

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

**CAPACIDAD HIDROLÍTICA DE *Pseudomonas* sp. AISLADAS DE LA
RIZÓSFERA DE *Typha dominguensis* DEL HUMEDAL LUCRE –
HUACARPAY – QUISPICANCHI - CUSCO**

PRESENTADO POR:

Br. ROSMERY HEJDI CARTAGENA TURPO

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO**

ASESORA:

Mg. ELSA GLADYS AGUILAR ANCORI

CUSCO - PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesora** del trabajo de investigación/tesis titulada:

CAPACIDAD HIDROLÍTICA DE *Pseudomonas sp.* AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE *Typha dominguensis* DEL HUMEDAL LUCRE – HUACARPAY – QUISPICANCHI – CUSCO

Presentado por: **Rosmery Hejdi Cartagena Turpo** con DNI Nro **73640887** para optar el título profesional BIÓLOGO.


Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 02 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 5%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico otítulo profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesora, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** las primeras páginas del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 13 de diciembre de 2024


.....
MSc. Elsa Gladys Aguilar Ancori
Nro. de DNI 23859957
ORCID 0000-0002-8942-8868

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio:

<https://unsaac.turnitin.com/viewer/submissions/oid:27259:416010202?locale=es-MX>

Rosmery Hejdi Cartagena Turpo

CAPACIDAD HIDROLÍTICA DE Pseudomonas sp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE Typha dominguensis DEL HUMEDAL

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:416010202

Fecha de entrega

13 dic 2024, 8:34 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

13 dic 2024, 8:40 p.m. GMT-5

Nombre de archivo

CAPACIDAD HIDROLÍTICA DE Pseudomonas sp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE Typha domingue....docx

Tamaño de archivo

41.1 MB

145 Páginas

28,575 Palabras

161,930 Caracteres




5% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe



- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Texto mencionado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 4%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 3%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
252 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.
-  **Texto oculto**
259 caracteres sospechosos en N.º de páginas
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

A Dios, el creador de todo el universo, dueño de mi vida y mi salvador. Cada prueba que viví fue una bendición en él, quien fue mi refugio en mis tristezas y alegrías, él que me anima, él que me sustenta, él que me ama. Por su gran amor y misericordia, llegué a esta etapa de mi vida, su voz que guía mi vida, y calidez en las personas que puso a mi alrededor mis amigos, mis profesores, y mi familia, a él todo le debo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar a mi Señor, porque por el es todo lo que tengo.

A mi familia, mi querida mamita, quien constantemente me impulsó, todas sus palabras y apoyo constante, ella es un ejemplo y una bendición en mi vida. A mi papá que, gracias a su amor incondicional, pude seguir avanzando. A mi querida hermana Melisa, quien fue mi compañera y amiga, mi cómplice, quien me animó siempre.

A mi querida profesora y asesora Mgt. Elsa Gladys Aguilar Ancori, por su disposición, paciencia, y total apoyo durante el desarrollo de la investigación y durante mi carrera universitaria a través del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Biomedicina de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, donde adquirí muchas experiencias que fortalecieron mi formación académica y pase buenos momentos. Ella es una segunda madre, de quien aprendo y aprecio mucho. Gracias por cada uno de sus consejos, por llamarme temprano, porque cuando a veces siento que me rindo, sus llamadas, su dedicación en que pueda terminar este trabajo, me animaron para seguir adelante. Muchas gracias profesora Elsa, la aprecio mucho y gracias por todo.

A Mgt. Marishani Marin Carrasco por su disposición en ayudarme y orientarme incondicionalmente, sus aportes brindados fortalecieron mi trabajo de investigación, y me enseñó que siempre se puede ayudar y dar el tiempo para otros, gracias por su disposición.

A los integrantes del laboratorio Institucional de Microbiología e Inmunología (LIMI) por su amistad y apoyo en realizar este trabajo, gracias por todas las experiencias compartidas.

A mis mejores amigas: Mila, Paty, Doris y Blanca por todos los consejos, exigencias, y porque siempre me impulsan a cumplir mis metas, por su amistad que es un regalo de Dios, quienes siempre estuvieron presentes, con quienes disfruto mucho.

ÍNDICE

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	II
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	III
JUSTIFICACIÓN	IV
OBJETIVOS	V
HIPOTESIS.....	VI
VARIABLES	VII
OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	VIII
CAPÍTULO I MARCO TEORICO.	1
1.1 ANTECEDENTES	1
1.1.1 Antecedentes internacionales	1
1.1.2 Antecedentes nacionales.....	2
1.1.3 Antecedentes locales	3
1.2 GENERALIDADES.....	4
1.2.1 <i>Typha dominguensis</i>	4
1.2.1.1 Importancia de <i>Typha dominguensis</i> en biorremediación de aguas residuales y de lixiviados	7
1.2.2 Bacterias de la rizósfera	8
1.2.2.1 Bacterias rizosféricas implicadas en procesos de biorremediación....	10
1.2.3 Género <i>Pseudomonas</i>	13
1.2.3.1 Historia y taxonomía del género <i>Pseudomonas</i>	13
1.2.4 Metabolismo del género <i>Pseudomonas</i>	15
1.2.4.1 Metabolismo de <i>Pseudomonas</i> en carbohidratos	16
1.2.4.1.1 Amilasa.....	18
1.2.4.2 Metabolismo de <i>Pseudomonas</i> en lípidos	18
1.2.4.2.1 Lipasas	19
1.2.4.3 Metabolismo de <i>Pseudomonas</i> en proteínas	20
1.2.4.3.1 Gelatinasa	21
1.2.4.3.2 Caseinasa	22
1.2.4.4 Metabolismo de <i>Pseudomonas</i> en DNA y esculina	22

1.2.4.4.1	DNasa	22
1.2.4.4.2	Esculinasa	23
1.2.5	Especies de <i>Pseudomonas</i> sp. de importancia ambiental.....	23
1.2.5.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	23
1.2.5.2	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	24
1.2.6	Relación de <i>Pseudomonas</i> con plantas.....	25
1.2.6.1	Importancia biotecnológica de <i>Pseudomonas</i>	25
1.2.7	Gen rRNA 16S	27
1.2.8	Secuenciación por Sanger	28
2	CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1	ÁREA DE ESTUDIO.....	29
2.2	MATERIALES.....	36
2.2.1	Material biológico	36
2.2.2	Material de laboratorio	36
2.2.2.1	Equipos.....	36
2.2.2.2	Reactivos	36
2.2.2.3	Medios de cultivo	37
2.2.2.4	Materiales de vidrio.....	38
2.2.2.5	Otros materiales de laboratorio	38
2.3	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	40
2.4	CAPACIDAD HIDROLÍTICA DE <i>Pseudomonas</i> sp. DE LA RIZÓSFERA DE <i>Typha dominguensis</i> DEL HUMEDAL LUCRE – HUACARPAY – QUISPICANCHI - CUSCO	40
2.5	MÉTODOS.....	41
2.5.1	Muestreo de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	41
2.5.2	Aislamiento de <i>Pseudomonas</i> sp. de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	41
2.5.3	Observación de las características de la cepa ATCC 13525 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	41
2.5.4	Caracterización de <i>Pseudomonas</i> sp. por pruebas bioquímicas	42
2.5.4.1	Oxidasa.....	43
2.5.4.2	Oxidación / Fermentación (OxFerm)	43

2.5.4.3	Reducción de nitratos	44
2.5.4.4	Crecimiento bacteriano a 42 °C	45
2.5.4.5	Triple azúcar hierro (TSI).....	45
2.5.4.6	Lisina Hierro Agar (LIA)	45
2.5.4.7	Citrato de Simmons	45
2.5.4.8	Motilidad, Ornitina e Indol.....	46
2.5.4.9	Urea	46
2.5.4.10	Rojo de metilo y Voges Proskauer	46
2.5.5	Determinación de la capacidad hidrolítica	46
2.5.5.1	Hidrólisis de almidón	46
2.5.5.2	Producción de proteasas	47
2.5.5.2.1	Hidrólisis de la caseína	47
2.5.5.2.2	Hidrólisis de la gelatina	47
2.5.5.3	Producción de lipasas	48
2.5.5.3.1	Hidrólisis del tween 20	48
2.5.5.3.2	Hidrólisis del tween 80	49
2.5.5.4	Hidrólisis de otros compuestos.....	49
2.5.5.4.1	Hidrólisis de esculina.....	49
2.5.5.4.2	Hidrólisis de DNA	50
2.5.6	Secuenciamiento del gen rRNA 16S	50
3	CAPÍTULO III RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	51
3.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PUNTOS DE COLECTA DE LAS ESPECIES DE <i>Pseudomonas</i> sp. AISLADAS DE LA RAÍZ DE <i>Typha dominguensis</i>	51
3.2	CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA ATCC 13525 <i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	56
3.3	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS COLONIAS DE LAS CEPAS DE <i>Pseudomonas</i> sp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE <i>Typha dominguensis</i>	57
3.4	CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO <i>Pseudomonas</i> AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE <i>Typha</i> <i>dominguensis</i> MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS	57

3.5	PRUEBAS HIDROLÍTICAS DE <i>Pseudomonas</i> AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE <i>Typha dominguensis</i> DEL HUMEDAL LUCRE – HUACARPAY – QUISPICANCHI - CUSCO	60
3.5.1	Hidrólisis de almidón de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.....	60
3.5.2	Hidrólisis de caseína y gelatina de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> del humedal Lucre - Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.....	62
3.5.3	Hidrólisis de tween 20 y tween 80 de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.....	67
3.5.4	Hidrólisis esculina y DNA de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.....	70
3.6	ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD HIDROLÍTICA DE LAS 33 CEPAS DE <i>Pseudomonas</i> AISLADAS DE LA RIZÓSFERA <i>Typha dominguensis</i> DEL HUMEDAL LUCRE – HUACARPAY – QUISPICANCHI - CUSCO	73
3.7	RELACIÓN ENTRE EL PUNTO DE MUESTREO Y LA CAPACIDAD HIDROLÍTICA DE <i>Pseudomonas</i> AISLADA DE LA RIZÓSFERA DE <i>Typha dominguensis</i> DEL HUMEDAL LUCRE – HUACARPAY – QUISPICANCHI - CUSCO	76
3.8	SECUENCIAMIENTO DEL GEN rRNA 16S, DE LAS CEPAS DE <i>Pseudomonas</i> CON MAYORES CAPACIDADES HIDROLÍTICAS.....	78
	CONCLUSIONES	81
	RECOMENDACIONES.....	82
	BIBLIOGRAFÍA	83
	ANEXOS	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Operacionalización de variables	VIII
Tabla 2.	Antecedentes de <i>Pseudomonas</i> sp. rizosféricas empleadas en aplicaciones biotecnológicas.....	27
Tabla 3.	Revisión bibliográfica de las relaciones planta-microorganismo y sus beneficios	11
Tabla 4.	Flora de la vegetación emergente y flotante del espejo de agua de Waton	33
Tabla 5.	Coordenadas geográficas de los puntos de colecta de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	34
Tabla 6.	Composición del medio Hugh Leifson	43
Tabla 7.	Composición de caldo nitrato	44
Tabla 8.	Composición medio agar tween 20.....	48
Tabla 9.	Composición medio agar tween 80.....	49
Tabla 10.	Características de los puntos de colecta de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> del humedal Lucre – Huacarpay-Quispicanchi-Cusco.....	52
Tabla 11.	Cepas de <i>Pseudomonas</i> aisladas según la época de muestreo de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> del humedal Lucre – Huacarpay-Quispicanchi-Cusco.	53
Tabla 12.	Características bioquímicas de la cepa <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525.....	56
Tabla 13.	Características morfológicas de las colonias de las cepas de <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	57
Tabla 14.	Pruebas bioquímicas de <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.....	59
Tabla 15.	Hidrólisis de almidón de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	60
Tabla 16.	Hidrólisis de caseína y gelatina de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	63
Tabla 17.	Hidrólisis de tween 20 y tween 80 de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	67
Tabla 18.	Hidrólisis esculina y DNA de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	70
Tabla 19.	Capacidad hidrolítica de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> del humedal Lucre – Huacarpay-Quispicanchi-Cusco.....	74

