elevada eficiencia catalítica, llevando a cabo incluso reacciones estero selectivas, la utilización de enzimas permite además disminuir el consumo energético y de agua en algunas industrias, así como generar menor cantidad de desechos y subproductos, sumado a esto, actualmente es posible, mediante técnicas de mutación dirigida, mejorar la estabilidad y especificidad de los biocatalizadores para adecuarlos a los procesos productivos (Gupta *et al.*, 2002).

La mayoría de las proteasas incluidas en los productos detergentes son del grupo de las subtilisinas (serin – proteasas alcalinas secretadas por las bacterias del género *Bacillus*), debido a que son activas en las condiciones fuertemente alcalinas de los mismos, laas proteasas utilizadas en este tipo de producto deben ser estables frente a las sustancias blanqueadoras y agentes oxidantes, así como compatibles con la fuerza iónica de la solución detergente (Gupta *et al.*, 1999), actualmente, existe un interés creciente por la identificación de proteasas alcalinas activas en un rango amplio de temperatura, las proteasas con elevada eficiencia catalítica a temperaturas bajas y moderadas permiten el lavado con agua corriente, sin el calentado de la misma, lo que implica un ahorro en el consumo energético y un menor impacto ambiental (Binod *et al.*, 2013).

2.2.3 Totora (*Schoenoplectus tatora*)

La totora es un vegetal acuático superior que constituye los totorales en el lago Titicaca son importantes porque produce diversos beneficios al establecer el hábitat de protección y reproducción de peces y aves que sirven de alimento a la población ribereña, y su asociación con otras plantas acuáticas sumergidas establecen un medio fundamental en la ecología del lago Titicaca y humedales de la cuenca andina, así como para su economía de las personas. Igualmente, los totorales (PELT – ADESU, 2001), la extracción de totora por parte de los habitantes a aumentado notablemente para utilizarla como alimento para el ganado, abono en la agricultura, elaboración de balsas, artesanías, vivienda, salud y alimentación; sin que se elaboren programas de conservación o reimplante del vegetal (PELT – ADESU, 2001), la clasificación taxonómica de la totora es la siguiente:

Dominio	: Eucarya
Reino	: Vegetal
División	: Fanerógamas
Subdivisión	: Angiospermas
Clase	: Monocotiledóneas
Superorden	: Glumiflorales
Orden	: Cyperales
Familia	: Cyperaceas
Género	: <i>Schoenoplectus</i>
Especie	: <i>Schoenoplectus tatora</i> (Collot, 1980)
Nombre común	: totora.

Los rizomas toman diferentes nombres vernaculares según el grado de madurez como siphi, sacca (Goyzueta *et al.*, 2009), entre otros, considerando sus características, se ha manifestado la presencia de diferentes tipos de rizomas o tallos subterráneos, según su edad y forma son:

Tallo. Según a su situación, se divide en dos partes

- **Tallo aéreo.** Es la parte del tallo que sobresale del agua, esta de un color verde intenso pero la clorofila que presenta en su interior tiene tejido parenquimatoso no clorofílico (tejidos simples no diferenciados), la forma de su sección va de triangular a circular que depende de la edad de la planta, situación climática, nutrientes del sustrato del fondo, el tallo aéreo está constituido por un tejido parenquimático llamado “aerenquima” que tiene aire, el cual beneficia la circulación del aire en el tejido esponjoso, así como le permite flotar en el agua, este tejido parenquimático, desarrolla funciones de reparación, almacenamiento y en ciertos casos realiza la fotosíntesis (PELT – ADESU, 2001).
- **Tallo sumergido.** Es la parte que comienza en el rizoma maduro, el tallo que está sumergido tiene clorofila, pero en la parte basal tiene una parte de color blanquecina (por falta de clorofila) denominada “chullo” que almacena disacáridos debido principalmente porque allí no inciden los rayos solares, logrando almacenar disacáridos que dan un sabor dulce y agradable y se utiliza como alimento humano, y alcanza hasta el pelo de agua (nivel), los tallos pueden crecer de 30 cm a 100 cm o más, de altura cada 4 meses,

aproximadamente, lo que está en función del sustrato, hábitat y medio ambiente. Llegan a alcanzar alturas de 2 a 6 m (PELT – ADESU, 2001).

Raíz. Las raíces de la totora por su origen son adventicias y se producen desde el rizoma maduro y conformada, especialmente por raíces secundarias, que forman penachos delgados. Proporcionan anclaje al vegetal en el sustrato de fondo, su desarrollo es horizontal, y crece de manera paralela a la superficie del suelo (fondo), su diámetro varía en torno a 1 mm. de grosor según a la edad de la planta y al medio del suelo que la sustenta (PELT – ADESU, 2001).

Rizoma. En la totora viene a ser un tallo modificado que se desarrolla después de la raíz y también de manera paralela al suelo, la estructura interna está formado por un cilindro central con diversos haces libero-leñosos, la corteza es de color blanco, con nudos a cada 2 a 6 cm, de donde brotan las yemas que consecutivamente se convierten en tallos, los rizomas tienen muchas sustancias de reserva y permiten a las plantas de totora mantenerse durante la sequía (estado de latencia), cuando regresan los períodos de humedad, rebrotan inmediatamente las yemas, las yemas y rizomas están protegidas por hojas modificadas de un color marrón claro amarillo, a manera de escamas (catáfilas) (PELT – ADESU, 2001).

- **Rizoma maduro.** Es de color café marrón brillante llamado comúnmente “saphi” o “sippi”, se caracteriza por tener un cilindro central y una capa lignificada, en donde se encuentra bastantes haces libero leñosos, dispuestos en círculos concéntricos con una corteza de pigmentación blanquecina, y cuando envejece toma un color marrón oscuro depositando grandes sustancias de reserva.

- **Rizoma joven o tierno.** De color blanco, llamado “sacka” o “sacca”, presenta los tejidos vegetales de un rizoma adulto, sin coloración y no acumula sustancias de reserva, este tipo de rizoma lo utilizan como alimento humano que contiene altos niveles de yodo.
- **Rizoma del ápice.** Es la parte terminal, apical del tallo subterráneo que carece de raíces adventicias, siendo su tejido meristemático, con una pigmentación mayormente blanquecina y que está en constante crecimiento, formando la base de la expansión de la totora (PELT – ADESU, 2001).

Inflorescencia. De la totora es de tipo Umbela, llamada también “Pancara” o “Panq’ara”, caracterizada porque sus primeras ramificaciones dan lugar a su vez a otras umbelas pequeñas y la umbelilla situada en sus ejes terminales, tiene un número variable de flores, en el que cada eje terminal está cubierto de una bráctea escamosa de un color café oscuro de 3 a 5 mm de longitud; la flor se encuentra rodeada por pequeñas hojas transformadas que rodean a los verticilos fértiles de las flores, que carecen de sépalos y pétalos, sus verticilos exteriores están representada por 4 escamas que hacen las veces de un perigono haploide en algunas dicotiledóneas (PELT – ADESU, 2001) y que estas serían como las glumas de las gramíneas, son parecidas su disposición al género *Triticum*, el perigonio es tetrámero actinomorfo; el androceo está dispuesto en dos verticilos, las escamas son similares a las glumillas de las gramíneas y finalmente se observa el último verticilo floral, una vez madura la inflorescencia, forma la semilla y por el viento cae al agua, luego da lugar a una nueva planta, siempre y cuando tenga condiciones naturales y antrópicas favorables.

El papel de la helófitas (plantas adaptadas a condiciones de saturación de humedad e inundación, siempre que el agua no las cubra completamente, es decir, soportan una fuerte limitación en la disponibilidad de oxígeno en el suelo, comprenden una parte debajo del nivel del agua y otra parte aérea) en humedales artificiales, la totora posee la utilidad de ser filtro de partículas, asimilación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y metales, asimismo, de soporte para el desarrollo de biopelículas de microorganismos que actúan purificando el agua mediante procesos aerobios de degradación, gracias al transportar grandes cantidad de oxígeno desde los tallos hasta las raíces y rizomas, donde es usado por dichos microorganismos, además del oxígeno en la zona radicular, las bacterias son favorecidas por exudados de las plantas en la misma zona (Delgadillo *et al.*, 2010).

Bacterias en las raíces de las macrófitas

Las bacterias y hongos presentes en el agua viven temporal o permanentemente en la superficie o en el interior de las especies vegetales, así las utilizan a las plantas simplemente como substratos o se alimentan de sus productos metabólicos o principios nutritivos parcial o totalmente como comensales (Grant & Long, 1989), en especial sobre sus raíces formando agrupaciones más o menos densa, sin embargo, otras no se produce ninguna colonización, debido a la presencia de sustancias inhibitorias, los microorganismos presentes en las partes superficiales se alimentan principalmente de excreciones de las plantas (Rheinheimer, 1987) llamado también fitoestimulación, entonces son muchos los lugares donde pueden habitar los microorganismos dentro del ambiente acuático, desempeñando diferentes funciones según sea este lugar, de ahí la importancia de conocer cada uno de ellos además de

todos los factores y propiedades tanto físicas como químicas que influyen en el crecimiento microbiano dentro de estos ambientes (Rojas 2005).

Pero el papel decisivo lo tienen los hongos y las bacterias, porque tienen poder para degradar tanto los compuestos orgánicos presentes en forma sólida como los disueltos (Rheinheimer, 1987), debido a la enorme importancia del papel de los microorganismos (Álvarez, 2005), además, en los últimos años las rutas de degradación aerobia y anaerobia de la materia orgánica son hoy día conocidas en gran detalle (Smith & Smith, 2001), a medida que progresa la autodepuración de las aguas, se modifica también la población microbiana, al haber menor cantidad de materia orgánica hay menor proporción de bacterias y con esta, igualmente el déficit de oxígeno a consecuencia de la reducción paulatina de consumo, el poder de autodepuración de las aguas es muy variable (Rheinheimer, 1987).

Durante la etapa de crecimiento, las macrófitas absorben e incorporan los nutrientes en su propia estructura (Henry *et al.*, 2008) y funcionan como sustrato para los microorganismos (Brix & Schierup, 1989) que promueven la asimilación de estos nutrientes a través de transformaciones químicas, incluyendo nitrificación y desnitrificación (Peterson & Teal, 1996), la principal ventaja que ofrecen estos sistemas es la gran superficie de contacto que tienen sus raíces con el agua residual, ya que ésta les baña por completo, lo que permite una gran actividad depuradora de la materia orgánica por medio de los microorganismos adheridos a dicha superficie o por las propias raíces directamente (Condori & Delgadillo, 2010). No obstante, la acumulación de bacterias en las raíces de las macrófitas, puede convertir la biomasa en

una fuente de contaminación, en cuyo caso se requiere un manejo cuidadoso de la cosecha (Sandoval *et al.*, 2005).

Las pseudomonas son un grupo importante de bacterias promotoras del crecimiento vegetal que pueden promover el crecimiento de plantas y protegerlas de patógenos, ya que poseen genes relacionados con procesos de adquisición de nutrientes, como la absorción de aminoácidos o degradación de la xilosa, un azúcar simple presente en exudados, otro genes están relacionados con la respuesta al estrés, uno de ellos en la protección contra daño oxidativo (radicales de su peróxido e hidroxilo producidos por otras bacterias de la rizosfera), y otro con resistencia al cobre, otro gen cuya expresión se elevó está involucrado en la secreción de proteínas y su exportación a las células vegetales, la prolina, aminoácido muy abundante en exudados del maíz, activa la expresión de los genes *put* en la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Pseudomonas putida*, siendo útil para colonizar las raíces (Holguín, 2008).

Particularmente las plantas macrófitas son un tipo de vegetación acuática que sirven para depurar el agua mediante bacterias microbianas que se ubican en sus raíces, sedimentan los contaminantes y materia orgánica depurándola de forma totalmente ecológica y natural, además de utilizarse como sistemas para depurar el agua tienen otras posibilidades de aprovechamiento como alimento del ganado, de peces y otros animales acuáticos o bien como fertilizante para suelos y cultivos (Dallas, 2005), los microorganismos son la parte fundamental del mecanismo con que la plantas macrófitas contribuyen a la remoción de los contaminantes (Llagas & Guadalupe, 2006); sin embargo, se recomienda estudiar la biodiversidad de

microorganismos, la distribución hidráulica, las asociaciones de microorganismos con los especímenes de prueba, entre otros y así lograr una mejor comprensión los procesos fisicoquímicos y biológicos que se llevan a cabo.

En la capacidad de absorción de la totora, Buchholz (2007), manifiesta la capacidad de ciertas plantas de extraer del suelo preferentemente cobre y/o zinc, pudiéndose aplicar en la bioremediación de biosólidos compostados, donde la fitoextracción se puso a prueba con cuatro especies de plantas vasculares: *Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Zea maíz* y *Typha latifolia*, ésta última especie pertenece a la misma familia de la *S. tatora*, dichas especies en contenedores de un litro de solución remueven metales, fósforo, nitrógeno, entre otros.

La fitorremediación, que se fundamenta en que los compuestos presentes en el agua son adsorbidos e incorporados dentro de la estructura de las plantas (absorción), logrando eliminar la contaminación del agua y favoreciendo la restauración de la calidad de la misma (Olguín, 1996). La acumulación de metales en las plantas se inicia cuando se introducen en el simplasto de la raíz, una vez que han atravesado la membrana plasmática de las células endodermales de la raíz o pueden entrar en el apoplasto de la raíz a través de los espacios entre las células. La raíz constituye el tejido de entrada principal de metales pesados en la planta. Hasta allí los metales pesados pueden llegar, fundamentalmente, por un proceso de difusión en el medio, mediante un flujo masivo y por intercambio catiónico. La raíz posee cargas negativas en sus células, debido en gran medida a la presencia de grupos carboxilo del ácido péctico. Las cargas negativas de estas células de la rizodermis interaccionan con las positivas de los metales pesados presentes en el agua, creando un equilibrio dinámico

que facilita la entrada hacia el interior celular. De esta forma, los cationes entran por la pared celular, que además es hidrofílica, lo que facilita el transporte iónico. (Marmioli *et al.*, 2005).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

Las bacterias fueron aisladas de la rizósfera de las plantas hidrófitas de la totora (*Schoenoplectus tatora*), las cuales fueron recolectadas en dos zonas del lago Titicaca, el centro poblado de Uros Chulluni en las coordenadas UTM -15.817160, -69.988511 que está ubicada en la zona norte de la ciudad de Puno, donde gran parte de la población no poseen servicio de desagüe ni alcantarillado y la Reserva Nacional del Titicaca en las coordenadas UTM -15.753101, -69.946897, es un área protegida y se caracteriza por poseer totorales, así como presencia de llachos, siendo aguas ligeramente profundas entre 1 y 1.5 m, ambas zonas se ubican en la provincia y región Puno. Los recuentos bacterianos y experimentos de capacidad degradativa, se realizaron en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

3.2 Tipo de estudio

Descriptivo y analítico de corte transversal, los resultados describirán las variables propuestas

3.3 Muestra

El número de plantas de totora fue determinada mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia, en cual constó de 30 plantas de totora, de tamaños de 100 a 150 cm de profundidad del lago, las plantas fueron colectadas de las zonas de muestre de Uros Chulluni y la Reserva Nacional del Titicaca (Figura 13), divididas en dos meses (setiembre y octubre 2017), las cuales fueron transportadas al laboratorio,

en ellas se tomaron las raíces adventicias y rizomas subterráneas de la totora, a partir del cual se realizaron los aislamientos, las identificaciones y la evaluación de su capacidad degradativa de las bacterias.

3.4 Identificación de las especies bacterianas

3.4.1 Aislamiento de bacterias rizosféricas

Fundamento. Este método de dilución o vaciado en placa proporciona por lo general placas con un número apropiado de colonias y se basa en una dilución aproximadamente cuantitativa de la muestra original en un medio sólido (Bailón *et al.*, 2003).

Para el aislamiento y recuento bacteriano, se realizó el protocolo propuesto por Muratova *et al.* (2003), removiendo el suelo rizosférico de las raíces adventicias y rizomas subterráneas de la totora, éstas fueron lavadas en 100 ml de agua destilada, la suspensión agua-suelo se sometió a un proceso de extracción por agitación manual durante 30 min (Figura 14), después de lo cual se dejó sedimentar, a partir del cual se prepararon diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} , donde los recuentos se realizaron en las tres últimas diluciones con la dilución central de 10^{-7} , las cuales tuvieron recuentos entre 30 y 300 colonias, un ml de cada dilución fue transferida a placas de agar Pseudomonas, agar EMB y Muller Hinton (Figura 15), que fue extendida con la espátula de Digralesky previamente flameada con alcohol.

Los recuentos en UFC/ml de cada una de las bacterias, se realizó obteniendo promedios de los recuentos de colonias en las placas de agar antes mencionados, que oscilaban entre 30 y 300 colonias, a continuación, se multiplicaron por la dilución 10^7 .

3.4.2 Identificación de bacterias rizosféricas

Fundamento. La identificación fenotípica bacteriana se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo. La fiabilidad de la identificación está en proporción directa al número de características similares (Cercenado, 2010). Los cultivos puros están formados por un solo tipo de microorganismo; y son indispensables para conocer las características morfológicas, propiedades de tinción, actividad bioquímica, patogenicidad, sensibilidad a antibióticos e identificación de las especies microbianas (Aquiahuatl & Pérez, 2004).

La incubación de las placas Petri fueron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, cada dilución tenía 2 placas Petri constituyéndose las réplicas, el conteo bacteriano se realizó mediante unidades formadoras de colonia (UFC/ml) (Figura 16), las bacterias aisladas fueron caracterizados e identificadas teniendo en cuenta su morfología, la tinción de Gram, la tinción de esporas mediante técnica de Wirtz (verde malaquita) (Prescott, 2002), mediante la observación al microscopio óptico compuesto (100X), las especies bacterianas se identificaron mediante las pruebas bioquímicas de TSI, LIA, Citrato de Simmons e Indol, para identificar especies del de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* (Figuras 17 y 18).

Para la tinción de las esporas de las bacterias esporuladas *Bacillus subtilis* por el método Wirtz – Conklin, las endosporas coloreada con verde malaquita, para ello se tomó un pequeño inóculo del cultivo puro con la ayuda de un asa de siembra para extenderlo en una lámina portaobjeto y se fijó con la flama de un mechero, luego se añadió el colorante verde malaquita que cubra bien la extensión, se pasó la preparación por encima de la llama del mechero para fijar el colorante, durante cinco minutos, se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, a continuación se coloreó con safranina, para el contraste, durante un minuto y se lavó con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante, las preparaciones se observaron al microscopio óptico con el objetivo de 100X, añadiendo una gota de aceite de inmersión (Figura 19).

Para la realización de las pruebas bioquímicas, se eligieron colonias y se sembró por estría y punto en los medios TSI, LIA, Citrato de Simmons, indol, gelatina y Endo (Figura 20). En el agar triple hierro azúcar (TSI) con el asa de siembra en punta se cargó una colonia y se realizó una puntura en el fondo del medio y estrías sobre la superficie inclinada del agar, se incubo durante 24 horas a 48 horas a 37 °C, para el medio de descarboxilacion de lisina (LIA), se inoculó inmediatamente realizando 2 punturas al fondo y estrías en la superficie del medio inclinado y se incubó durante 24 horas a 37 °C, en el medio de indol, se inoculó la colonia en el medio para indol y se incubó durante 24 horas a 37 °C luego del cual se añadió un ml del reactivo de Kovac (Prats, 2012). Los resultados de las pruebas bioquímicas para determinar especies fueron las recomendadas por Nicola (2010) y Márquez (2007), según sea para bacterias *Pseudomonas* (Tabla 2) *Bacillus* (Tabla 3) y *Enterobacter* (Tabla 4), que se presentan a continuación.

Tabla 2. Clave bioquímica para la taxonomía bacteriana del género *Pseudomonas* (Nicola, 2010).

(Movilidad +) Pseudomonas	Hidrolisis de										
	Oxidasa	Glucosa (xidacion)	Fluorescencia	Pigmento verde	Nitrato	Arginina	Crecimiento a 42°C	Gelatina	Acetamida	Almidón	Esculina
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+/-	+ ⁻	+	+	+	+/-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i>	+	+	+	-	-/+	+	-	+	- ⁺	-	-
<i>P. putida</i>	+	+	+ ⁻	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i>	+	+	-	-	+	-	+/-	-	-	+	-
<i>P. mendocina</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. alcaligenes</i>	+	-	-	-	+/-	+/-	- ⁺	-	-	-	-
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	+	- ⁺	-	-	+	+/-	+ ⁻	-	-	-	-
<i>P. luteola</i>	-	+	-	-	+/-	+	+ ⁻	+/-	-	-	+
<i>P. oryzihabitans</i>	-	+	-	-	-	- ⁺	-/+	-/+	-	-	-

Tabla 3. Clave bioquímica para la taxonomía bacteriana del género *Bacillus* (Márquez, 2007).

Cepa bacteriana	Catalasa	VF	Nitrato	Citrato	Gas Pack	Almidon	Glucosa	Manitol	Xilosa	Arabinosa	Endoespora
<i>B. subtilis</i> var <i>niger</i>	+	V	-	-	+	V	+	V	V	V	1
<i>B. cereus</i>	+	V	+	-	+	V	+	-	-	-	1
<i>B. laterosporus</i>	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	6
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	1
<i>B. licheniformis</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	1
<i>B. pumilus</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	V	-	1
<i>B. firmus</i>	+	V	+	-	-	+	+	+	+	-	1 o 3
<i>B. alvei</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	3 o 4
<i>B. stearothermophilus</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	3
<i>B. coagulans</i>	+	+	V	-	+	-	+	+	-	-	4
<i>B. sphaericus</i>	+	V	-	-	-	+	-	-	-	-	5
<i>B. megaterium</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	1
<i>B. circulans</i>	+	+	V	-	+	V	+	-	-	-	3
<i>B. brevis</i>	+	-	V	+	-	-	V	V	-	-	4
<i>B. cereus</i> var. <i>Micoide</i>	+	V	+	-	+	+	+	-	-	-	1

+ Prueba positiva; - Prueba negativa; V: variable; 1: espora central; 3: espora terminal, célula madre hinchada; 4: espora central. Célula madre hinchada; 5: espora terminal redonda, célula madre hinchada; 6: espora lateral, celula madre hinchada fusiforme.

Tabla 4. Clave bioquímica para la taxonomía bacteriana del género *Enterobacter* (Nicola, 2010).

Microorganismos	Glucosa		Lactosa**	Sacarosa*	Arabinosa**	Rafinosa**	Rhamnosa**	Xilosa**	Manitol**	Dulcitol**	Salicina**	Adonitol**	Inositol**	Sorbitol**	Catalasa	Gelatina	Oxidasa	Urea	Arginina	Lisina	Omitina	Phenitanina	Indol	Rojo metilo	Vprkauer	Malonato	Citrato	Nitrato	H2O	KCN
	G	AC																												
<i>E. aerogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	.	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	
<i>E. cloacae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	

Donde: G = gas; Ac = ácido; Signo - = negativo; * = Kliger; ** = oxidación/fermentación.

3.4.3 Análisis estadístico de datos

El diseño experimental que se realizó fue completo al azar, los tratamientos evaluados fueron los recuentos de bacterias según el medio de cultivo utilizado para su identificación por zonas de estudio, cada tratamiento presentó tres repeticiones. La variable respuesta fue el recuento bacteriano, que fue comparada entre los tratamientos mediante un análisis de varianza (ANOVA), pruebas de Tukey y su gráfico de medias, con un nivel de confianza del 95%, el análisis estadístico se realizó en el software estadístico Infostat (versión estudiantil). El modelo matemático a utilizar fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

i = 1, 2, ..., t (tratamientos) y j = 1, 2, ... r (repeticiones)

Donde: Y_{ij} = observación en la j – ésima unidad experimental, sujeto al i – ésimo tratamiento. t = efecto del i – ésimo tratamiento. μ = efecto de la media general. ϵ_{ij} =

efecto verdadero de la j – ésima unidad experimental (réplica), sujeta al i – ésimo tratamiento (error experimental).

3.5 Evaluación de la capacidad degradativa *in vitro* de las bacterias

3.5.1 Preparación del inóculo

Las preparaciones de los inóculos se obtuvieron a partir de cultivos puros de las bacterias previamente aisladas e identificadas. En un matraz de 100 ml, se transfirió 50 ml de suero fisiológico esterilizado, con un aza de siembra previamente esterilizado a la llama del mechero, se colectó 2 colonias de cada bacteria y se inoculó al matraz conteniendo el suero fisiológico, a continuación, se agitó para lograr la difusión homogénea de las células bacterianas.

A continuación de dicha dilución, se transfirió 8 ml de dilución a un tubo de ensayo tamaño estándar esterilizado, y se comparó con el tubo estándar McFarland 0.5, llegándose a obtener la misma turbiedad de la dilución, con ello se obtuvo una concentración bacteriana de 1.5×10^8 células/ml. Todo ello se repitió para cada bacteria identificada, posteriormente fueron transferidas a medios de cultivo como el agar almidón, agar Tributirina y agar caseína, luego se midieron los halos de actividad degradativa revelando con lugol en el caso del agar almidón.

Fundamento de la degradación bacteriana

Los medios de cultivo son medios complejos que contienen sustancias químicas experimentales a degradar, tales como azúcares, lípidos, proteínas, vitaminas, entre otros, los que pueden ser degradados por un determinado microorganismo, debido a su capacidad productora de enzimas, los cuales se

manifiestan ante un revelador o la formación de halos de degradación (González, 2010).

3.5.2 Evaluación de bacterias del grupo fisiológico amilolítico

Se prepararon los medios de agar Almidón, las cepas se sembraron por estrías y por duplicado (Atlas & Parks, 1993), asimismo, se transfirió un ml de la solución salina con una concentración bacteriana de 1.5×10^8 células/ml para evaluar el crecimiento de colonias y se determinó así en UFC/ml, por otro lado, se dispuso de 0.1 ml de dilución para evaluar la actividad amilolítica mediante la medición de halos de degradación. El carbohidrato a experimentar fue el almidón, que es un compuesto encontrado con frecuencia en los efluentes. La composición del agar almidón (por litro) fue: extracto de carne 3 g, almidón soluble 10 g, agar 15 g, pH 7.5 ± 0.2 . Las bacterias fueron cultivadas a 37 °C por 24 horas de crecimiento. La lectura se realizó mediante la formación de halos de degradación del almidón, previamente se añadió lugol (revelador) sobre el crecimiento bacteriano.

3.5.3 Evaluación de bacterias del grupo fisiológico lipolítico

Se prepararon los medios de agar Tributirina, las cepas se sembraron por estrías y por duplicado (Atlas & Parks, 1993), asimismo, se transfirió un ml de la solución salina con una concentración bacteriana de 1.5×10^8 células/ml para evaluar el crecimiento de colonias y se determinó así en UFC/ml, por otro lado, se dispuso de 0.1 ml de dilución para evaluar la actividad proteolítica mediante la medición de halos de degradación lipolítica.

Se evaluó utilizando el medio Agar Tributirina (Otárola *et al.*, 2000), compuestos por: peptona 5 g, extracto de levadura 3 g, tributirina 10 g, agua destilada 1000 ml, agar 15 g, agar 15 g, pH final 7.3 ± 0.2 . En las placas Petri se inocularon sembrando con una estría y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 días. Si el microorganismo fue capaz de hidrolizar las grasas (Tributirina) aparecieron rodeadas de una zona clara sobre el medio opaco (Pascual y Calderón, 2000).

3.5.4 Evaluación de bacterias del grupo fisiológico proteolítico

Se prepararon los medios de agar caseína, las cepas se sembraron por estrías y por duplicado (Atlas & Parks, 1993), asimismo, se transfirió un ml de la solución salina con una concentración bacteriana de 1.5×10^8 células/ml para evaluar el crecimiento de colonias y se determinó así en UFC/ml, por otro lado, se dispuso de 0.1 ml de dilución para evaluar la actividad proteolítica mediante la medición de halos de degradación.

Se evaluó la capacidad de degradación de proteínas, utilizando dos proteínas la caseína (Vidal *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2007) para evaluar la actividad proteolítica. La hidrólisis de la caseína se determinó sembrando en un medio con caseína en dos fracciones: 1) TSA (20 g en 250 ml de agua destilada) y 2) Leche descremada (10 g en 250 ml de agua destilada). Cada fracción se esterilizó por separado. La solución de caseína se esterilizó a $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, luego se dejó enfriar hasta $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, se mezclaron y se repartió el medio en placas Petri, las cepas se sembraron mediante una estría central gruesa y se incubaron durante 5 días a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. La lectura de la prueba se realizó observando la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, cuando la bacteria sea capaz de hidrolizar la caseína (Prescott, 2002).

3.5.5 Análisis estadístico de datos

El diseño experimental que se realizó fue completo al azar, los tratamientos evaluados fueron los recuentos de bacterias según el medio de cultivo y su capacidad degradativa en mm, por zonas de estudio, cada tratamiento presentó tres repeticiones. La variable respuesta fue el recuento bacteriano y la actividad degradativa, que fue comparada entre los tratamientos mediante un análisis de varianza, pruebas de Tukey y su gráfico de medias, con un nivel de confianza del 95%, el análisis estadístico se realizó en el software estadístico Infostat (versión estudiantil). El modelo matemático a utilizar fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, \dots, t$ (tratamientos) y $j = 1, 2, \dots, r$ (repeticiones)

Donde: Y_{ij} = observación en la j – ésima unidad experimental, sujeto al i – ésimo tratamiento. τ = efecto del i – ésimo tratamiento. μ = efecto de la media general. ε_{ij} = efecto verdadero de la j – ésima unidad experimental (réplica), sujeta al i – ésimo tratamiento (error experimental).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Especies del género *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* de la rizósfera de *Schoenoplectus tatora*

Las especies bacterianas aisladas en la investigación fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* (Tabla 5). En la zona de muestreo de Uros Chulluni, la rizósfera de la Tatora presentó el mayor recuento bacteriano en *E. cloacae* con 257.33×10^7 UFC/ml y el menor recuento en *B. subtilis* con 131.67×10^7 UFC/ml; mientras tanto en la zona de muestreo de la Reserva Nacional del Titicaca (RNT), las raíces de la tatora presentaron el mayor recuento de *Ps. fluorescens* con 209.67×10^7 UFC/ml y el menor recuento fue de *B. subtilis* con 63.33×10^7 UFC/ml. Todos los recuentos presentaron una dispersión leve por debajo del 30%, lo cual significa que los promedios son representativos de cada uno de los recuentos bacterianos.

Tabla 5. Recuentos bacterianos (UFC/ml) de la rizosféricas aisladas en tatora, setiembre - octubre 2017.

Zonas	Bacterias	Muestréos			Prom	C. V. (%)
		1	2	3		
Uros Chulluni	<i>Ps. Aeruginosa</i>	175	162	158	165.00	5.39
	<i>Ps. Fluorescens</i>	152	140	143	145.00	4.31
	<i>B. subtilis</i>	120	142	133	131.67	8.40
	<i>E. cloacae</i>	276	238	258	257.33	7.39
	<i>E. aerogenes</i>	252	240	254	248.67	3.04
RNT	<i>Ps. Aeruginosa</i>	108	106	111	108.33	2.32
	<i>Ps. Fluorescens</i>	210	208	211	209.67	0.73
	<i>B. subtilis</i>	45	77	68	63.33	26.06

<i>E. cloacae</i>	145	165	157	155.67	6.47
<i>E. aerogenes</i>	125	145	139	136.33	7.53

Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

Según los análisis estadísticos realizados, los recuentos bacterianos presentaron diferencia estadística significativa ($F = 5.44$; $gl = 4$; $P = 0.0027$), donde los mayores recuentos se presentaron para *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *Ps. fluorescens* con medias de 206.50, 192.50 y 177.33 x 10⁷ UFC/ml, respectivamente, superando las medias de *Ps. aeruginosa* y *B. subtilis* de 136.67 y 97.50 x 10⁷ UFC/ml, respectivamente.

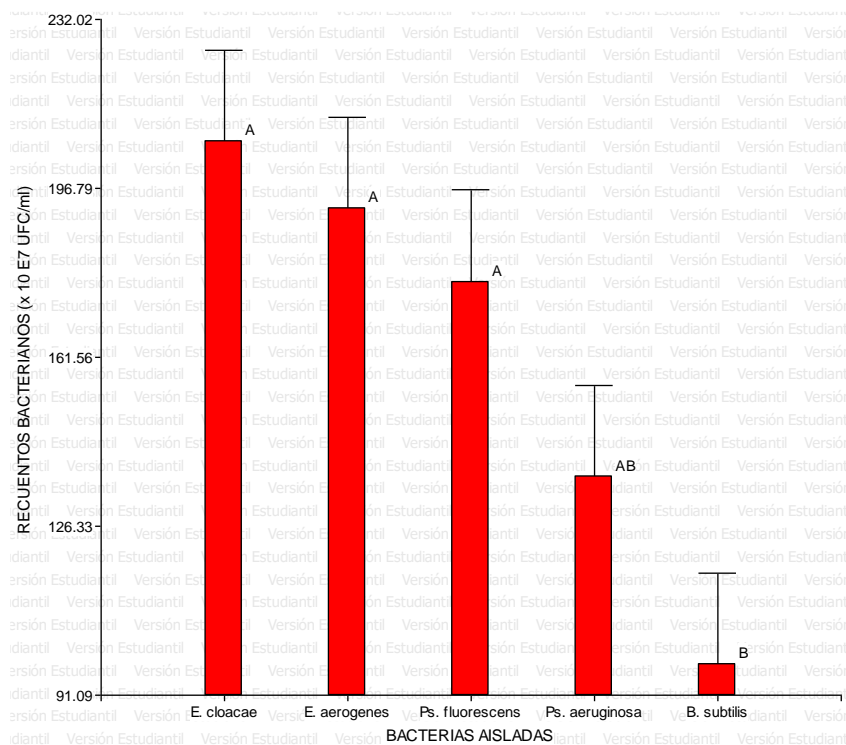


Figura 1. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos en la rizósfera de la totora, setiembre – octubre 2017.