Tabla 20. Relación de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> con los puntos de colecta	76
Tabla 21. Resultados del secuenciamiento del gen rRNA 16S de las cepas de <i>Pseudomonas</i> seleccionadas	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólisis de un triglicérido	20
Figura 2. Actividad hidrolítica de la enzima gelatinasa	22
Figura 3. Características botánicas de <i>Typha dominguensis</i>	6
Figura 4. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	9
Figura 5. Mapa base del humedal Lucre - Huacarpay	30
Figura 6. Espejo de agua de Waton del humedal Lucre - Huacarpay	31
Figura 7. Observatorio del humedal Lucre - Huacarpay	31
Figura 8. Mapa de los puntos de colecta de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco	35
Figura 9. Cepas de <i>Pseudomonas</i> aisladas según el punto de colecta de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> del humedal Lucre – Huacarpay - Quispicanchi - Cusco.	54
Figura 10. Colecta de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i> del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.	55
Figura 11. Capacidad hidrolítica de almidón de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	61
Figura 12. Hidrólisis de almidón de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	62
Figura 13. Capacidad hidrolítica de caseína y gelatina de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	65
Figura 14. Pruebas de hidrólisis de caseína y gelatina de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	66
Figura 15. Capacidad hidrolítica de tween 20 y tween 80 en <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	68
Figura 16. Prueba de hidrólisis de tween 20 y tween 80 de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	69
Figura 17. Capacidad hidrolítica de esculina y DNA de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	71
Figura 18. Prueba de hidrólisis de esculina y DNA de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	72
Figura 19. Capacidad hidrolítica de almidón, proteínas, lípidos y otros compuestos de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizósfera de <i>Typha dominguensis</i>	75

RESUMEN

Las bacterias rizosféricas en la actualidad tienen gran importancia biotecnológica, como la biorremediación de aguas residuales, debido a las interacciones benéficas con la planta que se relaciona, producen sustancias químicas como fitohormonas, enzimas, metabolitos que ayudan al crecimiento vegetal, por ello buscar bacterias rizosféricas con capacidad hidrolítica, para el tratamiento de aguas residuales, removiendo la materia orgánica y sus contaminantes es esencial, *Pseudomonas* sp. ha sido estudiada por la variabilidad metabólica que posee, mientras que *Typha dominguensis* es empleada en procesos de fitorremediación de aguas residuales. Por ello en el presente estudio se tuvo como objetivo, aislar *Pseudomonas* sp. de la rizósfera de *Typha dominguensis*, del humedal Lucre - Huacarpay, Quispicanchi, Cusco. El aislamiento y caracterización de *Pseudomonas*, se realizó utilizando agar cetrimide y pruebas bioquímicas, logrando aislar 33 cepas de *Pseudomonas* sp. de la rizósfera de *Typha dominguensis*. En la metodología, se identificó a 8 *Pseudomonas fluorescens*, 1 *Pseudomonas oryzihabitans*, 3 *Pseudomonas luteola*, y 21 *Pseudomonas* sp. Se evaluó la capacidad hidrolítica utilizando medios de cultivo específicos, el 9% hidroliza almidón, 76% gelatina, 61% caseína, 61% a tween 20, 33% a tween 80, 15% a esculina y 21% a DNA. Seis cepas de *Pseudomonas* mostraron mayor capacidad hidrolítica, siendo capaces de hidrolizar 4 a 6 sustratos diferentes de un total de 7 y son LH1Ps-15 (*Pseudomonas* sp.), LH1Ps-16 (*P. luteola*), LH2Ps-20 (*P. fluorescens*), LH2Ps-22 (*Pseudomonas* sp.), LH2Ps-27 (*Pseudomonas* sp.) y LH2Ps-31 (*P. fluorescens*). Dos cepas fueron identificadas por secuenciamiento del gen parcial rRNA 16S, estas fueron seleccionadas de acuerdo a la temporalidad y punto de muestreo, LH2Ps-27 a *Pseudomonas nitroreducens* y LH2Ps-22 a *Pseudomonas* sp. Estas cepas pueden ser candidatas para usos en biorremediación, como en la remoción de materia orgánica de aguas residuales.

Palabras clave:

Biorremediación, rizósfera, hidrólisis, humedal, *Pseudomonas*

INTRODUCCIÓN

Las bacterias rizosféricas tienen gran importancia, debido a que son estudiadas por la diversidad de beneficios que produce en la planta, ayudando a la asimilación de nutrientes (Ona, 2021), reducción u oxidación de iones metálicos, nitrificación, desnitrificación, reducción de sulfato, metanogénesis y flujo de energía (Srivastava, 2017). Por lo tanto, las bacterias rizosféricas están relacionadas con la capacidad de biorremediación de la planta (Velasco *et al.*, 2020).

El uso de microorganismos rizosféricos, pueden ser utilizados como biofertilizantes (Ona, 2021), biorremediadores de suelos contaminados (Almazan, 2024), biorremediadores de aguas residuales, participando en la eliminación de materia orgánica (Salgado *et al.*, 2012a; Miovich & Porras, 2021), ya que no afectan al medio ambiente y garantizan una producción libre de productos químicos, evitando su degradación (Ona, 2021). También participan en la reducción de nitratos (Yu guanlong *et al.*, 2019) y producción de enzimas hidrolíticas en la industria de alimentos (Del Moral *et al.*, 2015). Por ello encontrar bacterias rizosféricas con capacidad hidrolítica que degraden diferentes compuestos, es fundamental para desarrollar nuevas tecnologías que ayuden a la solución de los problemas ambientales.

En el presente estudio, se aisló *Pseudomonas* sp. en la raíz de *Typha dominguensis* para la caracterización por pruebas bioquímicas e hidrolíticas a diferentes sustratos como: carbohidrato (almidón), proteínas (caseína y gelatina), lípidos (tween 20 y tween 80) y otros compuestos (esculina y DNA). Finalmente, la identificación por secuenciación del gen rRNA 16S, a las cepas de *Pseudomonas* que presentaron mayor capacidad hidrolítica. Los cuales podrían ser candidatos para tratamientos de biorremediación de aguas contaminadas o lixiviados.

Motivo por el cual se ha planteado la investigación para determinar la capacidad hidrolítica de *Pseudomonas* sp. aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre - Huacarpay, Quispicanchi, Cusco. Para su probable aplicación en nuevas tecnologías y brindar solución de los problemas medioambientales como en la biorremediación de aguas residuales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen diversas industrias que, según su producción como la industria de curtiembres y de textiles, emiten altas concentraciones de toxicidad, y elevada carga orgánica (Jacome *et al.*, 2021; Ramírez, 2023). Destacando la industria textil donde los contaminantes orgánicos, poseen bajo porcentaje de biodegradabilidad y los tratamientos convencionales como filtración, adsorción o coagulación, tienen baja eficiencia en la remoción y disminución de contaminantes de aguas residuales (Almansba *et al.*, 2021). Las pequeñas empresas como restaurantes, pollerías y otros negocios que vierten residuos de aceite usado de cocina o aceite de coches, además de causar daños a las tuberías de alcantarillado, también causan daños a los sistemas de tratamiento convencional, estas grasas modifican su viscosidad al enfriarse, adhiriéndose a las paredes de las tuberías, evitando la fluidez del agua y formando tapones (Ayquipa, 2021; Gonzales, 2023). Por esta razón la búsqueda de nuevas tecnologías, que ayuden a la limpieza y remoción de contaminantes de aguas residuales van en aumento, debido al crecimiento poblacional y crecimiento industrial (Jacome *et al.*, 2021), así como también las normativas son cada vez más exigentes, como el decreto DS N°021-2009–VIVIENDA, que controla la descarga de aguas residuales no domesticas en el sistema de alcantarillado, estos no deben exceder los valores máximos admisibles (VMA), que pueden dañar la estructura y el sistema de alcantarillado (MVCS, 2019).

La búsqueda de *Pseudomonas* sp. ambientales y nativas, que no alteren el medio ambiente, son útiles en la aplicación de procesos de biotecnología y biorremediación. Los reportes de estas bacterias son genéricos, se desconocen las especies de *Pseudomonas*, que poseen mayor capacidad hidrolítica de compuestos orgánicos e inorgánicos.

Por ello se plantea la siguiente pregunta:

¿*Pseudomonas* sp. aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* poseen capacidad hidrolítica en el almidón, caseína, gelatina, tween 20, tween 80, esculina y DNA?

JUSTIFICACIÓN

El DS N°021-2009–VIVIENDA, controla la descarga de aguas residuales al alcantarillado de todos los usuarios como negocios de alimentos, producción y hoteles con el fin de evitar daños al sistema de tuberías. En la actualidad ningún comercio da el tratamiento que requiere (Gonzales, 2023). La ONU en la agenda 2030, ha fijado el objetivo 12, que trata sobre la producción y consumo sostenible de los recursos naturales, e incita a la búsqueda de soluciones biotecnológicas (ONU 2015). Por ello encontrar soluciones a los problemas de contaminación de aguas residuales, mediante el uso de nuevas tecnologías que sean sostenibles y amigables con el medio ambiente, son trascendentes (Jacome *et al.*, 2021).

Typha dominguensis, tiene aplicaciones en biorremediación de aguas residuales y de lixiviados (Torres, 2017; Muñoz & Vásquez, 2020). La capacidad metabólica de las rizobacterias tiene una estrecha relación con la capacidad fitorremediadora de las plantas (Srivastava, 2017), y por lo tanto las rizobacterias de las plantas han cobrado importancia en diferentes estudios (Ona, 2021), ya que son eficientes en fijar el nitrógeno, remoción de metales pesados, promotoras de crecimiento, síntesis de fitohormonas y productoras de diferentes metabolitos (Velasco *et al.* 2020). Por ello la búsqueda de *Pseudomonas* sp. nativas (de la zona afectada) que provengan de la rizósfera de *Typha dominguensis* es de gran importancia ambiental, esta bacteria ha demostrado tener una gran variedad metabólica, que le permite jugar un papel fundamental en diversos ambientes (Álvarez *et al.*, 2020), capacidad de degradar hidrocarburos y sus derivados como el plástico, solubilizar el fosfato, fijación biológica del nitrógeno y resistencia a metales pesados como mercurio (Paternina *et al.*, 2017), es estable en condiciones de estrés, tiene facilidad de cultivo, rápido crecimiento y son degradadoras de diferentes sustancias (Miovich & Porras, 2021). Todo ello le hace una excelente candidata, para degradar carbohidratos, proteínas y lípidos que se encuentran presentes en aguas residuales. La capacidad hidrolítica de *Pseudomonas* es observada en la metodología empleada, mediante el cultivo en placas Petri, usando medios de cultivo específicos para diferentes sustratos como almidón, caseína, gelatina, tween 20, tween 80, esculina y DNA. Contribuyendo así al conocimiento de especies de *Pseudomonas*, con mayor capacidad hidrolítica y las especies de *Pseudomonas* que se encuentran en la rizósfera de *Typha dominguensis*, que pueden ser empleadas en tratamientos de aguas contaminadas, y ayuden a una economía circular que promueve la sostenibilidad y el rediseño de productos más amigables con el medio ambiente (Raudales *et al.*, 2024).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad hidrolítica de *Pseudomonas* sp. aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar *Pseudomonas* sp. de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.
2. Determinar las capacidades hidrolíticas de *Pseudomonas* sp. en almidón, caseína, gelatina, tween 20, tween 80, esculina y DNA.
3. Secuenciar el gen rRNA 16S de las cepas de *Pseudomonas* sp. con mayor capacidad hidrolítica para su identificación.

HIPOTESIS

Las cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco, presentan una alta capacidad hidrolítica, lo que les permite descomponer compuestos orgánicos complejos como almidón, caseína, gelatina, tween 20, tween 80, esculina y DNA.

VARIABLES

Variables Dependientes

- Hidrólisis de almidón
- Hidrólisis de caseína
- Hidrólisis de gelatina
- Hidrólisis de tween 20
- Hidrólisis de tween 80
- Hidrólisis de esculina
- Hidrólisis de DNA

Variables Independientes

- Cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 1. Operacionalización de variables

Variable	Tipo de Variable	Definición Conceptual	Indicadores	Instrumento
Hidrólisis de almidón	Cuantitativa	Actividad de la enzima que hidroliza el almidón	Radio del halo de hidrólisis	Agar almidón
Hidrólisis de gelatina	Cuantitativa	Actividad de la enzima que hidroliza gelatina	Radio del halo de hidrólisis	Agar gelatina
Hidrólisis de caseína	Cuantitativa	Actividad de la enzima que hidroliza caseína	Radio del halo de hidrólisis	Agar caseína
Hidrólisis de tween 20	Cualitativa	Actividad de la enzima que hidroliza tween 20	Observación del precipitado de cristales	Agar tween 20
Hidrólisis de tween 80	Cualitativa	Actividad de la enzima que hidroliza tween 80	Observación del precipitado de cristales	Agar tween 80
Hidrólisis de esculina	Cuantitativa	Actividad de la enzima que hidroliza esculina	Radio del halo de hidrólisis	Agar esculina
Hidrólisis de DNA	Cuantitativa	Actividad de la enzima que hidroliza DNA	Radio del halo de hidrólisis	Agar DNA
Cepas de <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas	Cuantitativa	Especies de bacterias Gram negativas que pertenecen al género <i>Pseudomonas</i>	Especies de <i>Pseudomonas</i> sp.	Agar cetrimide

CAPÍTULO I.

MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Antecedentes internacionales

Salgado *et al.* (2012a). Realizó la investigación en la Universidad de la Habana en Cuba, cuyo objetivo fue evaluar la capacidad de 58 cepas bacterianas de la raíz de *Typha dominguensis* para eliminar materia orgánica de aguas residuales. En la investigación no se identificaron las cepas aisladas, las caracterizaron por tinción Gram, el 12 % tiene morfología cocoide, el 14 % coco bacilar y el 74 % bacilar, así como también, el 66 % fue Gram positivo y el 34 % Gram negativo. En la asimilación de los carbohidratos, el 95% creció en presencia de glucosa, el 64 % en manosa, el 64 % en lactosa, el 62 % en xilosa, y el 81 % en almidón. En relación a la hidrólisis de caseína, gelatina y tween 20 el resultado fue que el 47 % hidrolizó la caseína, 38 % hidrolizó tween 80 y el 36 % hidrolizó gelatina. En la remoción de aguas residuales sintéticas mediante aislamientos bacterianos, más del 50 % de las cepas mostraron resultados favorables. Por último, la remoción de agua residual sintética por 04 consorcios bacterianos tuvo resultados favorables, donde se comprobó que la cantidad numérica de cepas no determina la efectividad de remoción de DQO (Demanda química de oxígeno).

Tamisier *et al.* (2015). Tuvo como objetivo evaluar de los valores de corte para la clasificación de cepas bacterianas, del gen 16S rRNA de 95% para género y 98,7 % para especie, el cual fue establecido por la taxonomía bacteriana moderna. Calcularon las similitudes de secuencias de 158 géneros bacterianos, considerado como anormal cualquier valor de similitud que esté por debajo del 95 % o por encima del 98,7 %. Encontraron que solo 17 de los 158 géneros analizados (10,8 %), cumplen con los umbrales del 95 y 98,7 %. Por lo tanto, llegaron a la conclusión, de que los valores de corte de 95% para género y 98,7 % para especie solo pueden usarse como indicadores, y no como una herramienta definitiva para la clasificación de cepas bacterianas.

Patterson (2021). Este trabajo se realizó en la Universidad de la Habana, donde tuvo como objetivo, aislar *Pseudomonas* sp. de la rizósfera de *Leucocrotron havanensis*, para ver la producción de enzimas extracelulares como proteasas, amilasas, lipasas y DNAasas, así como también la resistencia a metales pesados, mediante la concentración mínima

inhibitoria como Co (II), Cr (VI) y Ni (II). Logró aislar un total de 6 rizobacterias que no lograron identificar, estas mostraron ser resistentes a los tres metales. En la observación de proteasas se usó el medio gelatina, para lipasas tween 80, para amilasas agar almidón y para DNAsas agar DNA, que fueron incubadas a 37°C durante 120 horas. Todas las cepas presentaron la enzima gelatinasa, solo 6 cepas la enzima DNAsa, 6 amilasa y lipasa. Todas las cepas fueron positivas de mas de 2 enzimas.

García et al. (2022). Este estudio fue realizado en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador, cuyo objetivo fue la búsqueda de consorcios microbianos, que estan conformados por enterobacterias, hongos, levaduras y actinobacterias, aislados de la rizósfera de *Typha dominguensis*, procedentes de un humedal artificial y dos lagunas naturales, se lograron conformar siete consorcios microbianos que son: (E1) conformado por enterobacterias, (E2) por levaduras, (E3) por hongos, (E4) por E2 y E3, (E5) por E1, E2 y E3, (E6) por E1 y E2 y; (E7) fue la muestra control, solo lixiviado. Estos consorcios fueron enfrentados a muestras de lixiviados para observar la DBO₅ (Demanda bioquímica de oxígeno) y DQO (Demanda química de oxígeno) a los 15 días, 30 días y 45 días. Los resultados mencionan que todos los consorcios son capaces de remover estos contaminantes, siendo el más eficaz en la remoción de DQO (Demanda química de oxígeno) el consorcio (E2) en un 88% (736mg/L), mientras que el más eficaz para remover DBO₅ (Demanda bioquímica de oxígeno) fue el consorcio (E4) en un 81% (54mg/L), los ensayos fueron realizados en tres repeticiones analizadas a los 45 días de contacto. Demostrando la efectividad de estos consorcios microbianos.

1.1.2 Antecedentes nacionales

Alejandro et al. (2017). Este estudio fue realizado en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con el objetivo de evaluar a las enzimas proteolíticas frente a los componentes como diferentes fuentes de iones, fuentes de nitrógeno y de carbono, que influyeron significativamente en la producción de proteasas extracelulares como gelatina y caseína, por *Pseudomonas* sp. aislada de la rizósfera, esta prueba se realizó en fermentación sumergida. Observando que los halos de hidrólisis superan en tamaño a los que obtienen otras especies como *Bacillus* sp. que son reportados como productores de enzimas industriales. También los componentes como extracto de levadura y peptona, influyen en la síntesis de estas enzimas, a diferencia de otros componentes puestos a prueba.

Márquez, L (2018). Este trabajo fue realizado en la Universidad Nacional del Altiplano en Puno, cuyo objetivo es evaluar la capacidad degradativa de azúcares (almidón), lípidos (tributirina) y proteínas (caseína) de tres especies de bacterias *Enterobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*. Estas fueron aisladas de la rizósfera de *Schoenoplectus tatora*, donde *Bacillus subtilis* tuvo el resultado positivo en hidrolizar el almidón (azúcar), tributirina (lípidos) y caseína (proteína), mientras que *Pseudomonas* y *Enterobacter* son capaces de hidrolizar lípidos y proteínas. *Pseudomonas* tuvo el halo superior en el medio caseína (proteína), siendo 5.82 mm. *Bacillus subtilis* tuvo el halo superior en la hidrólisis de tributirina (lípidos).

Muñoz & Vásquez (2020). Este estudio fue realizado en la Universidad Privada del Norte en Cajamarca. Con el objetivo de realizar un análisis bibliográfico de la eficiencia del tratamiento de aguas residuales mediante humedales artificiales, utilizando cinco especies de macrófitos que son *Chrysopogon zizanoides* (vetiver), *Cyperus papyrus* (papiro), *Phragmites australis* (carrizo), *Juncus* sp. (junco) y *Typha dominguensis* (totora). Se verificó que *Typha dominguensis* presenta un 93.57% a 96.77% de remoción de materia orgánica, *Cyperus papyrus* 50.8%, *Phragmites australis* 67% a 89.5%, *Chrysopogon zizanoides* 88.09% a 91%. y *Juncus* sp. 74.13% a 81.67%. Concluyendo *Typha dominguensis* es la más eficiente.