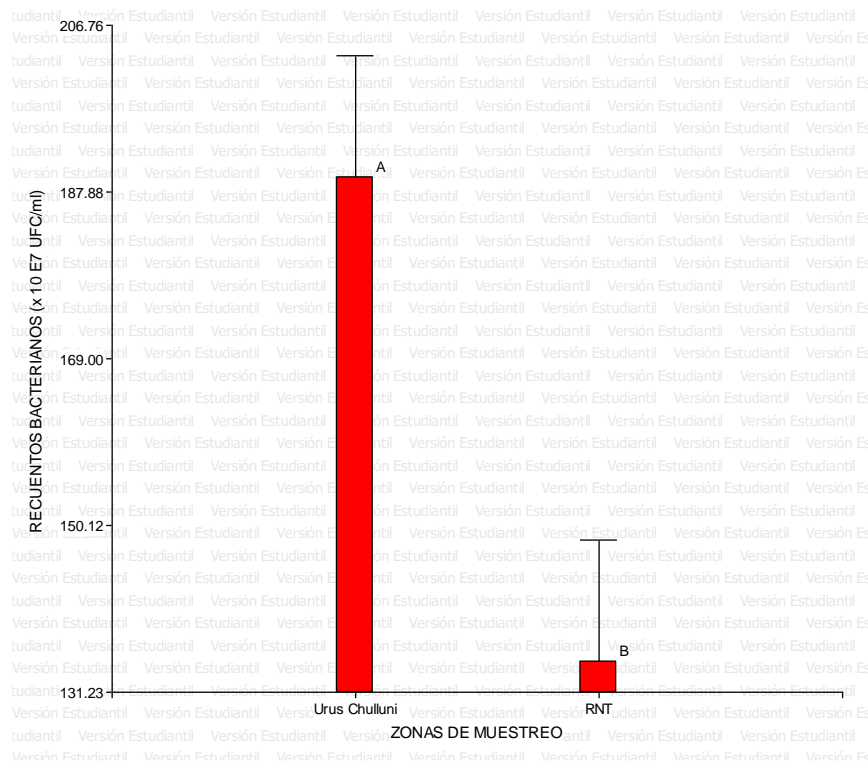


Figura 2. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos de la rizósfera de la totora en dos zonas de muestreo, setiembre – octubre 2017.

Por otro lado, los recuentos bacterianos en las dos zonas de estudio presentaron diferencia estadística significativa ($F = 7.91$; $gl = 1$; $P = 0.0089$), donde el mayor recuento se presentó en la zona de muestreo de Uros Chulluni con una media de 189.53×10^7 UFC/ml, superando la media del recuento bacteriano de 134.67×10^7 UFC/ml en la RNT (Figura 2).

Según las observaciones *in situ*, la presencia de especies bacterianas del género *Enterobacter* y las demás bacterias se debería a que la zona de muestreo de Uros Chulluni viene siendo afectada por la presencia de aguas residuales producidas por la localidad del mismo nombre, ya que gran parte de dichas familias no cuentan con servicio de alcantarillado; mientras tanto la zona de muestreo de la Reserva Nacional del Titicaca, es un área protegida y por tanto la presencia de aguas residuales es muy

baja, debido probablemente a la presencia de macrófitas acuáticas como llachos, totorales, helechos acuáticos, entre otras plantas y se constituyen un refugio para la reproducción de peces nativos del lago Titicaca como los del género *Orestias*.

Los resultados obtenidos en la identificación de bacterias, fueron inferiores a los obtenidos por Leal (2015), quien afirma haber aislado 17 rizobacterias y 8 endófitas en la planta *Pseudelephantopus spiralis*, mientras que 18 rizobacterias y 14 endófitas provinieron de *Pennisetum purpureum* entre sus potencialidades se encontraron cepas con capacidad de transformación del nitrito a nitrato, por tanto pueden ser tomadas en cuenta en un proceso de fitorremediación de aguas con exceso de materia orgánica, la presencia de éstos microorganismos; asimismo, González *et al.* (2012), aislaron bacterias lipolíticas endógenas desde residuos grasos industriales, entre ellas las *Pseudomonas* (cepas 1 y 2), *Bacillus* (cepas 3 y 4) y *Enterobacter* (cepa 5), presentando el potencial de reducir el 90% del volumen de residuos grasos y olores desagradables de trampas de grasa.

La presencia de los microorganismos bacterianos aislados en la investigación, procedieron de zonas afectadas de contaminación fecal leve originada por las aguas residuales de la ciudad de Puno, lo cual se corrobora de que dichos microorganismos normalmente habitan lugares con desechos o residuos de aceites vegetales utilizados en la elaboración de frituras, industrias de productos lácteos, suelos contaminados con aceites y alimentos deteriorados, y que a partir de ellos también aislaron otras bacterias, hongos filamentosos, levaduras y actinomicetos, entre ellos los géneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Candida* y *Geotrichum* sp (Ertugrul *et al.*, 2007), donde se coincide con los géneros

Pseudomonas y *Bacillus* agregándose el aislamiento de e identificación de la bacteria *Enterobacter* sp, la cual procedería de las aguas residuales presentes en las zonas de estudio.

Asimismo, los datos son inferiores a los mencionados por Salgado *et al.* (2012), quienes aislaron 58 cepas bacterianas de la rizósfera de las hidrófitas *Typha dominguensis*, su presencia en dichos hábitats acuáticos, se debería a que las cepas poseen respuestas para asimilar diferentes fuentes de carbono e hidrolizar proteínas y lípidos, en un tiempo de 72 horas, poseendo ventajas para la eliminación de contaminantes, afirmando que dichas cepas podrían ser utilizadas potencialmente en un sistema de tratamiento de aguas y contribuir a la remediación de efluentes; por otro lado, Cepeda & Valencia (2007), aislaron 3 cepas (L1, L2 y L3) desde un proceso de compostaje de materia orgánica, donde la cepa L3 presentó actividad enzimática lipolítica; asimismo, Rodríguez *et al.* (2006), indican que la presencia de cepas microbianas de diferente hábitat, poseen capacidad amilolítica y que en un sustrato con camote (*Ipomea batata* Lam.) fresco rallado en un período de cinco días obtuvieron 32 cepas puras, de ellas el 31.2% presentaron capacidad amilolítica, mayormente los hongos que las bacterias.

La presencia de las bacterias citadas en la rizósfera de la totora (*Schoenoplectus tatora*) en los ecosistemas acuáticos evaluados, se debe a que en dicho ambiente encuentran las unidades estructurales y las fuentes de energía necesarias para formar y mantener su estructura y organización, dichos materiales son llamados nutrientes entre ellos fuentes de carbono, de energía, de nitrógeno, agua y minerales (Romero, 2000); por otro lado, el agua constituye uno de los ecosistemas

más diversos que permite la interacción de los organismos vivos con su medio no vivo, donde continuamente hay flujo de energía y se cicla la materia, en tal sentido el medio acuático posee las condiciones que permiten el crecimiento de organismos de cualquier tipo, ya sean bacterias, protozoos, algas, hongos, virus, plantas y animales (Gonzalez, 2012).

Según Beltrán *et al.* (2015), evaluaron la calidad de agua de la bahía interior de Puno, y reportan valores promedios de temperatura de 15.7 °C, pH de 9.43 unidades, alcalinidad 154.25 mg/l, dureza de 300.5 mg/l, fosfatos de 1.04 mg/l y nitratos de 0.13 mg/l, dichas condiciones acuáticas vendrían favoreciendo la persistencia de bacterias en las aguas de dichos ecosistemas, lo cual es corroborado por Gonzáles (2012), quien afirma que las características físicas y químicas del agua definen el tipo de microorganismos que la habitan, de acuerdo con los requerimientos nutricionales de éstos; tienen mucha capacidad de adaptación por su diversidad y rápido crecimiento. Es el caso de la bacteria *Escherichia coli*, quien posee un crecimiento óptimo a pH entre 6.5 y 7.5 y la mayoría no toleran un pH mayor a 9.5 o inferior a 4.5, lo cual estaría dentro de los rangos mencionados por Beltrán *et al.* (2015), lo mismo estaría ocurriendo con las demás bacterias aisladas en la investigación.

Las bacterias que habitan en las raíces de las plantas, poseen muchas propiedades, un estudio realizado por Tsavkelova *et al.* (2007), afirma que las bacterias endófitas presentes en el interior de los tejidos de plantas mono y dicotiledóneas, promueven el crecimiento de las plantas y aumentan la resistencia a los patógenos (Aliye *et al.*, 2008), a sequía, salinidad e incluso a herbívoros (Pérez *et al.*, 2005), ya que dichas bacterias están equipadas con mecanismos para el secuestro de

metales disponiendo de sideróforos y ácidos orgánicos que disminuyen la fitotoxicidad de los contaminantes (Weyens *et al.*, 2010). Esta característica sería la que estaría causando la presencia de plantas como la totora en zonas contaminadas como la bahía interior de Puno, ya que las bacterias poseerían mecanismos de protección celular para adaptarse a los ambientes contaminados, entre estos se encuentran el eflujo, la secuestación extracelular, la absorción en superficies celulares y en espacios intercelulares, la precipitación, la alteración de la morfología celular, el incremento en la producción de sideróforos y la bioacumulación intracelular, entre otros (Naik & Dubey, 2013).

Las sustancias orgánicas encontradas en un agua doméstica típica consisten en 40 – 60% proteínas, 25 – 50% carbohidratos y 10 – 30% lípidos (Xia *et al.* 2007), las plantas evaluadas en la investigación estarían aproximadamente en estas condiciones ya que la totora colectada habita ambientes contaminados con aguas residuales; dicho material orgánico biodegradable es oxidado bioquímicamente por bacterias heterotróficas (Madigan *et al.* 2006), originando ellas la hidrólisis microbiana que es un proceso a través del cual las macromoléculas son hidrolizadas a oligómeros y monómeros, antes de ser posteriormente degradadas, como por ejemplo aminoácidos, péptidos, monosacáridos y largas cadenas de ácidos grasos.

Las bacterias que interaccionan con la raíz de la planta, son denominan rizobacterias y particularmente están sujetas a un ambiente de suplementación de agua, oxígeno y nutrientes debido a la actividad de las plantas (Cardon & Whitbeck, 2007), su presencia y cantidad de rizobacterias en una planta indica el papel que desempeña la raíz de la vegetación en los procesos de adaptación a las condiciones de una zona de

estudio en particular. La asociación planta – microorganismos beneficiaría en el manejo de la contaminación por parte de esta vegetación, donde la raíz exuda una gran cantidad y gama de compuestos orgánicos que estimula la actividad microbiana, éstas a su vez colabora en la solubilización, degradación y transformación de diferentes compuestos contaminantes y los hacen disponibles a la planta para proveerla de nutrientes que sólo de esta forma podrían obtener o generar resistencia a estos (Cardon & Whitbeck, 2007), las cuales estarían influenciadas por factores tales como el pH, la salinidad y la temperatura (Madigan *et al.*, 2006).

A pesar de poseer una gran cantidad de cepas microbianas, existe una fuerte presión de selección en la rizósfera, y muchos de los saprofitos benéficos son capaces de promover el crecimiento vegetal y la salud de las plantas, debido a que descomponen detritus orgánicos, son promotoras del crecimiento vegetal y antagonistas de hongos y bacterias patógenos de la raíz (Marilley & Arango, 1999), particularmente bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* como los géneros más comúnmente descritos para el control biológico de patógenos, ciclos de nutrientes y desarrollo de semillas (Barea *et al.*, 2005).

Li *et al.* (2008), también afirma que la presencia de bacterias en las raíces, es que cohabitan con ellas otorgándoles beneficios a la planta, debido al mutualismo planta – microorganismo, originando posibilidades sobre su potencial aplicación en procesos de fitorremediación, sobre la base de que muchas de estas bacterias tienen potencial para transformar una diversidad de compuestos químicos y mejorar la capacidad de adaptación de la planta en zonas con excesos de nutrientes o algún tipo de contaminante; Hurek & Reinhold (2003), aislaron e identificaron a la bacteria

endófitas, *Azoarcus* BH72, de tejidos de raíces de la especie de pasto *Leptochloa fusca* L. Kunth, y se atribuye la mejora de la capacidad de fijar nitrógeno para la planta, otras ventajas fueron reportadas por Ryan *et al.* (2008) quienes afirman que las bacterias endófitas promoverían el crecimiento de las plantas, suprimirían fitopatógenos, ayudan a remover contaminantes, solubilizan fosfatos y contribuyen a la asimilación biológica de nitrógeno.

4.2 Capacidad degradativa *in vitro* de almidón, grasas y proteínas por bacterias

4.2.1 Capacidad degradativa *in vitro* de almidón

En la degradación *in vitro* de almidón, la única especie que presentó la capacidad amilolítica fue *B. subtilis*, las cuales presentaron recuentos promedios de 132.50 UFC/ml en la zona de muestreo de Uros Chulluni, siendo superior al recuento promedio de la bacteria obtenido en la zona de muestreo de la Reserva Nacional del Titicaca con 101.5 (UFC/ml), ambos recuentos presentaron una dispersión leve (Tabla 6), estadísticamente siendo mayor en la zona de muestreo de la Uros Chulluni (Figura 3).

Tabla 6. Recuento (UFC/ml) por *Bacillus subtilis* degradadoras de almidón, de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017.

Bacteria	Zonas de muestreo	Tiempos de evaluación		Prom	C. V. (%)
		(UFC/ml)			
		24 horas	48 horas		
<i>Bacillus subtilis</i>	Uros Chulluni	120	145	132.5	13.34
	RNT	98	105	101.5	4.88

Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

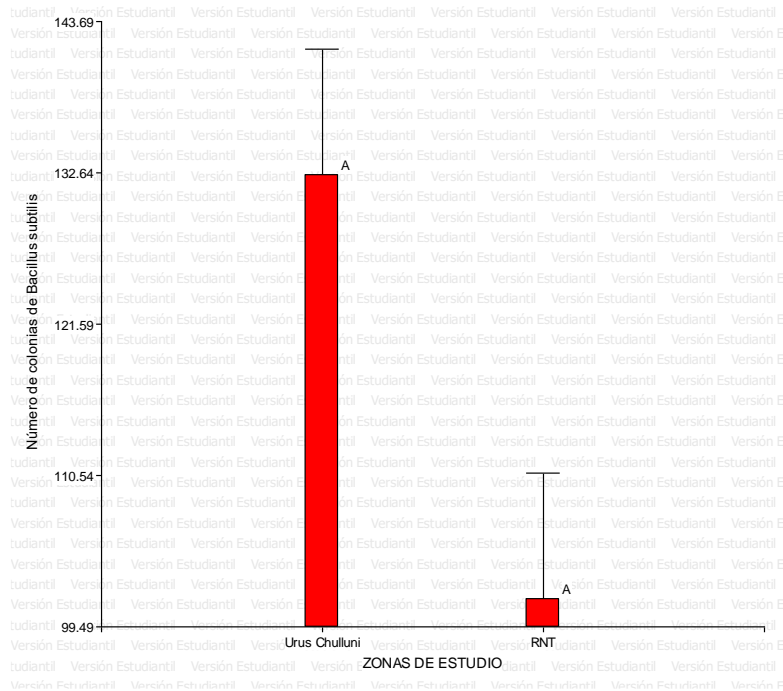


Figura 3. Prueba de Tukey de los recuentos de *Bacillus subtilis* (UFC/ml) en agar almidón, setiembre – octubre 2017.

La capacidad degradativa de almidón por la bacteria *Bacillus subtilis*, fue reflejada con promedios de formación de halos de actividad amilolítica de 4.59 mm en bacterias aisladas de la zona de muestreo de Uros Chulluni, y de 4.10 mm en bacterias aisladas de la Reserva Nacional del Titicaca, los diámetros de halos presentaron una dispersión leve (Tabla 7), no existiendo diferencia estadística significativa ($F = 1.04$; $gl = 1$; $P = 0.3657$) entre los halos de actividad amilolítica entre las bacterias aisladas de las zonas de muestreo (Figura 4).

Tabla 7. Degradación de almidón (UFC/ml) por *Bacillus subtilis*, de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017.

Bacteria	Zonas de muestreo	Actividad amilolítica (mm)			Prom	C. V. (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
<i>Bacillus subtilis</i>	Uros Chulluni	4.15	5.26	4.35	4.59	12.90
	RNT	3.58	4.02	4.71	4.10	13.88

Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

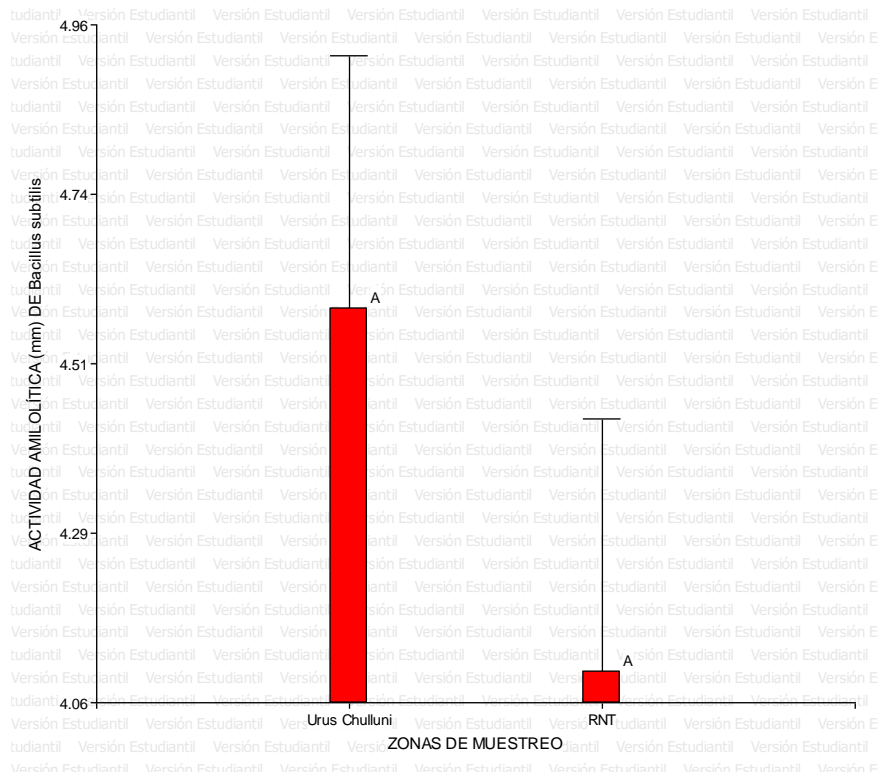


Figura 4. Prueba de Tukey de la capacidad degradativa de almidón por bacterias

Bacillus subtilis en dos zonas de muestreo, setiembre – octubre 2017.

Bacillus subtilis, fue la bacteria que degradó los tres tipos de compuestos orgánicos experimentados en la investigación (almidón, grasas y proteínas), esta capacidad biotecnológica, se debería a que *Bacillus* es un género de interés con un amplio perfil de diversidad fisiológica (acidofilia, alcalofilia, psicrofilia, termofilia y parasitismo), ya que pueden sintetizar sus esporas, y permitirles estar presentes en diferentes hábitats tanto acuáticos como terrestres (Restrepo *et al.*, 2015), cuando actúa como agente rizosférico, degradar sustratos derivados de la fauna, la flora y los compuestos de origen orgánico como los hidrocarburos; promueve la producción de antibióticos, promoción de crecimiento vegetal y los procesos de fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos y de forma indirecta, cuando actúa en la producción de

sustancias antagonistas de patógenos o induciendo mecanismos de resistencia (Cortés *et al.*, 2012).

Por otro lado, este género comprende una amplia diversidad de tipos fisiológicos, donde se destacan aquellos que poseen las características como la degradación de la mayoría de los sustratos derivados de plantas y animales, incluyendo celulosa, almidón, pectina, proteínas, agar, hidrocarburos y otros; además su capacidad para la producción de antibióticos, la nitrificación, la desnitrificación, la fijación de nitrógeno, la litotrofia facultativa, la acidofilia, la alcalofilia, la psicofilia, la termofilia y el parasitismo, ejemplifican su capacidad de sobrevivir en diversos ambientes (Claus & Berkeley, 1986).

Asimismo, dichas bacterias del género *Bacillus* sp, producen enzimas de diferentes que actúan contra otros microorganismos presentes en su hábitat, entre estas enzimas se citan a quitinasas, hidrolasas y proteasas que actúan fundamentalmente sobre los hongos, se cuenta también que *B. subtilis* produce metabolitos como diversas lipasas, proteasas y β glucanasas que actúan sobre el patógeno fúngico *Fusarium oxysporum* (Gutiérrez *et al.*, 1996), asimismo se han informado la producción de quitinasas por parte de *Bacillus cereus*, para el biocontrol de hongos fitopatógenos (Mabuchi *et al.*, 2000). La capacidad que poseen todo organismo se debe a su potencial genético que presentan, ya que la producción de enzimas procede de la síntesis de proteínas en el citoplasma de las células, bajo la información que presenta el ARNm y éste último poseen la información en el ADN del microorganismo bacteriano (Madigan *et al.*, 2006), en la investigación se demostró que las bacterias produjeron enzimas tales como amilasas, lipasas, caseinasas y gelatinasas, a diferencia

de *Escherichia coli* producen lactasa más no amilasas por lo que resultó negativa a degradación.

4.2.2 Capacidad degradativa *in vitro* de grasas

En la degradación *in vitro* de grasas, la especie que presentó el mayor recuento bacteriano fue *E. aerogenes*, con 165 UFC/ml y el menor con 114.5 UFC/ml en *B. subtilis*, en la zona de muestreo de Uros Chulluni; por otro lado, el mayor recuento de bacterias fue de *Ps. aeruginosa* con 131.50 UFC/ml y la menor en *B. subtilis* con 86.50 UFC/ml en la zona de muestreo de la Reserva Nacional del Titicaca, ambos recuentos presentaron una dispersión leve (Tabla 8).

Tabla 8. Recuento (UFC/ml) de las bacterianas degradadoras de grasas, de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017.

Zonas	Bacterias	Tiempo de evaluación		Prom	C. V. (%)
		(UFC/ml)			
		3 días	7 días		
Uros Chulluni	<i>Ps. Aeruginosa</i>	130	152	141.00	11.03
	<i>Ps. Fluorescens</i>	128	160	144.00	15.71
	<i>B. subtilis</i>	110	119	114.50	5.56
	<i>E. cloacae</i>	143	176	159.50	14.63
	<i>E. aerogenes</i>	150	180	165.00	12.86
RNT	<i>Ps. Aeruginosa</i>	128	135	131.50	3.76
	<i>Ps. Fluorescens</i>	115	128	121.50	7.57
	<i>B. subtilis</i>	75	98	86.50	18.80
	<i>E. cloacae</i>	83	92	87.50	7.27
	<i>E. aerogenes</i>	88	96	92.00	6.15

Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

Los recuentos de colonias de las bacterias evaluadas no presentaron diferencia estadística significativa ($F = 0.85$; $gl = 4$; $P = 0.5165$), a pesar de que aritméticamente los mayores recuentos bacterianos fueron en las especies *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, sobre un recuento reducido de *B. subtilis* (Figura 5). Sin embargo, si existió diferencia estadística significativa entre los recuentos bacterianos procedentes de las dos zonas de muestreo ($F = 16.96$; $gl = 1$; $P = 0.0006$), siendo mayor el recuento en la zona de muestreo de Uros Chulluni con respecto a la zona de muestreo de la Reserva Nacional del Titicaca (Figura 6).

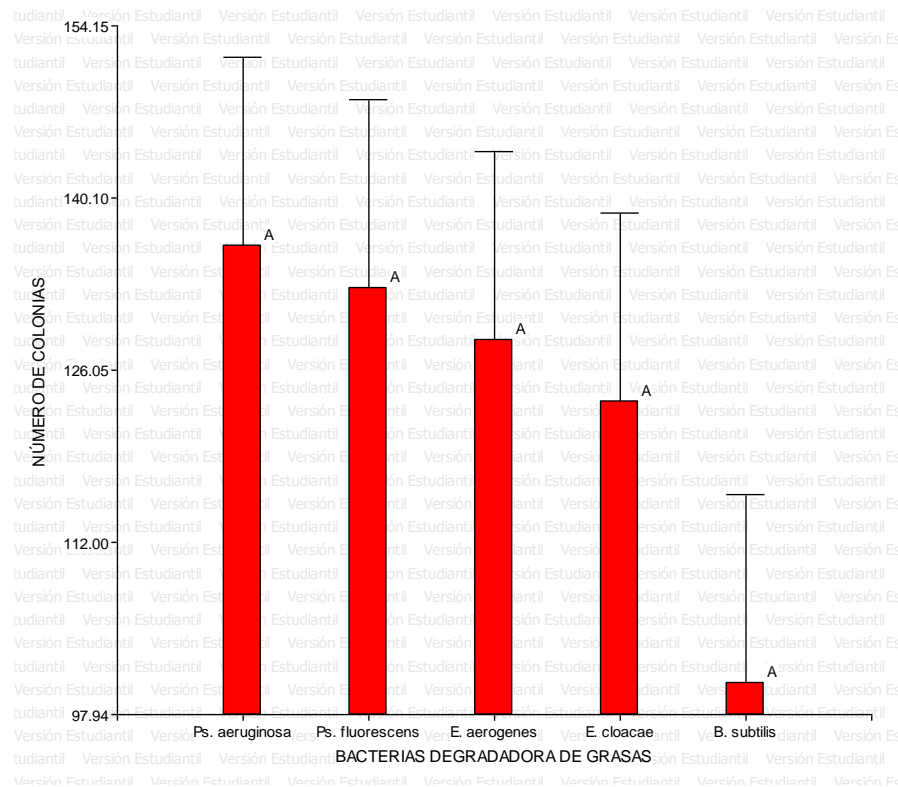


Figura 5. Prueba de Tukey de los recuentos de bacterias aisladas (UFC/ml) en agar Tributirina, octubre 2017.

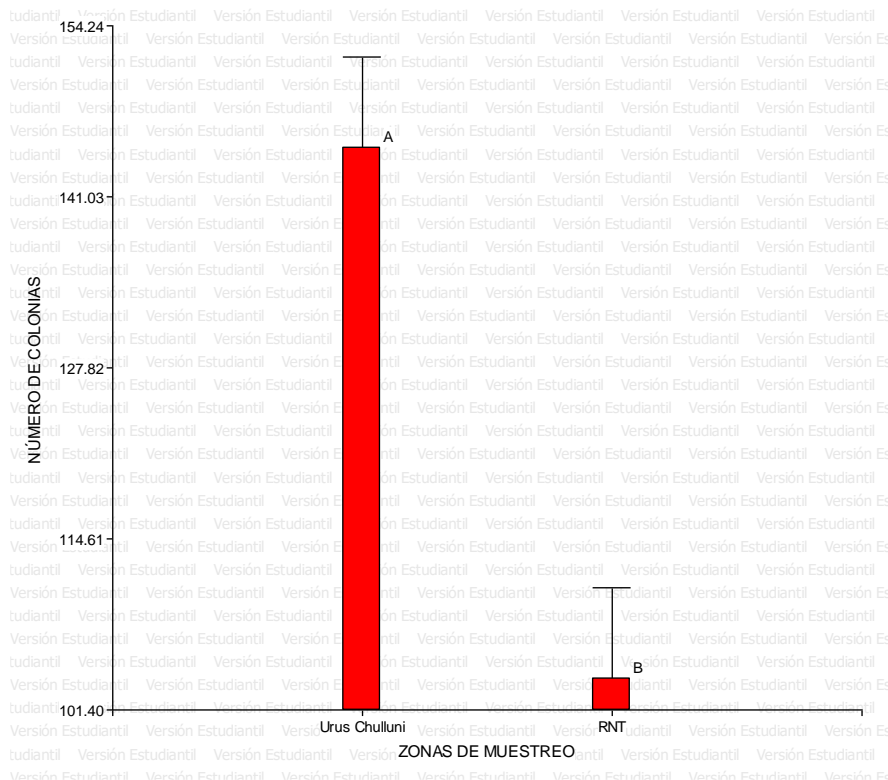


Figura 6. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos (UFC/ml) en agar Tributirina según zona de muestreo, octubre 2017.

La capacidad degradativa de grasas, fue reflejada con promedios de formación de halos de actividad lipolítica, donde el mayor halo de degradación fue 3.47 mm producida por *B. subtilis*, y el menor fue de 1.50 mm de *Ps. fluorescens* en bacterias aisladas de la zona de muestreo de Uros Chulluni; por otro lado, en la zona de muestro de la Reserva Nacional del Titicaca, el mayor halo de degradación lo presentó *B. subtilis* con 4.34 mm y el menor fue de *Ps. fluorescens* con 1.32 mm, los diámetros de halos presentaron una dispersión leve (Tabla 9).

Tabla 9. Degradación de grasas (UFC/ml) de las bacterianas, de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017.

Zonas	Bacterias	Actividad lipídica (mm)			Prom	C. V. (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
Uros Chulluni	<i>Ps. aeruginosa</i>	1.52	1.84	1.65	1.67	9.64
	<i>Ps. fluorescens</i>	1.12	1.75	1.63	1.50	22.30
	<i>B. subtilis</i>	3.27	4.12	3.01	3.47	16.75
	<i>E. cloacae</i>	2.98	3.74	3.48	3.40	11.36
	<i>E. aerogenes</i>	2.58	2.68	2.23	2.50	9.46
RNT	<i>Ps. aeruginosa</i>	1.24	2.14	1.52	1.63	28.20
	<i>Ps. fluorescens</i>	1.26	1.59	1.11	1.32	18.60
	<i>B. subtilis</i>	3.89	4.51	4.62	4.34	9.07
	<i>E. cloacae</i>	2.84	2.54	2.48	2.62	7.36
	<i>E. aerogenes</i>	3.01	2.54	2.86	2.80	8.56

Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

La capacidad degradativa de lípidos por las bacterias, fue reflejada con promedios de formación de halos de actividad lipolítica, los cuales presentaron diferencia estadística significativa ($F = 33.50$; $gl = 4$; $P < 0.0001$), siendo mayor la media obtenida por *B. subtilis* con 3.90 mm y los menores halos con las bacterias *Ps. aeruginosa* y *Ps. fluorescens* con medias de 1.65 y 1.41 mm, respectivamente (Figura 7); por otro lado, no existió diferencia estadística significativa entre bacterias con actividad lipolítica procedentes de las dos zonas de muestreo ($F = 0.01$; $gl = 1$; $P = 0.9229$), pero ligeramente fue superior la actividad lipolítica de bacterias procedentes de la zona de la Reserva Nacional del Titicaca con respecto a la zona de muestreo de Uros Chulluni (Figura 8).

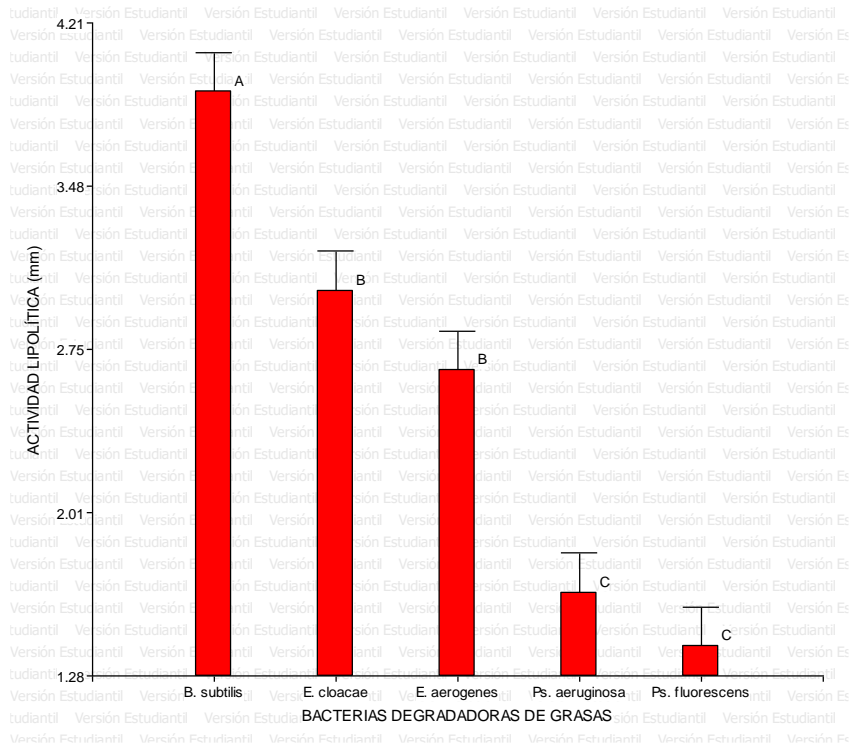


Figura 7. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos de la rizósfera de la totora en dos zonas de muestreo, setiembre – octubre 2017.

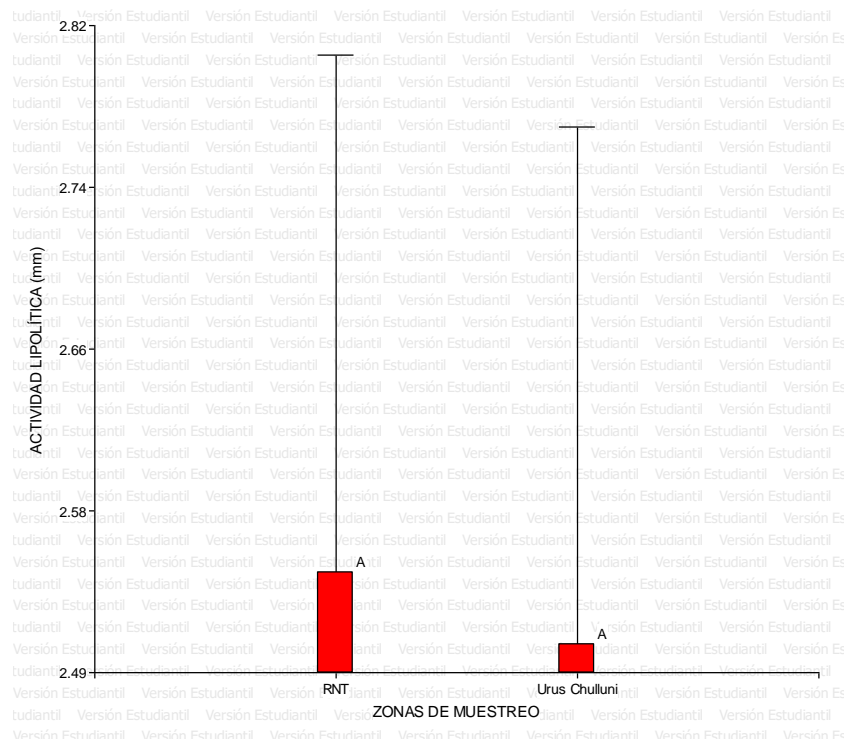


Figura 8. Prueba de Tukey de los recuentos de bacterias con actividad lipolítica según la procedencia de la zona de muestreo, setiembre – octubre 2017.