Miovich & Porras (2021). Este estudio fue realizado en la Universidad Cesar Vallejo en Lima, tiene por objetivo realizar una revisión sistemática de la bibliografía, evaluando la capacidad fisiológica de bacterias rizosféricas que participan en la remoción de materia orgánica en aguas residuales. Las bacterias que reducen materia orgánica, así como, carbono orgánico disuelto y particulado son las que pertenecen al grupo de las Gram negativas. Siendo *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. las bacterias más usadas para estos procesos, obteniendo valores de eliminación por encima de un 80%, esto se debe a que estos géneros poseen actividad antimicrobiana y tienen la capacidad de mantenerse en condiciones de estrés. Dependiendo del tipo de tratamiento las bacterias rizosféricas son utilizadas en estos tratamientos, siendo el tratamiento de fito depuradoras las que emplean mayores tiempos y tienen porcentajes de remoción más altos para aguas residuales.

1.1.3 Antecedentes locales

Silva (2017). Este estudio tuvo por objetivo determinar la actividad hidrolítica de *Pseudomonas* aisladas del botadero de Jaquira, realizada en el distrito de Santiago, Cusco.

Donde se identificó 11 especies del género *Pseudomonas*, procedentes de lixiviados del botadero de Jaquira, teniéndose como resultado de la identificación a 9 cepas de *Pseudomonas mendocina*, al 92.11% de probabilidad de identificación bioquímica con el Sistema RapID NF Plus, 1 cepa como *Pseudomonas fluorescens* al 99.9% de probabilidad y 1 cepa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 97.21% de probabilidad. Las 3 especies presentaron actividad hidrolítica al 54.5% en caseína, 100% gelatina, 100% almidón, 18.18% tween 80 y en las pruebas de tween 20 y esculina no presentaron actividad hidrolítica.

Puma & Palomino (2019). El objetivo de este estudio fue aislar *Pseudomonas* sp. de efluentes de agua residual de 4 restaurantes. Obtenidas las cepas aisladas se realizaron pruebas de tinción Gram, así como también la caracterización morfológica en agar cetrimide, también se realizaron las pruebas de fluorescencia, catalasa, oxidasa y gelatina. Lograron aislar 16 cepas del género *Pseudomonas*, y se encontró que 13 cepas tienen las enzimas de catalasa, oxidasa, gelatinasa y todas dieron positivo a la fluorescencia.

Granada & Masias (2022). Este estudio fue realizado en la Universidad Andina del Cusco, cuyo objetivo fue evaluar la reducción de DQO (Demanda química de oxígeno) en aguas residuales, a través de rizobacterias, que fueron aisladas de *Scirpus californicus* y *Typha dominguensis*, se realizó la caracterización morfológica y coloración Gram. Identificando bacilos Gram negativos, bacilos fusiformes Gram positivos y negativos además de cocos y diplococos Gram positivos en la rizósfera de *Typha dominguensis*, en cuanto a las rizobacterias de *Scirpus californicus* se encontraron cocobacilos Gram positivos y Gram negativos, también bacilos en cadena y curvos. Luego se realizaron pruebas de remoción de contaminantes, evaluando el DQO (Demanda química de oxígeno) en laboratorio. Los resultados que obtuvieron fueron, el porcentaje de reducción varía de 15.49% hasta 51.24%, obteniéndose el valor más alto de 51.24% de rizobacterias de *Typha dominguensis* y 49.58% rizobacterias de *Scirpus californicus*, estos valores permitieron fijar una dosis, tiempo y temperatura óptima que fue de 1% v/v a los 5 días con una temperatura de 20°C.

1.2 GENERALIDADES

1.2.1 *Typha dominguensis*

Typha dominguensis es una planta que pertenece a la familia Typhaceae, es una planta macrófita emergente, se ubica en zonas acuáticas o en zonas inundadas.

Esta planta posee hojas largas, planas, envainadoras y lineales, los tallos son simples, toda la planta puede crecer hasta los 3m, las flores se acumulan en forma de espiga sobre la vaina, estas son pequeñas, la parte femenina se encuentra en la base y la parte masculina en la parte superior. Esta planta sintetiza fitotoxinas que impiden el crecimiento de otras plantas vecinas, así como también sirve de alimento y refugio para animales del pantano, también se ha descubierto que los extractos de la planta tienen propiedades antioxidantes y cicatrizantes. Se encuentran en pantanos y humedales, y están muy extendidos por todo el mundo, formando densas colonias de la familia de las totoras. Debido a su alta resistencia a los contaminantes, esta especie es valorada y utilizada para el tratamiento de diversas aguas residuales en humedales naturales y artificiales (Cordero & Velásquez, 2023).

La taxonomía de la especie *Typha dominguensis* (Totora) se ve a continuación:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Subclase: Commelinidae

Clase: Liliopsida

Orden: Cyperales

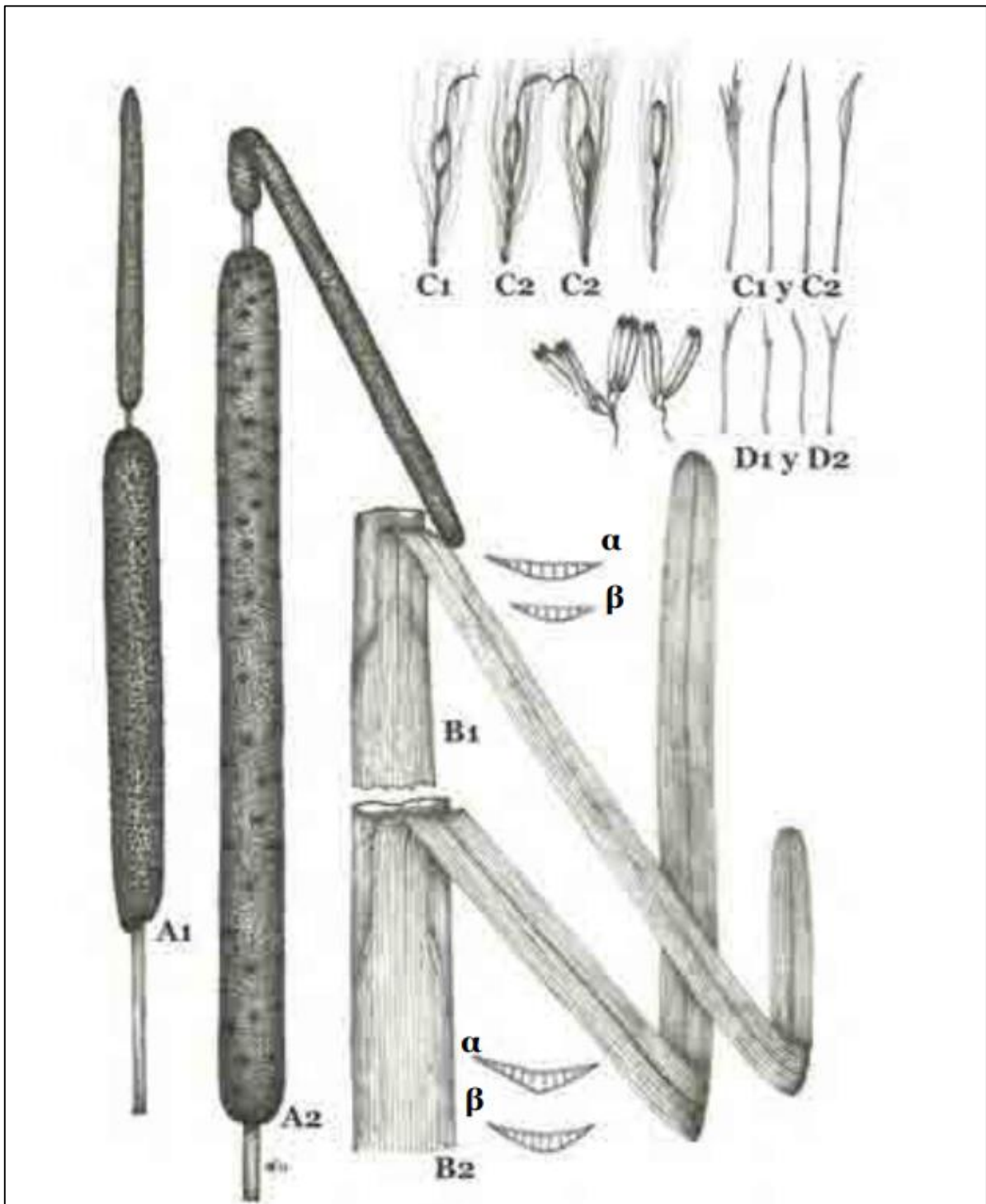
Familia: Typhaceae

Género: *Typha*

Especie: *Typha dominguensis*

Fuente: Torres Callupe, 2017.

Figura 1. Características botánicas de *Typha dominguensis*



Nota. *Typha dominguensis* subsp. *dominguensis* (Pers.). A: Inflorescencia; B: Hoja caulinar con secciones en la base del limbo (α), y media altura del limbo (β); C: Brácteas de la inflorescencia femenina, flores femeninas y frutos; D: Brácteas de la inflorescencia masculina y agrupaciones de estambres.

Fuente: Pardo, 2012

Las características que la diferencia de otras especies (figura 3), es que tiene las hojas de color verde oscuro, curvatura plana abarquillada, presenta la lámina delgada con 2.2mm de grosor, vaina abrasadora, el ápice de su hoja es ligeramente redondeado, sus flores femeninas son de color pardo oscuro a rojizo, con forma cilíndrica espiciforme, sin brácteas foliáceas, y además poseen pelos capilares no engrosados que están distribuidos en 3 a 5 verticilos en el ginóforo de las infértiles, en caso de las fértiles distribuidas de 1 a 2. Las flores masculinas son de color pardo oscuro, con forma cilíndrica, está separada de la flor femenina por una parte limpia de 3.5mm. Además, esta planta tiene un fruto fusiforme (Pardo, 2012).

Typha dominguensis es una planta de clima templado y que prospera en posiciones solares, esta especie pertenece a las especies dominantes lo que significa que tiene más probabilidades de adaptación y supervivencia (Torres Callupe, 2017).

1.2.1.1 Importancia de *Typha dominguensis* en biorremediación de aguas residuales y de lixiviados

La demanda creciente de alimentos ha generado que los sectores agropecuarios y ganaderos, usen tecnologías que garanticen la salud e inocuidad de los alimentos, haciendo uso de fertilizantes, fármacos veterinarios y pesticidas, los cuales contienen metales pesados, estos al ser vertidos a los cultivos y al suelo, son liberados al medio ambiente, alcanzando los cuerpos de agua superficiales, estos químicos se convierten en contaminantes, alterando el medio ambiente (Franco *et al.* 2020), también son contaminados por el vertimiento directo de aguas residuales y de lixiviados (Canal & Torres, 2023). Es allí donde radica la importancia del género *Typha*, una planta que es capaz de adaptarse a diferentes hábitats como arroyos, lagunas, pantanos, drenajes, canales de riego en diferentes condiciones con suelos saturados, contaminados en condiciones anoxicas, debido a sus grandes rizomas subterráneos que estabilizan el sedimento, disminuyendo la turbidez, convirtiéndose en un organismo clave en los cuerpos de agua, poseen alta capacidad de absorción y acumulación de nutrientes de nitratos, fósforo y liberan químicos que inhiben el crecimiento de fitoplancton perjudiciales, de esta manera reducen el proceso de eutrofización (Franco *et al.* 2020).