Los resultados obtenidos en la investigación, concuerda con lo manifestado por González *et al.* (2012), quienes aislaron bacterias lipolíticas endógenas desde un residuo graso industrial y tratar biológicamente con un consorcio integrado por *Pseudomonas* (cepas 1 y 2), *Bacillus* (cepas 3 y 4) y *Enterobacter* (cepa 5), en 21 días y a temperatura ambiente, degradó 341.5 mg de grasa (91.4% de degradación); la carga bacteriana superó 1010 UFC/ml, la DBO5 20° y DQO disminuyeron en un 33.6% y 59.8%, por tanto, fueron efectivas en eliminar el 90% del volumen de residuos grasos y olores desagradables de trampas de grasa de empresas procesadoras de cerdos y aves, representando una herramienta útil para el tratamiento de estos residuos; estos resultados se deberían a que los organismos deben de adaptarse a las condiciones donde habitan en presencia de dichos compuestos orgánicos (Madigan *et al.*, 2006).

Lo manifestado anteriormente, se reafirma con lo señalado por Ertugrul *et al.* (2007), quien indica que los microorganismos con un alto potencial para producir lipasas habitan principalmente los desechos o residuos de aceites vegetales de frituras, industrias de productos lácteos, suelos contaminados con aceites entre otros, entre esos microorganismos se mencionan los géneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Candida* y *Geotrichum* sp, debido a que las lipasas son las enzimas más utilizadas en procesos biotecnológicos y en procesos químicos, la investigación se enfocó en la búsqueda de nuevos microorganismos con propiedades lipolíticas deseadas (Aceves & Castañeda, 2012).

Por su parte, Joseph *et al.* (2007), reincide indicando que existe un gran número de microorganismos que sintetizan lipasas, entre las productoras a

temperaturas bajas se tiene a *Acinetobacter* sp., *Achromobacter lipolyticum*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus sphaericus*, *Photobacterium lipolyticum*, *Morexella* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Psychrobacter okhotskensis*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus epidermidis*; asimismo, Salgado *et al.* (2012), afirman que las aguas poseen contaminantes como carbohidratos, proteínas y ácidos grasos y los agentes biológicos poseen ventajas en la eliminación de estos contaminantes, en la rizósfera de hidrofítas *Typha dominguensis* se aislaron 58 cepas bacterianas, para la remoción de materia orgánica, de los cuales 13 cepas seleccionadas removieron el DQO, 21 cepas mostraron respuestas de hidrolizar proteínas y lípidos, en un tiempo de 72 horas, concluyendo que dichas cepas podrían ser utilizadas potencialmente en un sistema de tratamiento de aguas y contribuir a la remediación de efluentes.

La tarea actual como Microbiólogos deberá de ser el aislar microorganismos con capacidad degradativa en diferentes ambientes y/o sustratos, es así que Cepeda & Valencia (2007), aislaron 3 cepas de un proceso de compostaje de materia orgánica (L1, L2 y L3), de las cuales la cepa L3 presentó actividad enzimática lipolítica; por otro lado, Rodríguez *et al.* (2006), seleccionaron cepas microbianas de diferente hábitat, con capacidad amilolítica a partir de camote (*Ipomea batata* Lam.) fresco rallado, ajustados a pH de 4, 5, 6, 7 y 8 (con soluciones al 10% de HCl y NaOH), donde los hongos presentaron mayores índices de degradación que las bacterias.

4.2.3 Capacidad degradativa *in vitro* de proteínas

En la degradación *in vitro* de grasas, la especie que presentó el mayor recuento bacteriano fue *E. cloacae*, con 310 UFC/ml y el menor recuento con 50.50 UFC/ml en

la bacteria *B. subtilis* en la zona de muestreo de Uros Chulluni; por otro lado, el mayor recuento de bacterias fue de *Ps. aeruginosa* con 192.00 UFC/ml y la menor en *B. subtilis* con 27.00 UFC/ml en la zona de muestreo de la Reserva Nacional del Titicaca, ambos recuentos presentaron una dispersión leve (Tabla 10).

Tabla 10. Recuento (UFC/ml) bacterianas degradadoras de proteínas, de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017.

Zonas	Bacterias	Tiempo de evaluación		Prom	C. V. (%)
		(UFC/ml)			
		3 días	5 días		
Uros Chulluni	<i>Ps. aeruginosa</i>	280	305	292.50	6.04
	<i>Ps. fluorescens</i>	180	198	189.00	6.73
	<i>B. subtilis</i>	45	56	50.50	15.40
	<i>E. cloacae</i>	300	320	310.00	4.56
	<i>E. aerogenes</i>	280	308	294.00	6.73
RNT	<i>Ps. aeruginosa</i>	189	195	192.00	2.21
	<i>Ps. fluorescens</i>	168	179	173.50	4.48
	<i>B. subtilis</i>	25	29	27.00	10.48
	<i>E. cloacae</i>	150	162	156.00	5.44
	<i>E. aerogenes</i>	175	187	181.00	4.69

Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

Los recuentos de colonias de las bacterias en medio de cultivo agar caseína presentaron diferencia estadística significativa ($F = 9.15$; $gl = 4$; $P = 0.0006$), donde los mayores recuentos fueron obtenidos en las especies *Ps. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* y *Ps. fluorescens*, con medias de 242.25, 237.50, 233 y 181.25 UFC/ml, respectivamente, siendo superiores a *B. subtilis* con una media de 38.75 UFC/ml (Figura 9), de igual modo, también existió diferencia estadística significativa entre los recuentos bacterianos procedentes de las dos zonas de muestreo ($F = 4.42$; $gl = 1$; $P =$

0.0499), siendo mayor el recuento en la zona de muestreo de Uros Chulluni con una media de 227.20 UFC/ml, con respecto a la zona de muestreo de la Reserva Nacional del Titicaca con una media de 145.90 UFC/ml (Figura 10).

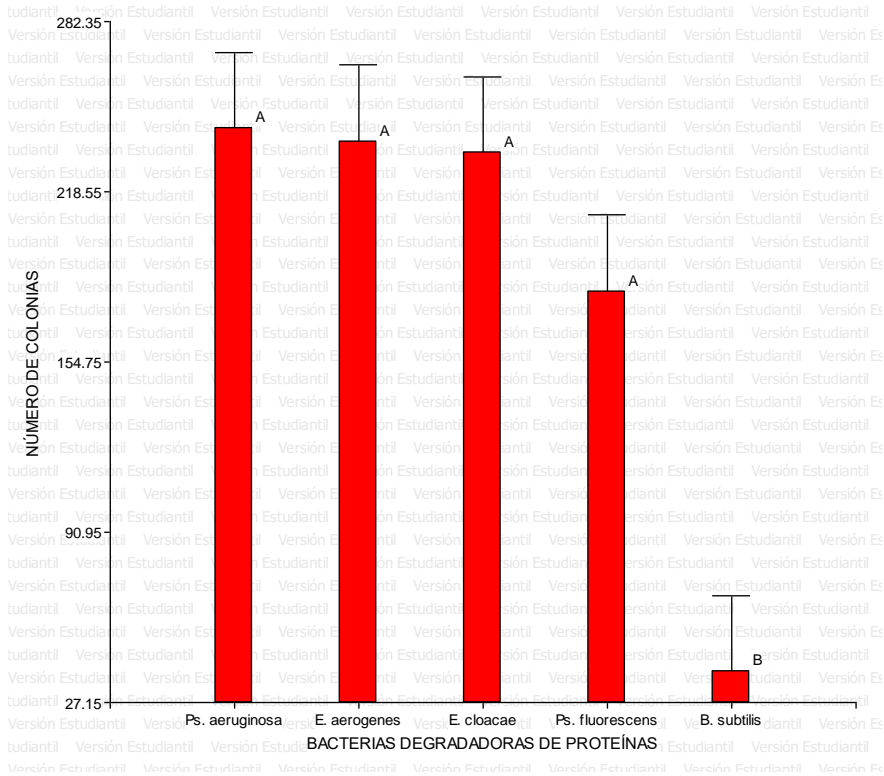


Figura 9. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos en agar caseína, octubre 2017.

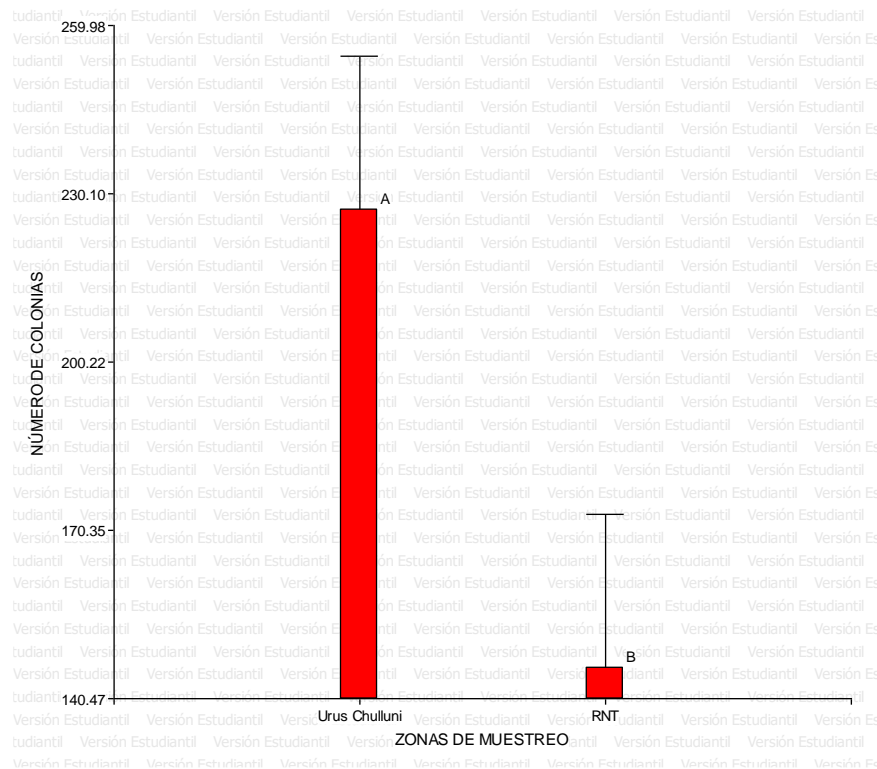


Figura 10. Prueba de Tukey de los recuentos bacterianos en agar caseína según zona de muestreo, octubre 2017.

La capacidad degradativa de proteínas, fue reflejada con promedios de formación de halos en el medio de cultivo agar caseína, donde el mayor halo de degradación fue 5.82 mm producida por *Ps. aeruginosa*, y el menor fue de 1.52 mm de *B. subtilis* entre las bacterias aisladas de la zona de muestreo de Uros Chulluni; por otro lado, en la zona de muestro de la Reserva Nacional del Titicaca, el mayor halo de degradación lo presentó *Ps. fluorescens* con 5.88 mm y el menor fue de *B. subtilis* con 1.82 mm, los diámetros de halos presentaron una dispersión leve (Tabla 11).

Tabla 11. Degradación de proteínas (UFC/ml) de las bacterianas, de las zonas de muestreo Uros Chulluni y Reserva Nacional del Titicaca, octubre 2017.

Zonas	Bacterias	Actividad proteolítica (mm)			Prom	C. V. (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
Uros Chulluni	<i>Ps. Aeruginosa</i>	6.01	5.94	5.52	5.82	4.55
	<i>Ps.</i>	5.54	5.26	5.48	5.43	2.72
	<i>Fluorescens</i>					
	<i>B. subtilis</i>	1.53	1.42	1.62	1.52	6.58
	<i>E. cloacae</i>	2.44	2.56	2.48	2.49	2.45
	<i>E. aerogenes</i>	2.26	2.41	2.21	2.29	4.54
RNT	<i>Ps. Aeruginosa</i>	5.24	5.57	5.59	5.47	3.60
	<i>Ps. fluorescens</i>	5.89	5.56	6.20	5.88	5.44
	<i>B. subtilis</i>	1.84	1.89	1.74	1.82	4.19
	<i>E. cloacae</i>	2.45	2.46	2.51	2.47	1.30
	<i>E. aerogenes</i>	2.78	2.48	2.35	2.54	8.69

Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

La capacidad degradativa de proteínas por las bacterias, fue reflejada con promedios de formación de halos de actividad proteolítica, los cuales presentaron diferencia estadística significativa ($F = 408.83$; $gl = 4$; $P < 0.0001$), siendo mayor la media obtenida por *Ps. fluorescens* y *Ps. aeruginosa* con 5.66 y 5.65 mm, respectivamente y el menor halo en *B. subtilis* con 1.67 mm (Figura 11); por otro lado, no existió diferencia estadística significativa entre bacterias con actividad proteolítica procedentes de las dos zonas de muestreo ($F = 0.04$; $gl = 1$; $P = 0.8502$), pero ligeramente fue superior la actividad proteolítica en bacterias procedentes de la zona de la Reserva Nacional del Titicaca con respecto a la zona de muestreo de Uros Chulluni (Figura 12).

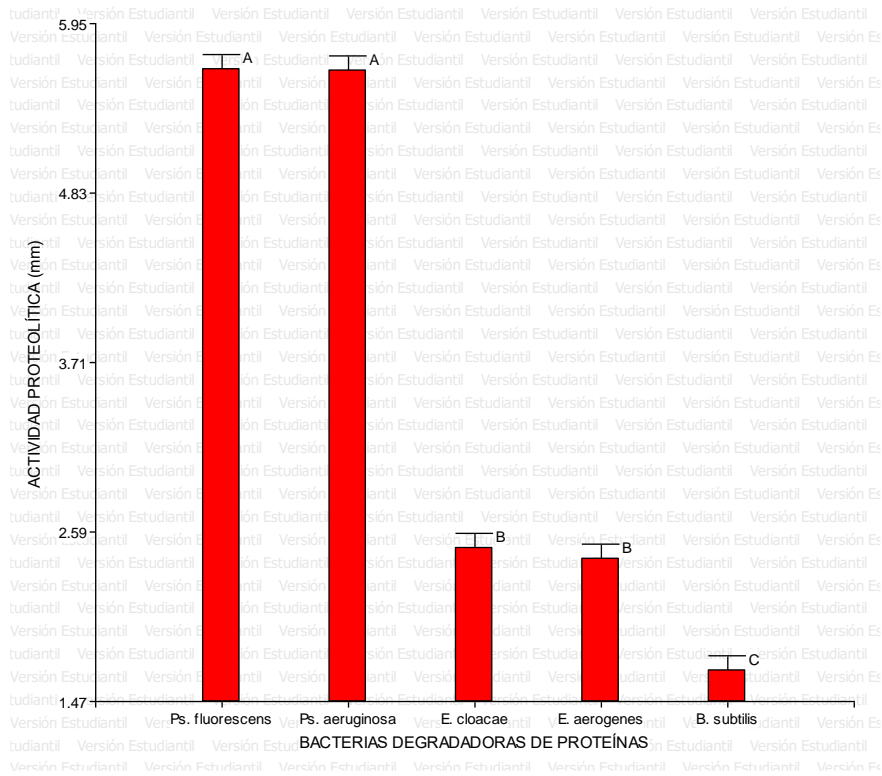


Figura 11. Prueba de Tukey de la capacidad degradativa (mm) de bacterias en agar caseína, octubre 2017.

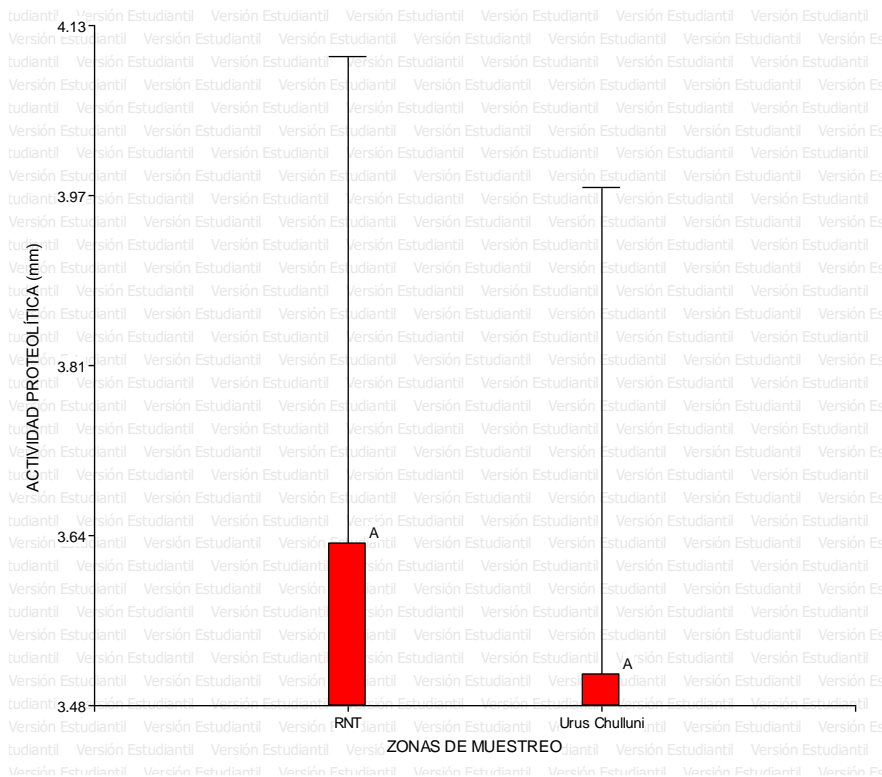


Figura 12. Prueba de Tukey de la capacidad degradativa de bacteriomas según zona de estudio, octubre 2017.

La finalidad de la investigación, fue la de aislar bacterias de la rizósfera de la totora y evaluar su potencial biodegradador de azúcares, grasas y proteínas, debido a que las aguas residuales son portadoras de ellas y así generar una biotecnología bacteriana para el tratamiento de aguas residuales, lo cual concuerda con los reportado por Leal (2015), quien afirma que existe una acción conjunta de la vegetación y los microorganismos en mitigar efectos negativos provocados en el recurso hídrico, dicho investigador obtuvo 17 rizobacterias y 8 endófitas de *Pseudelephantopus spiralis*, entre sus potencialidades encontró cepas con capacidad de transformación del nitrito a nitrato, por tanto pueden ser tenidas en cuenta en un proceso de fitorremediación de aguas con exceso de materia orgánica; asimismo Huane & Rivera (2014), determinaron que *Pseudomonas aeruginosa* en ciertos efluentes grasos de expendio de comida rápida produjeron enzimas satisfactoriamente y que a tiempos mayores a 24 horas (48 y 72 horas) la actividad de la enzima decrece.

La importancia en la producción de enzimas a partir de bacterias, radica en que son catalizadores biológicos con un amplio espectro de aplicaciones en la industria y en otras áreas relacionadas, su utilización ha llevado a mejorar los procesos y productos de la empresa, son ecológicamente más favorable que otras formas de producción, beneficiando tanto a operarios como al medio ambiente, reduciendo el consumo de químicos y compuestos tóxicos, lo que finalmente disminuye costos e impacto ambiental (Espina, 2010); en la investigación se reportaron mayormente bacterias Gram negativas que positivas, lo cual concuerda con Hallberg & Johnson (2005), quienes afirma que la mayor representación de bacterias fueron Gram negativas, y con morfología bacilar en los aislamientos realizados a partir de la rizosfera de plantas; no obstante, que existe diferencia en la presencia de ciertas

bacterias según las raíces de la planta acuática, por lo que está primariamente determinada por las especies de plantas junto con los factores ambientales (Muratova *et al.* 2003) presentes en su hábitat, en tal sentido los aislamientos no presentarán obligatoriamente iguales resultados.

En la investigación se determinó la presencia de bacterias degradadoras de azúcares esencialmente el almidón, lo cual puede variar según la dependencia del compuesto en cuestión, el 95% de las cepas crecen en presencia de glucosa como fuente de carbono, el 64% en manosa, el 62% en xilosa, el 64% en lactosa y el 81% en almidón, el mayor porcentaje generalmente es la glucosa ya que es la fuente de carbono utilizada por un amplio número de bacterias, por presentar enzimas constitutivas para su utilización, a diferencia de lo que ocurre para otros carbohidratos, cuando sólo en presencia de estos se induce en la célula la síntesis de las enzimas involucradas en su catabolismo (Madigan *et al.* 2006).

Las bacterias estudiadas presentaron una versatilidad en la utilización de fuentes de carbono para su crecimiento, teniendo en cuenta la variedad de carbohidratos estudiados, monosacáridos (glucosa, manosa y xilosa), disacáridos (lactosa) y polisacáridos (almidón), las aguas residuales presentan carbohidratos en el 40% de la composición orgánica (Jarusutthirak *et al.* 2002), por lo que es importante la obtención de cepas con capacidad variada para la utilización de estos compuestos, logrando que el 41% de las cepas mostraron la asimilación de los cinco carbohidratos estudiados y el 76% asimiló al menos tres de los carbohidratos ensayados, dichos resultados se parecen a los obtenidos en la investigación; de similar forma, Xia *et al.* (2007), estudiaron gran número de los aislados bacterianos y el 47% hidrolizó la

caseína, el 36% hidrolizó la gelatina y el 38% hidrolizó el Tween 80, estos resultados se deben a que las bacterias presentan la capacidad para hidrolizar proteínas y lípidos, por lo que resultan atractivas para su utilización en el posible tratamiento de estos compuestos, que en ocasiones resultan, difíciles de eliminar de las aguas, haciéndose más importante aún contar con microorganismos que eliminen estos contaminantes.

IV. CONCLUSIONES

- Las especies bacterianas identificadas en la rizósfera de totora (*Schoenoplectus tatora*) procedentes de las zonas de muestreo de Uros Chulluni y la Reserva Nacional del Titicaca son *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter. Aerogenes* y *Bacillus subtilis*, presentando diferencia entre los recuentos bacterianos y entre las zonas de muestreo ($P < 0.05$).
- La capacidad degradativa *in vitro* de almidón fue determinada con bacterias *Bacillus subtilis*, y las grasas (Tributirina) y proteínas (caseína) por *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* existiendo diferencia entre las actividades degradativas entre bacterias y las zonas procedencia de las muestras de totora ($P < 0.05$).

V. RECOMENDACIONES

- A los investigadores (tesistas, profesionales, entre otros) realizar la identificación bioquímica y molecular de las especies de bacterias de la rizósfera de las macrófitas existentes en el lago Titicaca y su capacidad degradativa de compuestos orgánicos.
- A la Municipalidad Provincial de Puno, aplicar microorganismos degradadores de compuestos orgánicos de manera experimental en la laguna de oxidación de aguas residuales – Espinar.

VI. REFERENCIAS

- Aceves A. & Castañeda L. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Revista Vitae*, Vol. 19 (3).
- Ahmad F., Ahmad I. & Khan M. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbial Research*. Vol. 163 (2): 173 – 181.
- Aiyer V. (2005). Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 4 (13): 1525 – 1529.
- Aliye N., Fininsa C. & Hiskias Y. (2008). Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Rev. Biol. Control*. Vol. 47: 282 – 288.
- Allinge N., Cava M. & De Jongh, D. (1976). *Química orgánica*. España: Editorial Barcelona Reverté.
- Álvarez S. (2005). La descomposición de materia orgánica en humedales: la importancia del componente microbiano. *Revista Científica y Técnica de ecología y medio ambiente*. Ecosistemas. Página web: http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=118&Id_Categoria=2&tipo=portada.
- Aquihuatl M. & Pérez M. (2004). *Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General*. CBS Iztapalapa. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D.F. 118.
- Aquihuatl M., Volke T., Prado L., Shirai K., Ramírez F. & Salazar M. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio microbiología general*. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad

- Iztapalapa. México D.F. pp. 78.
- Atlas M & Parks C. (1993). Handbook of microbiological media. CRC Press. Boca Raton, USA.
- Babavalian H., Amoozegar A., Pourbabae A., Moghaddam M. & Shakeri, F. (2013). Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. Microbiology. Vol. 82 (4): 466 – 474.
- Bailón L., González R. & Cervantes A. (2003). Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Barea M., Pozo J., Azcón R. & Azcón C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany. Vol. 56: 1761 – 1778.
- Beltrán D., Palomino R., Moreno E., Peralta C. & Montesinos D. (2015). Calidad de agua de la bahía interior de Puno, lago Titicaca durante el verano del 2011. Revista Peruana de Biología. Vol. 22 (3): 335 – 340.
- Berruga M. (1999). Desarrollo de procedimientos para el tratamiento de efluentes de quesería. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Madrid – España. 337 p.
- Binod P., Palkhiwala P., Gaikawai R., Nampoothiri K., Duggal A., Dey K. & Pandey A. (2013). Industrial Enzymes – Present status and future perspectives for India. J Sci Ind Res. Vol. 72: 271 – 286.
- Bornscheuer U. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbial. Rev. Vol. 26: 73 – 81.
- Brady C., Venter S., Cleenwerck I., Vandemeulebroecke K., De Vos P. & Coutinho T. (2010). Transfer of *Pantoea citrea*, *Pantoea punctata* and *Pantoea terrea* to the

- genus *Tatumella emend.* as *Tatumella citrea* comb. nov., *Tatumella punctata* comb. nov. and *Tatumella terrea* comb. nov. and description of *Tatumella morbirosei* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Vol. 60 (Pt 3): 484 – 94.
- Brix H. & Schierup H. (1989). The use of aquatic macrophytes in water-pollution control. In Ambio. Stockholm. Vol. 18: 100 – 107.
- Canales P., Chávez E. & Zavaleta A. (2014). Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. XVI (2): 150 – 157.
- Cardon G. & Whitbeck L. (2007). The Rhizosphere an Ecological Perspective. Primera edición. Academic Press. USA. p. 212.
- Carrascal A., Páez A. & Burbano M. (2003). Manual de laboratorio: microbiología de alimentos. Centro editorial Javeriano. Bogotá, Colombia.
- Cepeda L. & Valencia S. (2007). Aislamiento de bacterias lipolíticas y determinación de patógenos humanos. Tesis de Licenciatura en Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia. 105 p.
- Cercenado E. & Cantón R. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC. Página web: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>. Fecha de revisión: 20 mayo 2018.
- Choudhary D. & Johri B. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiological

- Research. Vol. 164 (5): 493 – 513.
- Claus D. & Berkeley R. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.2. Edited by P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. Baltimore: William and Wilkins. p. 1105 – 1139.
- 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. Vol. 14 (5): 4658 – 4664.
- Collot D. (1980). Lecs macrophytes de quelques lacs andins. Convenio Universidad Mayor de San Andrés – ORSTOM. La Paz – Bolivia.
- Condori E. (2001). Sistemática de Fanerógamas. Editorial Universitaria. Puno – Perú.
- Condori L. & Delgadillo M. (2010). Planta de tratamiento de aguas residuales con macrófitas para comunidades cercanas al lago Titicaca. Journal Boliviano de Ciencias. Vol. 7 (21): 63 – 66.
- Cortés A., García J., Pedroza A., Martínez M. & Gutiérrez V. (2012). Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. Universitas Scientiarum. Vol. 17 (1): 43 – 52.
- Dallas, S. (2005). Reedbeds for the Treatment of “las aguas grises” as an Application of Ecological Sanitation in Rural Costa Rica, Central America.” Murdoch University, Western Australia.
- De Busk T., Reddy R. & D'Angelo E. (1989). Oxygen transport through aquatic macrophytes: The role in wastewater treatment. Journal of Environmental Quality. Vol. 19 (2): 261 – 267.
- Delgadillo O., Camacho A., Pérez L. & Andrade M. (2010). Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales. Centro Andino para la Gestión y

- uso del Agua. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba – Bolivia.
- Deutch E. (2002). Characterization of a salt-tolerant extracellular α -amylase from *Bacillus dipsosauri*. Letters in Applied Microbiology. Vol. 35 (1): 78 – 84.
- Dey R., Pal K., Bhatt D. & Chauhan S. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. Microbiological Research. Vol. 159: 371 – 294.
- EPA. (1988). Design manual: Constructed wetlands and aquatic plant systems for municipal wastewater treatment US EPA. <http://yosemite.epa.gov/water/owrcatalog.nsf>.
- Ertugrul S., Donmez G. & Takac S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. From olive mill wastewater and improving its enzyme activity. J Hazard Mater. Vol. 149 (3): 720 – 724.
- Espigares M. & Pérez J. (2017). Aguas residuales. Composición. Página web: http://cidta.usal.es/cursos/EDAR/modulos/Edar/unidades/LIBROS/logo/pdf/Aguas_Residuales_composicion.pdf. Fecha de revisión: 15 de mayo del 2017.
- Espina G. (2010). Obtención y caracterización de una nueva lipasa bacteriana de origen marino antártico, con actividad enzimática a bajas temperaturas, en su forma nativa y recombinante. Tesis de Magister en Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago – Chile. 130 p.
- Fabián M. (2015). Aislamiento de bacterias nativas con actividad lipolítica presentes en el fruto *Elais guineensis* “palma aceitera” de la región de Tournavista Huánuco – Perú. Tesis de Licenciatura. E. A. P. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo – Perú. 50 p.

- Flores M., Zavaleta I. & Chávez L. (2010). Bacterias Halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana San Martín. *Ciencia e investigación*. Vol. 13 (2): 87 – 91.
- Fullana N. (2014). Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. Opción Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de la República del Uruguay. 136 p.
- García M. & Quintero R. (2000). *Biotechnologies Alimentaria*. Ed. Limusa. México.
- Ghozlan H., Deif H., Kandil A. & Sabry S. (2006). Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. *The Journal of General and Applied Microbiology*. Vol. 52 (2): 63 – 72.
- Gómez M. (1996). Degradación de péptidos hidrófobos por bacterias lácticas. Aplicación en la eliminación del sabor amargo del queso. Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. España. 263 p.
- González D., Amaíz L., Medina L., Vargas R., Izzeddin N. & Valbuena O. 2012. Biodegradación de residuo graso industrial empleando bacterias endógenas. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal*. Vol. 3 (2): 105 – 118.
- González G. (2012). *Microbiología del agua. Conceptos y aplicaciones*. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito. Bogotá – Colombia. 409 p.
- González J. (2010). *Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico*. 3ra Edición. Elsevier Masson España, S.L. Barcelona, España. 548 p.
- Goyzueta G., Alfaro R. & Aparicio M. (2009). *Totorales del lago Titicaca, importancia, conservación y gestión ambiental*. Editorial Meru Diseño y Publicidad. Puno – Perú. 325 p.

- Grant W. & Long P. (1989). Microbiología ambiental. Editorial Acribia. Zaragoza – España. 298 p.
- Gupta R., Beg Q. & Lorenz P. (2002) Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 59: 15 – 32.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami K. & Chauhan B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem. Vol. 38: 1599.
- Gupta R., Gupta K., Saxena K. & Khan S. (1999). Bleach-stable, Alkaline Protease from *Bacillus* sp. Biotechnol Lett. Vol. 21: 135 – 138.
- Gutiérrez F., Acero N., Lucas J. & Probanza A. (1996). The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* L.) growth. Characterization and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. Plant Soil. Vol. 182: 67 – 74.
- Hallberg K. & Johnson D. (2005). Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine. Sci. Total Environ. Vol. 338: 53 – 66.
- Hendricks B. (2000). Manual de Bergey's of Determinative bacteriology. Ninth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Estados Unidos. 787 p.
- Henry G., Camargo A. & Pezzato M. (2008). Growth of free-floating aquatic macrophytes in different concentrations of nutrients. Hydrobiologia. Vol. 610 (1): 153 – 160.
- Hiol A. & Deyris V. (2002). Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. Enzyme and Microbiol technology. Francia,
- Holguín G. (2008). La comunicación entre las bacterias y plantas. Revista Ciencia.

Vol. 72: 72 – 78.

- Huane L. & Rivera R. (2014). Evaluación de la adición de un inóculo para estimular a escala de laboratorio la biodegradación de efluentes grasos. Tesis de Licenciatura en Química Farmacia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. 65 p.
- Hurek T. & Reinhold B. (2003). *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Journal of Biotechnology*. Vol. 106: 169 – 178.
- Jarusutthirak C., Amyb G. & Croué P. (2002). Fouling characteristics of wastewater effluent organic matter (EfOM) isolates on NF and UF membranes. *Desalination*. Vol. 145: 247 – 255.
- Joseph B., Ramteke P., Thomas G. & Shrivastava N. (2007). Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnol Mol Biol Rev*. Vol. 2 (2): 39 – 48.
- Khire M. (1994). Production of moderately halophilic amylase by newly isolated *Micrococcus* sp. 4 from a salt-pan. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 19 (4): 210 – 212.
- Koneman E. (2001). *Diagnostico microbiológico: texto y atlas color*. 5ta. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Leal J. (2015). Evaluación de la capacidad biodegradadora de materia orgánica de bacterias aisladas de la rizósfera de dos plantas de la ribera del río Combeima – Tramo UT. Tesis de Licenciatura. Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Tolima. Ibagué – Colombia. 102 p.
- Li H., Wang T., Chen F. & Chen X. (2008). Genetic diversity and potential promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biol Biochem*. Vol. 40: 238 – 246.

- Llagas, W. y Guadalupe, E. (2006). Diseño de humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales en la UNMSM. Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG. Ene./Jun., Vol.9, N° 17: 85 – 96.
- Lopardo A. (2016). Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología: Enterobacterias. 1ra Edición. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires - Argentina. 429 p.
- Mabuchi N., Hashizume I. & Araki Y. (2000). Characterization of chitinase excreted by *Bacillus cereus* CH. Canadian Journal of Microbiology. 46 (4): 370 - 375.
- Macfaddin J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Madigan M., Martinko J. & Parker J. (2000). Brock. Biología de los microorganismos. Octava Edición. Prentice Hall. Madrid – España.
- Madigan T., Martinko M. & Parker J. (2006). Biología de los Microorganismos. Décima edición. Editorial Pearson Prentice Hall. España. p. 986.
- Manual de prácticas de laboratorio. Microbiología General. Casa abierta al tiempo. Departamento de Biotecnología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D.F. 78.
- Marilley L. & Aragno M. (1999). Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. Applied Soil Ecology. Vol. 13: 127 – 136.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E. & Marmioli, N. (2005). Evidence of the involvement of plant lingo cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X ray spectroscopy based analysis. Environ. Pollut, 134, 217–227.
- Márquez J. (2007). Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus*

recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una permanente en distintas épocas de muestreo. Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Valdivia, Chile.