Por ello *Typha dominguensis*, ha sido estudiada y empleada en sistemas de tratamiento de aguas residuales y de lixiviados, Muñoz & Vásquez (2020) menciona que *Typha dominguensis* tiene mayor porcentaje global de remoción de sólidos totales en suspensión,

DBO₅ (Demanda bioquímica de oxígeno), DQO (Demanda química de oxígeno), y coliformes termotolerantes de aguas residuales domésticas, estos sistemas han sido muy utilizados mediante el tratamiento con humedales artificiales, superando a otras especies como *Juncus sp*, *Cyperus papyrus*, *Phragmites australis*, y *Chrysopogon zizanioides*.

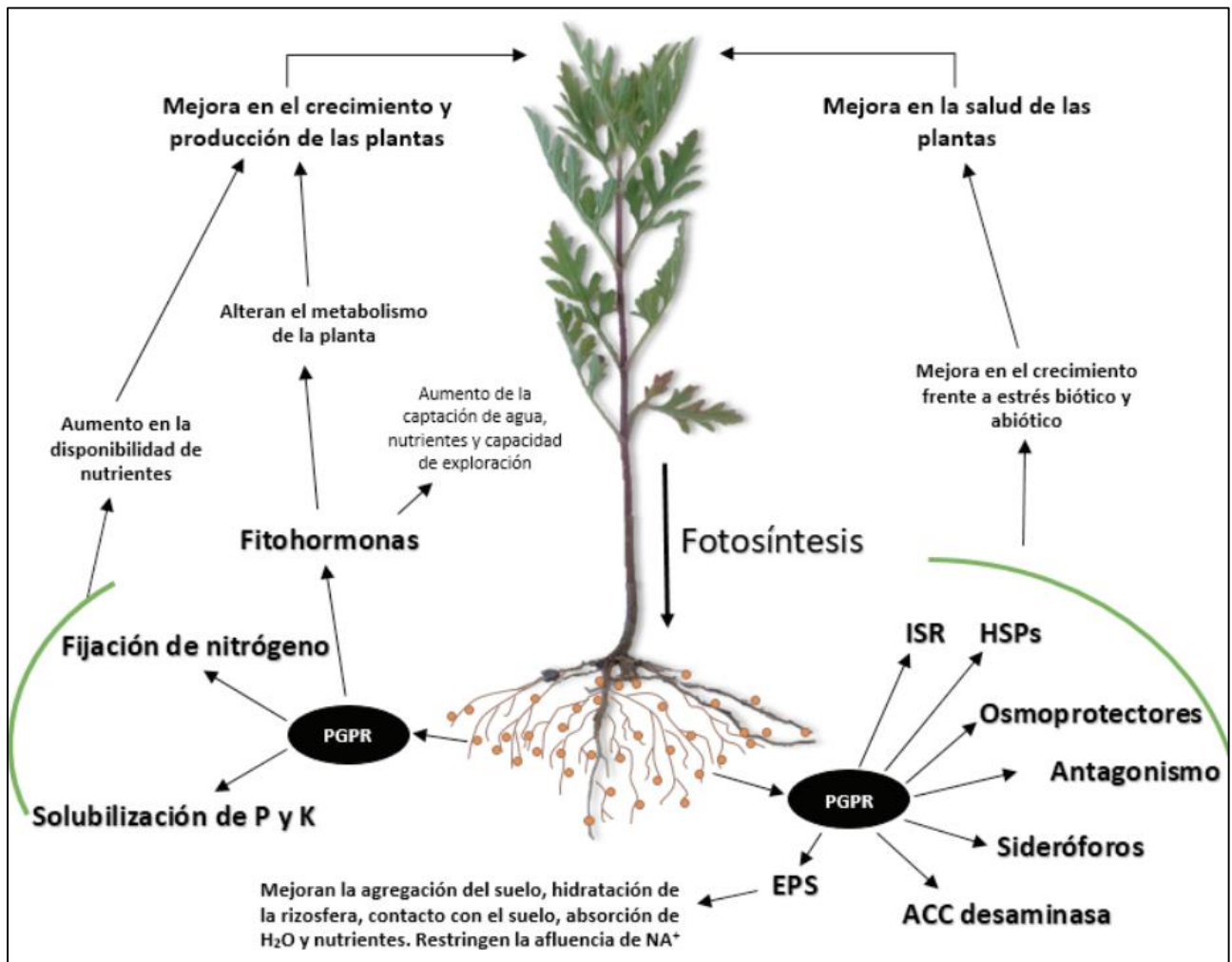
1.2.2 Bacterias de la rizósfera

Las plantas se localizan en la base de la cadena trófica, debido a su capacidad de modificar la energía solar en energía química, son capaces de fabricar sus propios carbohidratos, por medio de la fotosíntesis, utilizando la materia prima y los minerales que toman desde el suelo, no requieren de una fuente de alimento, más bien son proveedoras de alimentos para otros organismos. De allí los procesos de absorción a nivel de la raíz que les permite un crecimiento activo, la falta de estos minerales puede ser perjudicial para la planta (Ona, 2021).

La rizósfera, es un ambiente donde habitan diferentes especies de microorganismos y estos son atraídos a las raíces, es una zona de mucha actividad donde el tipo y cantidad de microorganismos, depende de las características y función del suelo, son capaces de crecer en la porción del suelo más próxima a la raíz, y el rol que cumple estos microorganismos, está en función de contribuir al crecimiento vegetal de la planta, y así puedan ser considerados como potenciales biofertilizantes (Ona, 2021).

Las rizobacterias son un grupo muy diverso y vasto, que habitan y rodean la raíz de una planta, en cuanto a las relaciones que forman algunas son benéficas y otras perjudiciales, también algunas son neutras. Lo interesante es que estas bacterias juegan un papel importante (figura 4) en la adaptación y productividad de la planta a través del tiempo (Velasco *et al.*, 2020).

Figura 2. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)



Nota. PGPR: Rizobacterias promotoras de crecimiento; P: Fósforo; K: Potasio; EPS: Exopolisacáridos; ISR: Resistencia Sistémica Inducida; HSPs: Proteínas de choque térmico; ACC desaminasa: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilo (Velasco *et al.* 2020).

Las *Pseudomonas* son un grupo importante de bacterias, con muchas aplicaciones y beneficios, existen numerosos estudios, que describen los beneficios que produce *Pseudomonas* aislado de la rizósfera de plantas, como lo menciona Rolón (2020) *Pseudomonas rhodesiae* aislada de *Typha latifolia*, es promotora del crecimiento vegetal debido a que es capaz de sintetizar auxinas, lo que produce el crecimiento de raíz y tallo en la planta, también es capaz de producir tolerancia a cadmio en plantas. Por ello, Rolón (2020) menciona que los microorganismos que habitan en la raíz de la planta son de gran importancia, porque se establece una relación simbiótica donde se favorecen mutuamente,

y la función de estas bacterias es proveer nutrientes a las plantas, y así favorecer el desarrollo de la planta haciendo que se adapte a los cambios y condiciones del suelo en el que se encuentran.

Varios estudios mencionan que *Pseudomonas* sp. aislada de la rizósfera, son promotoras de crecimiento. Córdova *et al.* (2022) demostró que las bacterias como *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. aisladas de la rizósfera de *Opuntia quitensis* (tuna) pueden ser usadas como promotoras de crecimiento en *Zea mays* (maíz).

1.2.2.1 Bacterias rizosféricas implicadas en procesos de biorremediación

Es importante buscar sistemas que no generen impactos ambientales negativos y que sean eficientes y sustentables con el medio ambiente. La relación que existe entre los microorganismos y la planta, tomando en consideración la composición del suelo incide en la capacidad metabólica, adaptabilidad y de proliferación de estos microorganismos rizosféricos (Ona, 2021).

Muchos estudios mencionan que las bacterias rizosféricas poseen diferentes capacidades que van desde el uso en biorremediación de aguas residuales, tolerancia a metales pesados, controladores biológicos, promotoras de crecimiento, capacidad hidrolítica, y muchos más como lo reportan varios estudios (Granada & Masías, 2022; Álvarez *et al.*, 2020; Solórzano, 2023; Córdova *et al.*, 2022, Rolón, 2020; Velasco, 2020 y Mioovich & Porras, 2021).

A continuación, se presenta tabla 3, con estudios realizados en la relación que existe entre planta y microorganismo

Tabla 2. Revisión bibliográfica de las relaciones planta-microorganismo y sus beneficios

Especie de Microorganismo	Especie vegetal	Beneficios	Referencia
<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>streptomyces</i> , <i>Priestia</i> , <i>Massilia</i> y <i>Sphingobium</i>	Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)	Reducción del contaminante (gasolina) en el suelo	Almanzan <i>et al.</i> , 2024
Bacterias rizosféricas como <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Actinobacteria</i>	No indica	Reducción en un 90% de fertilizantes químicos	Quiroz, 2021
Bacterias rizosféricas como: <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i>	No indica	Eliminación de materia orgánica de aguas residuales	Miovich & Porras, 2021
<i>Lysobacter</i> , <i>Kaistobacter</i> , <i>Pontibacter</i> , <i>Flavisolibacter</i> , <i>Adhaeribacter</i> y <i>Bacillus</i>	Trébol (<i>Trifolium repens</i> L.)	Colaboran con la acumulación de metales pesados como cromo, plomo y cadmio en las plantas y aumentan la cantidad de materia orgánica, nitrógeno y fósforo.	Lin, Liu, Li y Dong, 2021
<i>Streptomyces laurentii</i>	Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L.)	Aumenta la acumulación de glicina, betaína y azúcar; aumenta el contenido de clorofila, reducen la peroxidación lipídica.	Kour <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Col rizada China (<i>Brassica oleraceae</i>)	Asimila la concentración de los iones de amonio y hierro de aguas residuales.	Sarawane eyaruk S. <i>et al.</i> , 2019
<i>Arthrobacter agilis</i>	Maíz (<i>Zea mays</i>)	Colonizan las raíces del maíz y promueven la absorción de hierro.	Avilés-García <i>et al.</i> , 2016
<i>Arthrobacter agilis</i>	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Produce dimetilhexadecilamina, que estimula el alargamiento del tejido e incrementa la producción de biomasa. También inhibe el crecimiento de patógenos. Promueve el crecimiento de hongos beneficiosos como <i>Trichoderma viride</i> y <i>Trichoderma viride</i> .	Velázquez-Becerra <i>et al.</i> , 2011; 2013
<i>Glomus fasciculatum</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	Lirio (<i>Lilium</i> sp.)	Ayuda al crecimiento de raíces y tallos, aumenta el contenido de otros minerales después del tratamiento como zinc (Zn), cobre (Cu) y hierro (Fe).	Arriaga <i>et al.</i> , 2009

La biorremediación utiliza microorganismos para descomponer o desintoxicar contaminantes ambientales dañinos. Este proceso hace uso de las capacidades metabólicas de los microorganismos para neutralizar o remover los contaminantes, el método se basa en la digestión por parte de los microorganismos que son capaces de incorporar diferentes

compuestos orgánicos e inorgánicos para ser usados como fuente de carbono, nitrógeno o energía (Brutti *et al.*, 2018).

Las ventajas que brindan estos procesos son:

- Tratamiento seguro, no tiene impacto negativo en la salud y en el ambiente
- Fácil aplicación en el tratamiento
- Los productos son inocuos o menos tóxicos
- Proceso tecnológico aplicable y efectiva
- Bajos costos de instalación y tratamiento

Como limitación del proceso de biorremediación, el tiempo es un factor que influye en este proceso, ya que es variable según el tipo de contaminante para degradar, hasta alcanzar una cantidad aceptable, que cumpla con las normativas exigentes. Por el contrario, los procesos químicos, son más rápidos en la degradación de contaminantes, pero causan la eliminación de la microbiota autóctona, modificando las características fisicoquímicas y biológicas del ambiente (Brutti *et al.*, 2018).

Existen estrategias de biorremediación como son la intrínseca y la asistida o dirigida:

La biorremediación intrínseca, consiste en la capacidad propia del microorganismo, en la que de forma natural realiza la biodegradación de los contaminantes, la biotransformación puede ocurrir de forma total o parcial. Mientras que la biorremediación asistida o dirigida consiste en mejorar el proceso de multiplicación y aceleración, haciendo uso de la bioaumentación o bioasimilación (Brutti *et al.*, 2018).

En cuanto a la bioasimilación las bacterias endógenas que son propias del lugar, deben tener la capacidad de degradar los contaminantes, y mediante la adición de nutrientes, se estimula el crecimiento y multiplicación (Brutti *et al.*, 2018). Mientras que, en la bioaumentación, la adición de bacterias exógenas o endógenas, que previamente fueron multiplicados en laboratorio, estos completan la microbiota endógena, y debido al aumento de la población y su capacidad puedan reducir el contaminante (Brutti *et al.*, 2018).

Existen diferentes bacterias que son ampliamente utilizadas en procesos de biorremediación que van desde el tratamiento de suelos contaminados con petróleo, metales pesados, pesticidas, tratamientos de aguas residuales, efluentes de industrias aceiteras, textiles, curtiembres. Los géneros bacterianos más usados en los procesos de

biorremediación de suelos y agua son: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Nocardia* y *Alcaligenes* (Brutti *et al.*, 2018).

La notable versatilidad nutricional de *Pseudomonas*, combinada con la capacidad de adaptabilidad a diferentes hospedadores y ecosistemas gracias a la variabilidad genética que posee, las convierte en excelentes candidatas para biorremediación. Como por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa* se aísla con frecuencia de suelos y aguas subterráneas contaminados con petróleo. *Pseudomonas fluorescens* con aplicaciones en la agricultura sustentable, también es controlador biológico y promotora de crecimiento vegetal. *Pseudomonas putida* es capaz de hidrolizar algunas toxinas ambientales. Otras especies de *Pseudomonas* con estas propiedades son *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas stutzeri* (Salamanca 2021; Álvarez *et al.*, 2020 y Solórzano 2023).

1.2.3 Género *Pseudomonas*

Las *Pseudomonas* son un grupo de bacterias que componen un amplio género, pertenecen a las Gram negativas de la familia Pseudomonadaceae, lo cual es uno de los dominios más amplios dentro de todas las bacterias. Debido a su diversidad y abundancia de especies, es su amplia y alta capacidad metabólica, ello explica su adaptación y ubicuidad en la naturaleza. Existen cepas bacterianas que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, otros crecen en suelos salinos, son capaces de vivir en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, a concentraciones de pH y temperatura muy altos o muy bajos, otros son capaces de participar en procesos de óxido reducción de azufre, su versatilidad enzimática es tan variada que le permite degradar diferentes compuestos de los más simples a los más complejos (Santamaría, 2021).

En su estructura poseen uno o más flagelos polares, que les da la capacidad de moverse y colonizar diferentes hábitats, por ello se han encontrado *Pseudomonas* asociadas a plantas, mares, insectos, ganado, humanos, ríos, etc (Santamaría, 2021).

1.2.3.1 Historia y taxonomía del género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* ha sido estudiado en todo el mundo y ha habido algunos cambios en la nomenclatura del género a lo largo del tiempo. Originalmente se caracterizó sobre la base de sus características metabólicas y morfológicas, de las cuales se describieron aproximadamente a 29 especies y otras 235 especies poco conocidas según el manual de bacteriología sistemática de Bergey's, luego este mismo manual de bacteriología

sistemática de Bergey's redujo la lista de especies reconocidas a 112 (Garrity *et al.*,2005). Los primeros en hacer tal clasificación fueron Palleroni y sus colaboradores de la universidad de Berkeley y la universidad de California, EE.UU, quienes en 1963 clasificaron *Pseudomonas* en cinco categorías basadas sobre la hibridación rRNA-ADN. En 2012, la lista de 138 cepas de *Pseudomonas* se actualizó con la adición de dos especies recientemente descritas, *P. chlororaphis* y *P. alkylphenolia* con el propósito de comprender las relaciones filogenéticas de las especies (Garrity *et al.*,2005).

Se dividió en seis grupos el primer linaje, representado por la especie *P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. lutea*, *P. anguilliseptica*, *P. putida*, y *P. straminea*. El grupo de *P. fluorescens* fue el más difícil y complejo, abarcó 9 subgrupos, caracterizados por las especies *P. gessardi*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. jesseni*, *P. koreensis*, *P. mandelii*, *P. corrugata*, *P. asplenii* y *P. chlororaphis*. El segundo linaje *P. aeruginosa*, se dividió en cuatro grupos principales según las características de las especies *P. oleovorans*, *P. aeruginosa*, *P. oryzihabitans* y *P. stutzeri*. Las poblaciones de *P. pertucinogena* son independientes de cualquier linaje *P. duriflava*, *P. luteola* y *P. caeni* se consideran especies atípicas del género (Sánchez, 2013).

La clasificación taxonómica de *Pseudomonas* sp. es la siguiente:

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*

Especies: *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas fluorescens

Pseudomonas putida

Pseudomonas stutzeri

Pseudomonas pseudoalcaligenes

Fuente: Lopardo, 2016; Garrity *et al.*, 2005.

1.2.4 Metabolismo del género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* y todas las especies, tienen al oxígeno como aceptor final de electrones, siendo organismos aeróbicos; también existen otras especies que utilizan el nitrato como aceptor alternativo de electrones, y por ello realizan la desnitrificación. El citocromo oxidasa también participa en algunos casos en la desnitrificación (Gómez *et al.*, 2008).

Las especies del género *Pseudomonas*, pueden sintetizar diferentes metabolitos secundarios y biopolímeros que tienen importancia biotecnológica. También se les encontró la capacidad de reducir contaminantes en el medio ambiente, como los hidrocarburos aromáticos que son compuestos recalcitrantes. Este género utiliza las vías de metabolismo y las vías de degradación al incorporar diferentes nutrientes, realizando la limpieza de sitios contaminados, esto les confiere la capacidad de adaptarse y sobrevivir a una gran variedad de hábitats, realizando la formación de biopelículas (Gómez *et al.*, 2008).

La posesión de componentes móviles como transposones, plásmidos y operones, y la composición genética de *Pseudomonas*, le permite el traspaso de genes y por tanto, permite una adecuación a la presencia de nuevos contaminantes en un ecosistema determinado. Además, tienen genes que codifican enzimas que utilizan para mineralizar contaminantes. *Pseudomonas aeruginosa* ha sido estudiada por la producción de biosurfactantes de fase estacionaria, cuya función en la biorremediación es solubilizar compuestos hidrófobos (Gómez *et al.*, 2008).

1.2.4.1 Metabolismo de *Pseudomonas* en carbohidratos

Mediante un estudio realizado con sustratos marcados con carbono 13, realizado en el análisis de flujo metabólico basado en carbono, se demostró que *Pseudomonas putida* KT2440 aislada del suelo que coloniza la rizósfera, utiliza en la mayor parte de sus procesos metabólicos casi exclusivamente la ruta de Entner-Doudoroff (ED), para el catabolismo de la glucosa, sin embargo se observó que esta bacteria codifica las enzimas requeridas, para ejecutar otras dos rutas metabólicas que son Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y la vía de las pentosas fosfato (PP), rutas que también son conocidas por el catabolismo de la glucosa, entender cuál de las tres rutas usa esta bacteria para el catabolismo de la glucosa, radica en la enzima glicolítica 6-fosfofructo-1-quinasa (Pfk), quien es la responsable de catalizar la conversión dependiente de ATP de la fructosa-6-fosfato en fructosa-1,6-bifosfato, siendo un paso clave en la ruta glucolítica. Por lo tanto, la ausencia de esta enzima en *Pseudomonas putida* explica porque la ruta que se utiliza para la degradación de la hexosa es Entner-Doudoroff (ED) con una aportación muy pequeña de la vía PP (Nikel *et al.*, 2015).

Existen diferencias entre los organismos como *Pseudomonas* sp. y otras bacterias como *E. coli* y otras enterobacterias en cuanto al transporte, metabolismo del catabolismo de azúcares, así como también su regulación, ya que para las bacterias como *E. coli* o *Bacillus subtilis* el sustrato de preferencia es la glucosa sin embargo para *Pseudomonas* ni la glucosa, ni otros como la fructuosa, el glicerol o el gluconato son fuentes preferentes (Fernández, 2012). Sin embargo, el metabolismo en las enterobacterias, la glucosa se transporta por medio de la membrana citoplasmática y se fosforila como glucosa-6-fosfato mediante la ruta metabólica de las pentosas fosfato (PEP-PTS). Se ha descubierto que esta ruta metabólica, es la encargada del transporte de diversos carbohidratos en diferentes microorganismos, mientras que, en *Pseudomonas*, el único carbohidrato que es trasladado

al interior de la célula, mediante la ruta de las pentosas fosfato (PEP-PTS) parece ser la fructuosa, ya que otros azúcares, así como la glucosa ingresan al periplasma a través de porinas (OprB) de la membrana externa. El catabolismo de la glucosa es bioquímicamente rico, con tres vías convergentes capaces de convertir este azúcar en el intermediario 6-fosfogluconato (6PG), mientras que el metabolismo de carbohidratos no es el preferido en las especies de *Pseudomonas* (Fernández, 2012).