Martelo J. & Lara J. (2012). Macrófitas flotantes en el tratamiento de aguas residuales; una revisión del estado del arte. *Rev. Ingeniería y Ciencia*. Vol. 8 (15): 221 – 243.

Mercado J. & Bakker P. (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 92 (4): 367 – 389.

Morales A. & Muñoz M. (2005). Establecimiento de la actividad lipolítica y de las condiciones de crecimiento del microorganismo presente en el fruto de palma maduro para la producción de ácidos grasos. Proyecto de grado para optar el título de Ingeniero de Producción Agroindustrial. Universidad de la sabana.

Mou L., Sullivan J. & Jago R. (1975). Peptidase activities of group N streptococci. *Journal of Dairy Research*. Vol. 42: 147 – 155.

Muratova A., Hübner Th., Tischer S., Turkovskaya O., Möder M. & Kusch P. (2003). Plant – Rhizosphere – Microflora association during phytoremediation of PAH – contaminated soil. *Int. J. Phytoremediat*. Vol. 5: 137 – 151.

Nahlik A. & Mitsch W. (2006). Tropical treatment wetlands dominated by freefloating macrophytes for water quality improvement in costa rica. *Ecological Engineering*, 28(3): 246 – 257.

Naik M. & Dubey S. (2013). Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. S*. Vol. 98: 1 – 7.

- Nicola F. (2010). Curso de Bacteriología Clínica. Col. Bioq. Pcia. Bs. As. Y Univ. Kennedy.
- Olivas, E. (2012). Manual de Prácticas: Laboratorio de Microbiología. Academia de Microbiología y Parasitología. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez. México. 75.
- Olgún, K., (1994). Movement of water, bromide and the pesticides ethoprophos and bentazone in a sandy soil: the Vredepeel data set. *Agricultural water management* 44: 21-42.
- Ortiz A. (2015). Biodepuración de grasas y aceites de efluentes de industria chocolatería, con la microalga *Chlorella vulgaris* empacada en un sistema de flujo continuo, Arequipa – 2015. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Biotecnológica. Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Universidad Católica de Santa María. Arequipa – Perú. 109 p.
- Otárola M., Peña J., Martínez M. & Varela A. (2000). Evaluación de la capacidad degradadora de aceite por bacterias lipolíticas en el lodo residual de la extracción de aceite de palma. *Revista Palmas*. Vol. 21, Número especial, Tomo 1: 283 – 292.
- Pascual M. & Calderón V. (2000). *Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Editorial Díaz de Santos S. A. Madrid – España. 429 p.
- Patiño C. & Sánchez M. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gassipaes* Kunth). *Rev. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol. 10 (2): 177 – 187.

- PELT – ADESU. (2001). Técnicas de reimplante de totora. Proyecto 21.03. Programa de capacitación sobre el manejo de la totora. Puno – Perú. 51 p.
- Peña J. (2006). Aprovechamiento de aceites residuales del proceso de fritura como sustrato para el desarrollo de microorganismos productores de lipasas. Proyecto de grado para optar al título de Ingeniero de producción Agroindustrial. Universidad de la Sabana.
- Peterson S. & Teal J. (1996). The role of plants in ecologically engineered wastewater treatment systems. *Ecological Engineering*. Vol. 6 (1-3): 137 – 148.
- Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar S., Muralikrishna G. & Sreeramulu K. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochemistry*. Vol. 44 (2): 210 – 215.
- Prakash O. & Jaiswal N. (2010). α -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 160 (8): 2401 – 2414.
- Prats G. (2012). *Microbiología y Parasitología Médicas*. Editorial Médica Panamericana.
- Prescott H. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology*. Fifth ed. The McGraw-Hill Companies. 466 p.
- Prescott L. 2004. *Microbiología*. 5a Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid-España.
- Rao M., Tanksale A., Ghatge M. & Deshpande V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Re*. Vol. 62: 597 – 635.
- Reddy S., Nimmagadda A. & Sambasiva R. (2004). An overview of the microbial α -amylase family. *African J. Biotech*. Vol. 3: 182.

- Restrepo G, Marulanda S., de la Fe Y., Díaz A., Baldani L. & Hernández A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. Revista CENIC.. Vol. 46 (1): 63 – 76.
- Rheinheimer G. (1987). Microbiología de las aguas. Editorial Acribia. Zaragoza – España. 298 p.
- Rodríguez H. & Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. Vol. 17 (4-5): 319 – 339.
- Rodríguez Z., Boucourt R., Rodríguez J., Albelo N., Núñez O. & Herrera F. (2006). Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar el almidón. Rev. Cubana de Ciencias Agrícola. Tomo 40 (3).
- Rojas J. (2005). Diversidad bacteriana en el perifiton de raíces de *Eichhornia* sp, *Pistia* sp. y *Azolla* sp en un humedal artificial de la Universidad Earth. Tesis de graduación, Ingeniería en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago – Costar Rica. 139 p.
- Romero J. (2000). Tratamiento de aguas residuales, teoría y principios de diseño. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. Bogotá – Colombia. 1232 p.
- Romero J. (2009). Calidad del agua. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. Bogotá – Colombia. 483 p.
- Ryan K. & Ray G. (2011). Sherris Microbiología Médica. 5ª Edición. Editorial McGraw Hill Interamericana.
- Ryan P., Germaine K., Franks A., Ryan J. & Dowling N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiol Lett. Vol. 278 (1): 1 – 9.
- Saikia R., Singh T., Kuman R., Srivastava J., Srivastava A., Singh K. & Arora D.

- (2003). Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri in chickpea. *Microbiological Research*. Vol. 158 (3): 203 – 213.
- Salgado I., Durán C., Cruz M., Carballo M. & Martínez A. (2012). Bacterias rizosféricas con potencialidades fisiológicas para eliminar materia orgánica de aguas residuales. *Rev. Int. Contam. Ambie.* Vol. 28 (1): 17 - 26.
- Sánchez C., Martín S., Mellado E. & Ventosa A. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 94 (2): 295 – 300.
- Sánchez C., Mejía C., Figueroa C., Esquivia M., Agudelo L. *et al.* (2005). Estudio de cepas nativas amilolíticas. *VITAE Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. Vol. 12 (2): 21 – 28.
- Sánchez J., Valencia H. & Valero N. (2018). Producción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfatos presentes en la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagostis effusa* del páramo El Granizo. Página web: http://bdigital.unal.edu.co/47915/3/9587014812_Part02.PDF. Fecha de revisión: 01 de diciembre del 2018.
- Sánchez T. (1999). Proyecto de Lipasas. Departamento de ingeniería Química de la Universidad de Barcelona. 25 – 39.
- Sandoval M., Celis J. & Junod J. (2005). Recientes aplicaciones de la depuración de aguas residuales con plantas acuáticas. *Theoria*. Vol 14: 17 – 25.
- Saravanakumar D., Vijayakumar C., Kumar N. & Samiyappan R. (2007). PGPR – Induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protection*. Vol. 26 (4): 556 – 565
- Sasson A. (1984). *Las biotecnologías: desafíos y promesas*. Edited by CIB/Unesco. p.

191.

Scott B. (2001). Epichloë endophytes: fungal symbionts of grasses. *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 4 (4): 393 – 398.

Smith R. & Smith T. (2001). *Ecología*. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 642 p.

Snellman A & Colwell R. (2004). *Acinetobacter* lipases: molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. *J and Microbiol Biotechnol*. Vol. 31: 391 – 400.

Tsavkelova A., Cherdyntseva T., Botina S. & Netrusov A. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol Res*. Vol. 162 (1): 69 – 76.

Veesenmeyer L., Hauser R., Lisboa T. & Rello J. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies. *Crit Care Med*. Vol. 37: 1777 - 1786.

Vidal G., Carvalho A., Mendez R. & Lema J. (2000). Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technol*. Vol. 74: 231-239.

Weyens S., Croes J., Dupae L., Van der L. & Carleer J. (2010). Endophytic bacteria improve phytoremediation of Ni and TCE co-contamination. *Environ. Pollut*. Vol. 158: 2422 – 2427.

Xia Y., Kong Y. & Nielsen H. (2007). In situ detection of protein-hydrolysing microorganisms in activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol*. Vol. 60: 156 – 165.

Xu G., Cui S. & Lin X. (2011). Cloning and Heterologous Expression of Pro-2127, a Gene Encoding Cold-active Protease from *Pseudoalteromonas* sp. QI-1. *Adv Polar Sci*, Vol. 2: 124 – 130.

Yadav R., Saxena R., Gupta R. & Davidson S. (1998). Lipases production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Folia Microbiol.* Vol. 43 (4): 373 – 378.

Zimmels Y., Kirzhner F. & Kadmon A. (2009). Effect of circulation and aeration on wastewater treatment by floating aquatic plants. *Separation and Purification Technology.* Vol. 66 (3): 570 – 577.

ANEXOS

Anexo 1. Galería de fotos.



Figura 13. Toma de muestra de las raíces adventicias y rizomas subterráneas de *Schoenoplectus tatora* de los Uros Chulluni y la Reserva Nacional del Titicaca, setiembre - octubre 2017.



Figura 14. Lavado de las raíces adventicias y rizomas subterráneas de la tora y las diluciones, laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre – noviembre 2017.



Figura 15. Medios de cultivo preparadas para la identificación bacteriana, laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre – noviembre 2017.

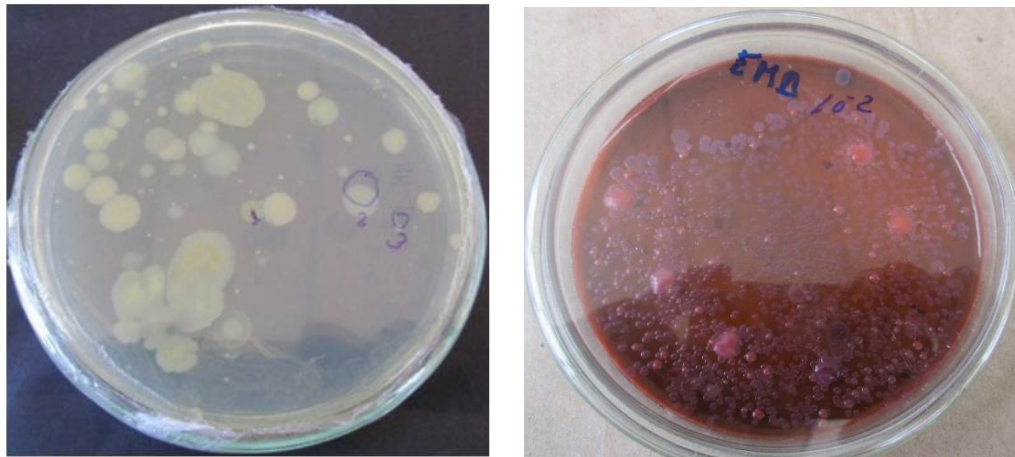


Figura 16. Colonias aisladas en agar Pseudomonas (izquierda) y agar EMB (derecha), laboratorio de Microbiología de los alimentos, durante el mes de setiembre, 2017.



Figura 17. Conservación de géneros aislados en tubo de ensayo con agar Muller Hinton inclinado a 4 °C, laboratorio de Microbiología de los alimentos, setiembre 2017.



Figura 18. Batería de coloración Gram y procesamientos de muestras para la observación de morfología y Gram, laboratorio de Microbiología de los alimentos, setiembre 2017.

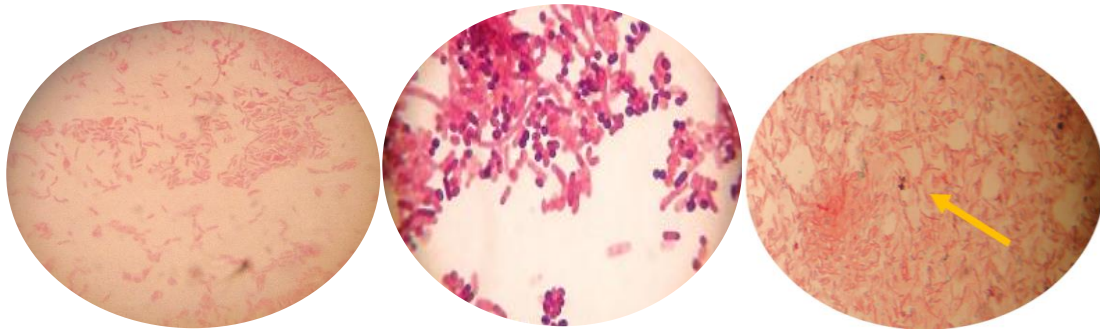


Figura 19. Observación microscópica bacilos Gram negativos (izquierda), bacilos Gram positivos (centro), bacilos con esporas señaladas por la flecha amarilla (derecha), laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre – 2017.



Figura 20. Cultivo de las bacterias en pruebas bioquímicas para su identificación, laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre 2017.

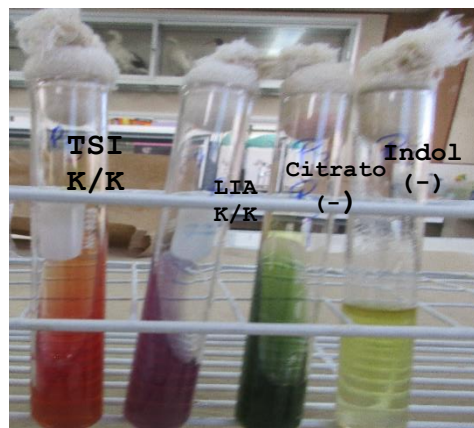


Figura 21. Pruebas bioquímicas de identificación del género *Pseudomonas*, laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre 2017.

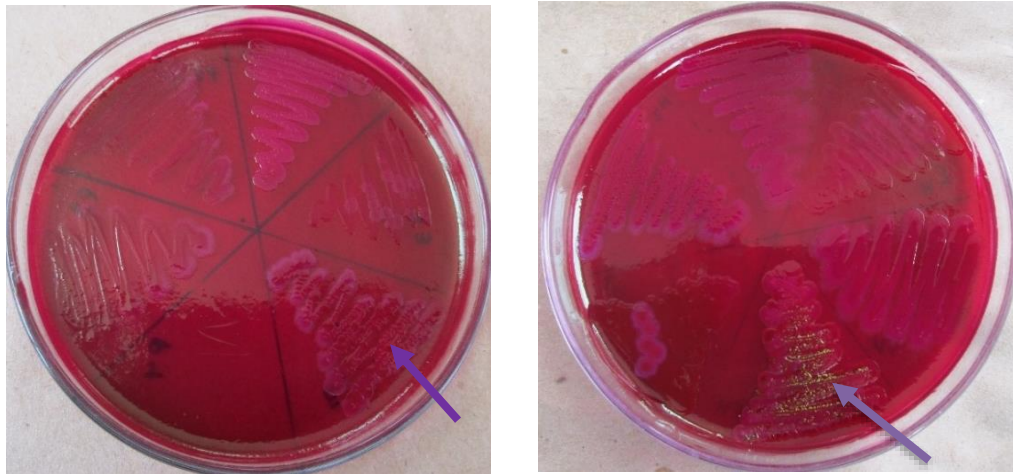


Figura 22. Crecimiento del género *Enterobacter aerogenes* en agar ENDO (izquierda) y *Escherichia coli* (derecha), laboratorio de Microbiología de los alimentos, setiembre 2017.

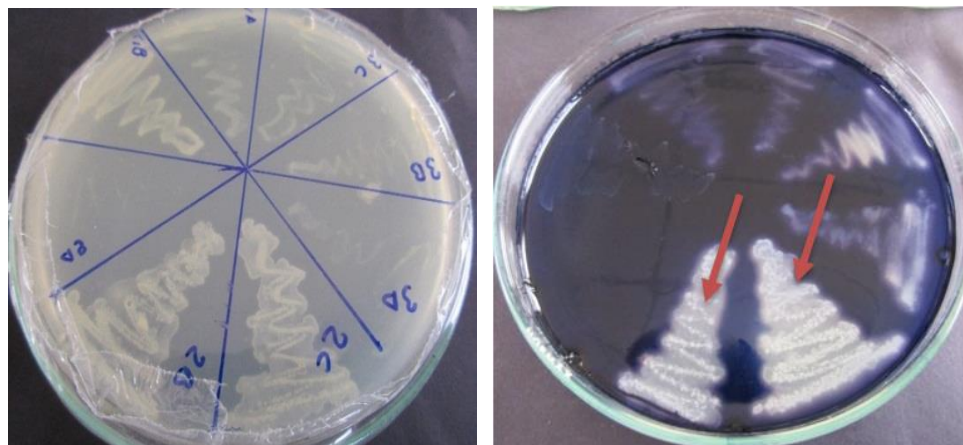


Figura 23. Crecimiento de bacterias en agar almidón (izquierda) y su revelado con lugol en la producción de amilasas (derecha), laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre - 2017.