En el citoplasma bacteriano, la glucosa se puede fosforilar directamente a glucosa-6-fosfato; convertido en ácido glucónico en el periplasma y fosforilado en glucosa 6 fosfato en la célula; o puede continuar oxidándose hasta que el ácido 2-cetoglicónico ingrese a la célula y experimente dos procesos. Las actividades enzimáticas se fosforilan y reducen, formando finalmente glucosa 6 fosfato. Aunque las tres vías operan simultáneamente, se ha demostrado que la glucosa-6-quinasa y el anillo 2-cetogluconato son cuantitativamente más significativos que la fosforilación del ácido glucónico mediada por la glucoquinasa. Mientras que en *E.coli* y *Bacillus subtilis* desempeña un papel menor, porque los carbohidratos intermediarios fosforilados son asimilados por la glucolisis (Fernández, 2012).

La conversión de la glucosa 6 fosfato en 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato derivado de cualquiera de las rutas metabólicas anteriores, mediada por 6-fosfogluconato deshidratasa. Luego el 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato es hidrolizado por la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa para formar una molécula de gliceraldehído-3-fosfato y una molécula de piruvato. El gliceraldehído-3-fosfato se metaboliza a través de la vía glucolítica y se transforma en piruvato mediante una serie de pasos. Finalmente, el piruvato producido en una u otra vía se descarboxila a acetil-CoA, que puede ingresar a Ciclo de ácidos tricarboxílicos (CAT) o producirse en vías biosintéticas como la síntesis de novo de ácidos grasos. Como hemos visto, existen grandes diferencias en el transporte y metabolismo de azúcares entre *Pseudomonas* y bacterias tradicionalmente utilizadas como modelos bioquímicos, como *E. coli* (Fernández, 2012). Otro estudio menciona que el 90% del azúcar consumido se convierte en gluconato, que ingresa al metabolismo central del carbono como 6-fosfogluconato también se observó que el 10% de las triosas fosfatos son almacenadas para formar hexosas fosfatos. Aquí se observa que las tres rutas metabólicas que son la ruta de las pentosas fosfato, Entner-Doudoroff y Embden-Meyerhof-Parnas (EDEMP) fusionan sus actividades para formar una ruta metabólica imprevista el ciclo

Embden-Meyerhof-Parnas (EDEMP), el cual hace su trabajo para procesos de glucólisis y gluconeogénesis, cabe señalar que esta ruta metabólica no surge de la adquisición de diferentes genes, sino de la expansión de la conectividad entre elementos metabólicos existentes. Este mecanismo fue estudiado en *Pseudomonas putida*, llegando a la conclusión que esta vía le facilita enfrentar diferentes tipos de dificultades como el estrés oxidativo, tolerancia a la desecación y otras circunstancias ambientales adversas (Fernández, 2012).

1.2.4.1.1 Amilasa

La amilasa es una enzima hidrolítica que cataboliza al homopolisacárido almidón, el cual está conformado por muchos monómeros de alfa D glucosa, a su vez conformada por dos estructuras diferentes que son la amilosa (lineal), esta es la que conforma un 10 a 20% del almidón, y es la responsable de la producción del color azul en presencia de Iodo, y la amilopectina (ramificada) conforma un 80 a 90% del almidón. La acción de las amilasas sobre la amilopectina, va a generar dextrinas que vienen a ser polímeros con un número reducido de glucosas, estas dextrinas a su vez son catabolizadas a maltosa y glucosa (MacFaddin, 2003).

1.2.4.2 Metabolismo de *Pseudomonas* en lípidos

Los ácidos grasos en las bacterias, se encuentran a menudo como fosfolípidos que está formado por un diacilglicérido (dos ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol) y el tercer carbono del glicerol se encuentra unido a un grupo de cabeza polar (Jiménez, 2022).

Los ácidos grasos son facilitados por los fosfolípidos de la membrana que constantemente se producen, modifican y destruyen, o también pueden ser absorbidos del exterior ya que estos son una importante fuente de energía, estos últimos son transportados a través de la membrana celular y luego activados a acil-CoA y catabolizados mediante el ciclo de beta oxidación (Jiménez, 2022).

El transporte de ácidos grasos varía dependiendo de su tamaño, los de cadena corta (C4-C6) son conducidos por la porina Ompf, mientras que los de cadena media (C7- C11) ingresan por difusión simple, mientras que los de cadena larga (C12 – C18) necesitan un transporte facilitado que atraviese la célula, una proteína de transporte de ácidos grasos que se ubica en la membrana externa y sirve también como receptor, una vez ingresado el ácido graso, la enzima acil-Coa sintetasa que se encuentra en el citosol, es la responsable

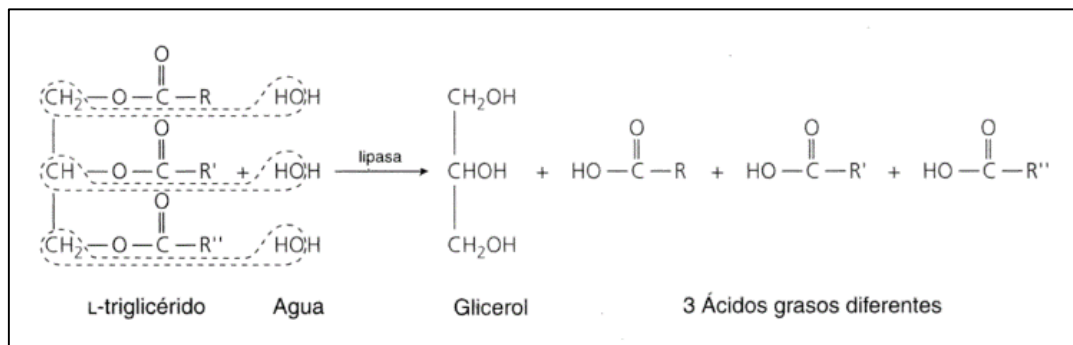
de activar estos ácidos grasos de cadena larga y los convierte en tioésteres de acil-Coa de cadena larga, este compuesto activa un regulador que reprime la expresión de genes de biosíntesis y en cambio activa la expresión de genes para realizar la degradación de ácidos grasos, los cuales terminan siendo derivados a la ruta metabólica β -oxidación donde son catabolizados hasta formar moléculas de acetyl-CoA y dependiendo de las necesidades de la célula pueden ser llevados al ciclo del glioxilato para que puedan ser usados como única fuente de carbono y energía (Jiménez, 2022).

1.2.4.2.1 Lipasas

La lipasa es un tipo de enzima que puede hidrolizar triglicéridos para producir ácidos grasos libres y glicerol (figura 1), así brindan una fuente de energía, cumpliendo con las necesidades nutricionales de la célula; Y bajo ciertas condiciones, puede catalizar otras reacciones de aminólisis, transesterificación y esterificación (Salazar *et al.*, 2020). Estas enzimas son catabólicas, actúan sobre ésteres emulsionados de lípidos o glicéridos, son específicas para las cadenas alfa de los triglicéridos, hidrolizan el triglicérido en monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol. Cuando sucede la ruptura de enlaces éster, los ácidos grasos se combinan con elementos de agua y se comportan como ácidos carboxílicos, lo que le confiere insolubilidad al agua (Salazar *et al.*, 2020; Jiménez, 2022).

Estas enzimas se clasifican en dos grupos: Las esterasas o llamadas también carboxilesterasas y las lipasas, estas dos se diferencian por la especificidad del sustrato, las esterasas actúan sobre ácidos grasos de cadenas cortas de átomos de carbono menores a 10, ésteres simples, el sustrato estándar es la tributirina; Mientras que las lipasas actúan sobre ácidos grasos de cadenas largas, mayores a 10 átomos de carbono, el sustrato de referencia es la trioleína. También pueden ser diferenciadas por la especificidad del sustrato, las esterasas actúan sobre sustratos más solubles con un grado variable de hidrofobicidad, mientras que las lipasas actúan sobre sustratos insolubles, hidrofóbicos. Ambas enzimas son estables en presencia de disolventes orgánicos (Salazar *et al.*, 2020).

Figura 3. Hidrólisis de un triglicérido



Fuente: MacFaddin, 2003

Las lipasas son de gran importancia biotecnológica y biomédica debido a que no producen subproductos innecesarios y además proporcionan beneficios económicos cuando se utilizan. El mercado de enzimas estaba valorado en 3.300 millones de dólares en el 2010, creciendo a una tasa compuesta de más del 6% anual, y alcanzará los 4.400 millones de dólares en 2019 (Jiménez, 2022). Las lipasas actualmente tienen nuevas aplicaciones en la industria de los hidrocarburos y están expandiendo la producción farmacéutica como lipasas bacterianas y fúngicas, por la facilidad de producción, mediante tecnología de ADN recombinante ya que aparecen en muchos microorganismos, como en especies *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas* sp., *Mucor mihei*, *Rhizopus oryzae*, *Geotricum candidum* y *Rhizopus niveus* (Jiménez, 2022). Estas han sido usadas en el tratamiento de aguas residuales y tratamiento de residuos sólidos, para hidrolizar grasas y líquidos, ya que los métodos químicos y físicos convencionales son costosos, y aquí la biotecnología ambiental emerge como una alternativa limpia, económica y eficiente en un balance con los tratamientos tradicionales que se saturan rápidamente, consumen recursos internos y no logran los objetivos esperados (Jiménez, 2022).

1.2.4.3 Metabolismo de *Pseudomonas* en proteínas

En la actualidad las proteasas son clasificadas mediante tres características: la relación evolutiva, naturaleza química del sitio catalítico y la reacción catalizada. Así como también dependiendo del sitio de acción, las proteasas se dividen en dos: las endopeptidasas y las exopeptidasas (Rodrigo, 2013).

Las exopeptidasas son las que liberan un aminoácido a través del corte del enlace peptídico en los extremos N-amino o carboxilo, por lo que se las llama aminopeptidasas, están muy bien distribuidas en hongos y bacterias, estas son enzimas intracelulares que cortan el

aminoácido N terminal de proteínas inmaduras. Según la naturaleza del sitio activo se las clasifica en serina carboxipeptidasas, metalo carboxipeptidasas y cisteína carboxipeptidasas. Un ejemplo de ello son las metalo carboxipeptidasas que fueron aisladas de *Pseudomonas* (Rodrigo, 2013).

Las endopeptidasas se las clasifica en metaloproteasas, serina proteasas, aspártico proteasas y cisteína proteasas; las más abundantes son las serina proteasas que se encuentran muy bien distribuidos en virus, hongos, bacterias y eucariotas, estas se subclasifican según el tipo de pH óptimo para realizar su actividad encontramos a las alcalinas que poseen un pH que rodea 10, estas son producidas por *Flavobacterium* y *Streptomyces*; también están las subtilinas con una temperatura de 60°C y un pH de 10, sintetizadas en su mayoría por *Bacillus* y las que son usadas para detergentes. También se encuentran las proteasas acidas o también conocidas como aspártico proteasas que poseen un pH de 3 a 4, producidas por *Aspergillus*, *Neurospora*, *Penicillium* y *Rhizopus*. Las proteasas más diversas son las metaloproteasas, estas necesitan un ion metálico divalente para realizar su actividad, estas se subclasifican en alcalinas, neutras, Myxobacter I y Mixobacter II. Las alcalinas tienen poca especificidad porque poseen muchas dianas mientras que las neutras son específicas por los aminoácidos hidrófobos, todas son inactivadas por sustancias quelantes como el EDTA. Es así que muchas de estas proteínas poseen tolerancia a altas temperaturas como por ejemplo la termolisina, que posee un átomo de Zn y cuatro de Ca lo que le facilita su termorresistencia por una hora a 80°C, esta es producida por *B. stearothermophilus*. Otro ejemplo de metaloproteasas neutras es la colagenasa sintetizada por *C. histolyticum* o la elastasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Las proteasas más comunes en bacterias son las proteasas alcalinas, neutras y la serina proteasas (Rodrigo, 2013).

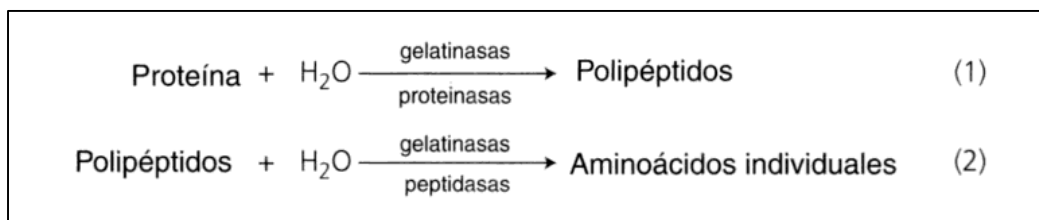
En *Pseudomonas* la proteasa encargada de degradar la leche es una metaloproteasa alcalina conocida como AprX, cuya expresión está regulado por el aumento de temperatura, aumento de niveles de hierro en el medio y cambio de fase. *Pseudomonas Fragi*, *P. Lundensis* y *P. fluorescens* son las más involucradas en la alteración de la leche debido a la acción de sus proteasas (Rodrigo, 2013).

1.2.4.3.1 Gelatinasa

Son las enzimas capaces de digerir la gelatina, una proteína que derivan del colágeno animal, estas enzimas realizan proteólisis por lo tanto son del tipo proteinasas, tienen la

capacidad de generar gelatinólisis por ello se las llama gelatinasas. Estas enzimas ayudan a reducir el tamaño de las proteínas para que así sean aprovechados por las bacterias por lo tanto estas segregan gelatinasas exocelulares que catabolizan las proteínas a componentes más pequeños, así como las gelatinasas catabolizan la gelatina hasta aminoácidos (figura 2), lo que hace que pierdan sus características gelificantes (MacFaddin, 2003).

Figura 4. Actividad hidrolítica de la enzima gelatinasa



Fuente: MacFaddin, 2003

1.2.4.3.2 Caseinasa

Esta enzima actúa sobre la proteína Caseína, esta proteína es una fosfoproteína compleja, que se encuentra en mayor abundancia en la leche, la acción de esta enzima es romper enlaces peptídicos y transformar la estructura cuaternaria de la proteína, produciendo aminoácidos. Esta reacción puede verse en la prueba de hidrólisis de caseína mediante el agar caseína, ya que al ser opaca, la acción de la caseinasa hace que el medio sea transparente debido a que los aminoácidos se disuelven en el medio alrededor de la colonia (MacFaddin, 2003).

1.2.4.4 Metabolismo de *Pseudomonas* en DNA y esculina

1.2.4.4.1 DNasa

Estas enzimas pertenecen al grupo de las nucleasas capaces de degradar los ácidos nucleicos, esta enzima cataboliza la despolimerización del DNA es decir que rompe la unión de polímeros y forma monómeros de ácido nucleico de DNA. Esta enzima es una endonucleasa extracelular, que hidrolizan un puente fosfodiéster interno que genera extremo 3' hidroxilo y 5' fosforilo o 5' hidroxilo y 3' fosforilo, estas necesitan un catión divalente para esta actividad y son proporcionados por las peptonas, en el medio de crecimiento. El resultado de las DNasas son la producción de desoxirribonucleótidos con porcentaje más elevado de purinas en el sustrato de DNA. Estas enzimas extracelulares se

encuentran en pocas especies bacterianas como: *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Vibrio* (MacFaddin, 2003).

1.2.4.4.2 Esculinasa

La esculina es un glucósido derivado de la cumarina (6 beta glucósido 7 hidroxycumarina) la enzima que cataliza este glucósido es la esculinasa, que forma como producto la esculetina y dextrosa. Esta actividad es revelada en el medio Agar bilis esculina donde la presencia de esta enzima se revela por acción del citrato de amonio férrico que se evidencia por la aparición de un color marrón oscuro (MacFaddin, 2003).

1.2.5 Especies de *Pseudomonas* sp. de importancia ambiental

1.2.5.1 *Pseudomonas fluorescens*

Esta especie se encuentra en diferentes ambientes que van desde plantas, suelo y agua, pueden ser aislados en medios que contiene carbono, crecen a una temperatura óptima de 25 a 30°C.

Se pueden diferenciar al menos cinco subgrupos, biovar I, se considera que es la especie típica de *P. fluorescens*, la cepa tipo pertenece a este grupo juntamente con *P. marginalis*. El biovar II se encuentran las cepas que son saprofitos, aquí se encuentra *P. aurantiaca*, esta cepa ahora es una sub especie de *P. chlororaphis*. Biovar III, que se diferencian entre sí por su capacidad de utilización de ácidos dicarboxílicos. Biovar IV contiene a la cepa tipo *P. lemonnieri*. Biovar V posee propiedades nutricionales heterogéneas y pueden ser cepas que han perdido una o más propiedades de importancia, para ser diagnosticadas en los diferentes biovars, en este biovar se encuentra *P. schuykilliensis* y *P. geniculata* (Garrity *et al.*, 2005).

Pseudomonas fluorescens tiene múltiples aplicaciones, especialmente en la agricultura como promotoras de crecimiento, ya que son excelentes colonizadoras y competentes en la rizósfera de la planta, debido a que se adaptan fácilmente y colonizan la raíz para sobrevivir, esto debido a sus flagelos y la capacidad metabólica que posee, esto le permite combatir y luchar por los mejores nichos ecológicos, también son relacionadas al control biológico de patógenos (Álvarez *et al.*, 2020).

Un elemento fundamental para el desarrollo de todos los organismos vivos es el hierro, la carencia de hierro en el suelo y la rizósfera genera una intensa competencia. *Pseudomonas fluorescens* se caracteriza por la formación de pigmentos, que emiten fluorescencia cuando

se excitan a longitudes de onda bajas. Estos pigmentos pueden formar complejos con el hierro en la rizósfera, y luego ser absorbido por *Pseudomonas* o la propia planta, tal es el caso de la pioverdina. Estos sideróforos como la pioverdina son esenciales para una buena colonización de la rizósfera. Estos ayudan al control biológico de fitopatógenos vegetales que también requieren hierro para sobrevivir. *Pseudomonas* también se caracteriza por la producción de varios metabolitos secundarios, como antibióticos, fungicidas y cianuro de hidrógeno, que pueden afectar directamente a otros fitopatógenos y promover indirectamente el crecimiento de las plantas. Por otro lado, la capacidad de las bacterias para producir ciertos metabolitos secundarios, les brinda una mayor competitividad en la rizósfera y una mayor supervivencia (Martin *et al.*, 2011).

1.2.5.2 *Pseudomonas nitroreducens*

Pertenece a las gramnegativas, es aeróbica, posee flagelos, conocida por su capacidad para reducir compuestos nitroaromáticos, lo que le confiere un potencial biotecnológico y ambiental significativo. Esta especie ha sido aislada en suelos, debido a que son promotoras de crecimiento de las plantas, Y cumple una función clave en el sistema de transporte de nitrato de alta afinidad en las raíces (Trinh *et al.*, 2018). También a sido encontrada en ambientes acuáticos como en aguas residuales, donde encontraron que posee la capacidad de degradar moléculas complejas, como sustancias aromáticas xenobiotixas, y son capaces de tolerar plomo, por ello es que esta especie tiene un rol en los ecosistemas naturales (Bedoya *et al.*, 2021).

Al igual que otras bacterias del género *Pseudomonas*, puede contribuir a los ciclos biogeoquímicos de nitrógeno y otros elementos, ayudando a descomponer compuestos complejos en el medio ambiente. *Pseudomonas nitroreducens*, obtenida de suelos agrícolas contaminados con pesticidas, es capaz de descomponer niveles elevados de clorpirifos, siendo mas eficaz que otros géneros como *Bacillus* (Aswathi *et al.*, 2019). Esta especie posee la capacidad de producir lipasas (Watanabe *et al.*, 1977). Se investiga su uso en la remediación de sitios contaminados con productos químicos como los compuestos nitroaromáticos, que son tóxicos y persistentes en el medio ambiente y pueden ser útiles en el tratamiento de aguas residuales o suelos contaminados en industrias químicas y textiles, que a menudo liberan estos compuestos al medio ambiente (Bedoya *et al.*, 2021).

1.2.6 Relación de *Pseudomonas* con plantas

La relación entre microorganismo y planta, es muy diversa, y muy amplia, en su mayoría son beneficiosas. Se ha explorado una mejoría en la nutrición y crecimiento de la planta, en relación a la fijación de nitrógeno atmosférico, debido a que las plantas no tienen esta capacidad recurren a la simbiosis con microorganismos que les benefician (Ona, 2021).

Pseudomonas también forma parte de un grupo de microorganismos, que pueden beneficiar a las especies de plantas a las que está asociada y aumentar los rendimientos. También se están estudiando a estas cepas, por su capacidad para actuar como agentes biocontrol de microorganismos patógenos, debido a su capacidad para producir diversos antibióticos como pirrolnitrina, fenazinas, 2,4 dietilflutriol, ciclopéptidos, cianuro de hidrogeno y otros compuestos orgánicos volátiles, estos estudios se centraron principalmente en especies de *P. fluorescens*, con