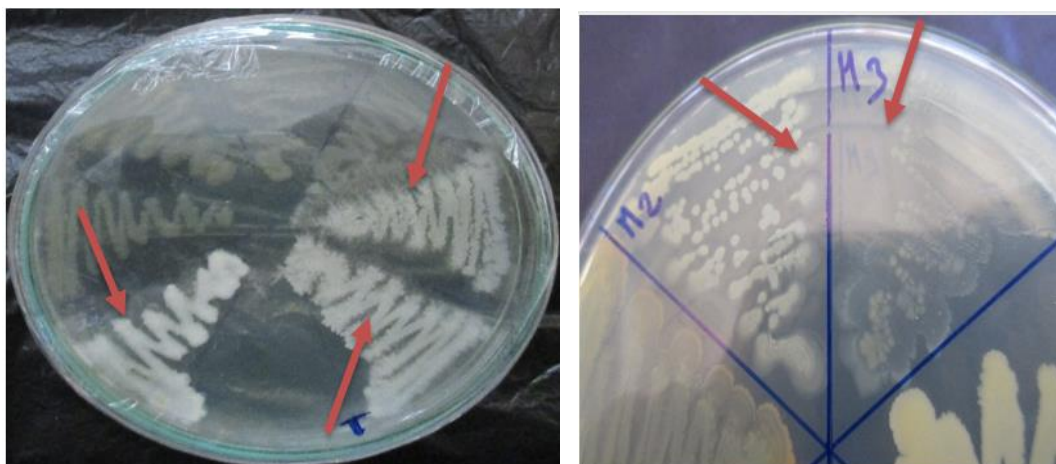


Figura 24. Crecimiento de bacterias en agar Tributirina y zonas de degradación de grasas (flechas rojas), laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre - 2017.



Figura 25. Crecimiento de bacterias en agar caseína y zonas de degradación de la proteína (flechas rojas), laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre - 2017.

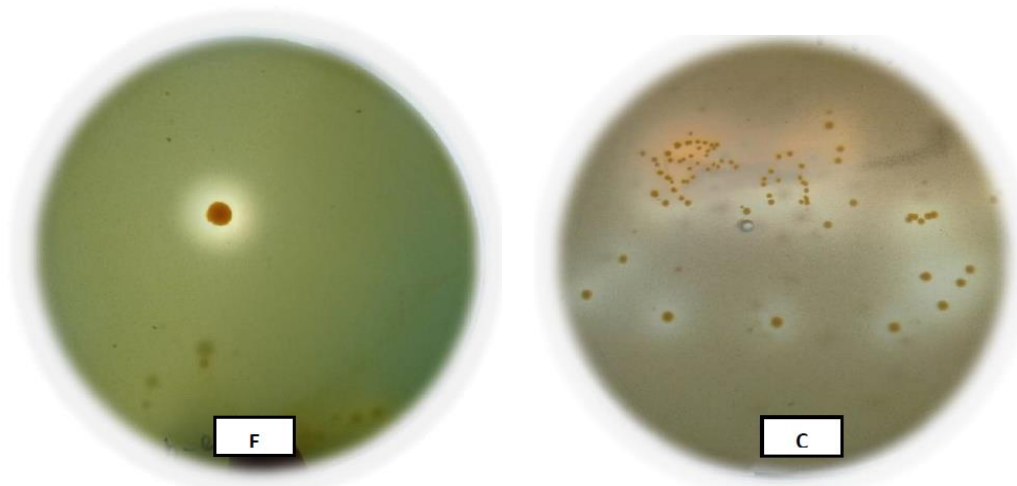
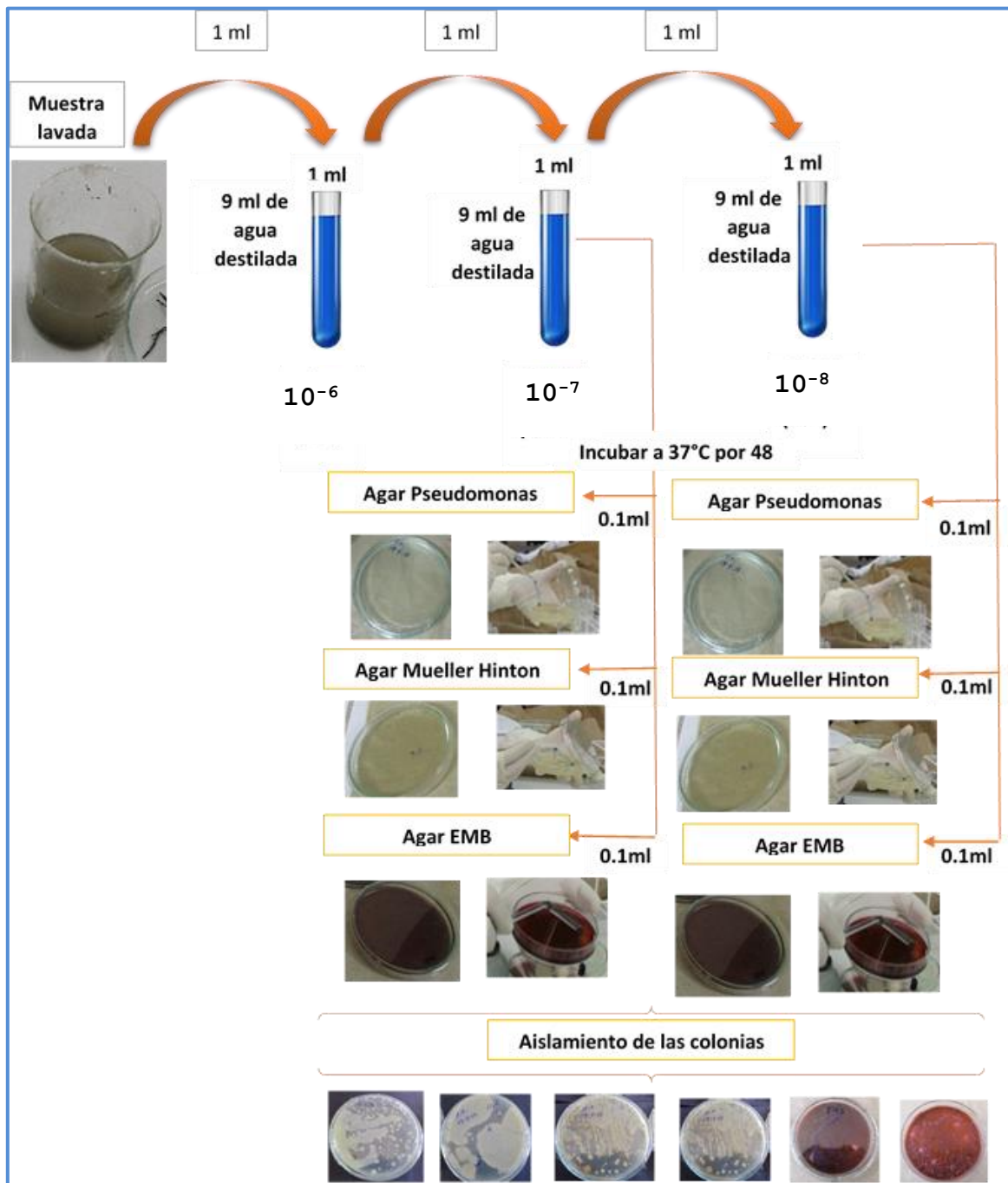


Figura 26. Formación de halos de degradación de almidón (F, izquierda) y de caseína (C, derecha), laboratorio de Microbiología de los alimentos, octubre - 2017.

Anexo 2. Fluxograma para aislar bacterias.



Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

Anexo 3. Pruebas de identificación bioquímica bacteriana.

GRUPO I HIDRÓGENO SULFURADO (H ₂ S) POSITIVO								
ANAEROGÉNICOS (GAS NEGATIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/A	-	- o +	K/K	-	-	-	+	<i>Salmonella typhi</i>
AEROGÉNICOS (GAS POSITIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/A	2+	4+	K/K	-	+	-	+	<i>Salmonella</i>
K/A o A/A	2+	4+	K/K	-	+	-	+	<i>Arizona</i>
K/A o A/A	2+	4+	K/A	-	+	-	+	<i>Citrobacter</i>
K/A o A/A	2+	4+	R/A	- o +	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	2+	4+	K/K	+	-	-	+	<i>Edwardsiella</i>
GRUPO II HIDRÓGENO SULFURADO (H ₂ S) NEGATIVO								
ANAEROGÉNICOS (GAS NEGATIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/A	-	-	K/A	- o +	-	-	-	<i>Shigella</i>
K/A o A/A	-	-	K/K o K/N	+	-	-	V	<i>Escherichia</i>
K/A o A/A	-	-	K/A	- o +	+	D	+ o V	<i>Enterobacter</i>
A/A	-	-	K/K	-	+	-	+ o V	<i>Serratia</i>
K/A	-	-	R/A	+	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	-	-	R/A	+	+		- o +	<i>Providencia</i>
A/A	-	-	A/A o K/A	- o +	-	V	V	<i>Yersinia</i>
AEROGÉNICOS (GAS POSITIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
A/A o K/A	2+	-	K/K o K/A	+	-	-	V	<i>Escherichia</i>
A/A	4+	-	K/K	- o +	+	+	-	<i>Klebsiella</i>
A/A o K/A	3+	-	K/K o K/A	-	+	D	+ o V	<i>Enterobacter</i>
K/A o A/A	2+	-	K/K	-	+	-	+ o V	<i>Serratia</i>
K/A	+	-	K/A o R/A	+	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	+	-	K/A o A/A	-	+	-	V	<i>Paratyphi A.</i>
NO FERMENTADORES								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/K o K/N	-	-	K/A	-	+	-	+	<i>Pseudomonas</i>

Tabla de identificación de Enterobacterias

Microorganismos	Fermentación de Lactosa	Producción de Gas (glucosa)	Producción de H ₂ S (TSD)	Lisina Descarboxilasa	Lisina Desaminasa	Producción de Indol	Ornitina Descarboxilasa	Motilidad	Utilización del Cítrato	Voges-Proskauer	Ureasa	Gelatinasa
<i>Citrobacter freundii</i>	V	+	V	-	-	-	V	+	+	-	V	-
<i>Citrobacter diversus</i>	V	+	-	-	-	+	+	+	+	-	V	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	V	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	-	+	V	+	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	-	+	-	+	-	-	V	V	-	V	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Morganella morganii</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	V	V	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	V	+	-	+	+	-	+	V	-	+	+
<i>Providencia alcalifaciens</i>	-	V	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>Providencia stuartii</i>	-	-	-	-	+	+	-	V	+	-	V	-
<i>Salmonella spp</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	V	-	+	-	-	+	+	+	+	V	+
<i>Shigella spp</i>	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Yersenia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	V	+	-	-	-	V	-
<i>Yersenia pestis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersenia pseudotuberculosis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

(+) 90% de aislamientos positivos; (-) 90% de aislamientos negativos; (v) reacción variable

Anexo 4. Resultados de los análisis estadísticos.

Nueva tabla : 24/12/2018 - 14:11:30 - [Versión : 02/03/2018]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RECUELTOS	30	0.47	0.38	28.89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	47685.53	4	11921.38	5.44	0.0027
BACTERIAS	47685.53	4	11921.38	5.44	0.0027
Error	54819.17	25	2192.77		
Total	102504.70	29			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=79.40000

Error: 2192.7667 gl: 25

BACTERIAS	Medias	n	E.E.
E. cloacae	206.50	6	19.12 A
E. aerogenes	192.50	6	19.12 A
Ps. fluorescens	177.33	6	19.12 A
Ps. aeruginosa	136.67	6	19.12 A B
B. subtilis	97.50	6	19.12 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RECUELTOS	30	0.22	0.19	32.96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22577.63	1	22577.63	7.91	0.0089
ZONAS	22577.63	1	22577.63	7.91	0.0089
Error	79927.07	28	2854.54		
Total	102504.70	29			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=39.96258

Error: 2854.5381 gl: 28

ZONAS	Medias	n	E.E.
Urus Chulluni	189.53	15	13.80 A
RNT	134.67	15	13.80 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RECUELTOS	4	0.74	0.61	11.09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	961.00	1	961.00	5.70	0.1396
ZONAS	961.00	1	961.00	5.70	0.1396
Error	337.00	2	168.50		
Total	1298.00	3			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=55.80365

Error: 168.5000 gl: 2

ZONAS	Medias	n	E.E.
Urus Chulluni	132.50	2	9.18 A
RNT	101.50	2	9.18 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RECUELTOS	6	0.21	0.01	13.37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.35	1	0.35	1.04	0.3657
ZONAS	0.35	1	0.35	1.04	0.3657
Error	1.35	4	0.34		
Total	1.70	5			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.31647

Error: 0.3372 gl: 4

ZONAS	Medias	n	E.E.
Urus Chulluni	4.59	3	0.34 A
RNT	4.10	3	0.34 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

NÚMERO DE COLONIAS	20	0.18	0.00	24.69
--------------------	----	------	------	-------

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3195.70	4	798.93	0.85	0.5165
BACTERIAS	3195.70	4	798.93	0.85	0.5165
Error	14128.50	15	941.90		
Total	17324.20	19			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=67.01223

Error: 941.9000 gl: 15

BACTERIAS	Medias	n	E.E.
Ps. aeruginosa	136.25	4	15.35 A
Ps. fluorescens	132.75	4	15.35 A
E. aerogenes	128.50	4	15.35 A
E. cloacae	123.50	4	15.35 A
B. subtilis	100.50	4	15.35 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NÚMERO DE COLONIAS	20	0.49	0.46	17.91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8405.00	1	8405.00	16.96	0.0006
ZONAS DE MUESTREO	8405.00	1	8405.00	16.96	0.0006
Error	8919.20	18	495.51		
Total	17324.20	19			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=20.91470

Error: 495.5111 gl: 18

ZONAS DE MUESTREO	Medias	n	E.E.
Urus Chulluni	144.80	10	7.04 A
RNT	103.80	10	7.04 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RECUELTOS	30	0.84	0.82	17.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	24.94	4	6.23	33.50	<0.0001
BACTERIAS	24.94	4	6.23	33.50	<0.0001
Error	4.65	25	0.19		
Total	29.59	29			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.73147

Error: 0.1861 gl: 25

BACTERIAS	Medias	n	E.E.	
B. subtilis	3.90	6	0.18	A
E. cloacae	3.01	6	0.18	B
E. aerogenes	2.65	6	0.18	B
Ps. aeruginosa	1.65	6	0.18	C
Ps. fluorescens	1.41	6	0.18	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RECUELTOS	30	3.4E-04	0.00	40.71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.01	1	0.01	0.01	0.9229
ZONAS	0.01	1	0.01	0.01	0.9229
Error	29.58	28	1.06		
Total	29.59	29			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.76881

Error: 1.0565 gl: 28

ZONAS	Medias	n	E.E.	
RNT	2.54	15	0.27	A
Urus Chulluni	2.51	15	0.27	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NÚMERO DE COLONIAS	20	0.71	0.63	30.55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	118915.70	4	29728.93	9.15	0.0006
BACTERIAS	118915.70	4	29728.93	9.15	0.0006
Error	48735.25	15	3249.02		
Total	167650.95	19			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=124.45938

Error: 3249.0167 gl: 15

BACTERIAS	Medias	n	E.E.	
Ps. aeruginosa	242.25	4	28.50	A
E. aerogenes	237.50	4	28.50	A
E. cloacae	233.00	4	28.50	A
Ps. fluorescens	181.25	4	28.50	A
B. subtilis	38.75	4	28.50	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NÚMERO DE COLONIAS	20	0.20	0.15	46.35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	33048.45	1	33048.45	4.42	0.0499
ZONAS DE MUESTREO	33048.45	1	33048.45	4.42	0.0499
Error	134602.50	18	7477.92		
Total	167650.95	19			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=81.24848

Error: 7477.9167 gl: 18

ZONAS DE MUESTREO	Medias	n	E.E.
Urus Chulluni	227.20	10	27.35 A
RNT	145.90	10	27.35 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RECUEENTOS	30	0.98	0.98	6.51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	88.59	4	22.15	408.83	<0.0001
BACTERIAS	88.59	4	22.15	408.83	<0.0001
Error	1.35	25	0.05		
Total	89.94	29			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.39465

Error: 0.0542 gl: 25

BACTERIAS	Medias	n	E.E.
Ps. fluorescens	5.66	6	0.10 A
Ps. aeruginosa	5.65	6	0.10 A
E. cloacae	2.48	6	0.10 B
E. aerogenes	2.42	6	0.10 B
B. subtilis	1.67	6	0.10 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RECUEENTOS	30	1.3E-03	0.00	50.11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.12	1	0.12	0.04	0.8502
ZONAS	0.12	1	0.12	0.04	0.8502
Error	89.83	28	3.21		
Total	89.94	29			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.33971

Error: 3.2081 gl: 28

ZONAS	Medias	n	E.E.
RNT	3.64	15	0.46 A
Urus Chulluni	3.51	15	0.46 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 5. Constancia de ejecución de tesis en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE, JEFE DEL LABORATORIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA – PUNO.

HACE CONSTAR:

Que la bachiller: LISBETH MARQUEZ QUISPE, egresado de la escuela profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, ha realizado su trabajo de investigación titulado “ **CAPACIDAD DEGRADATIVA in vitro DE AZÚCARES, GRASAS Y PROTEÍNAS POR BACTERIAS Pseudomonas, Bacillus y Enterobacter DE LA RIZÓSFERA DE Schoenoplectus tatora DEL LAGO TITICACA, 2017**” en el laboratorio de microbiología de los alimentos de la escuela profesional de biología, entre los meses de setiembre a noviembre del 2017.

Se emite la presente constancia a la solicitud del interesado para los fines que se estime por conveniencia.

Puno, 30 de diciembre del 2017.



EVA LAURA CHAUCA DE MEZA

JEFE DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS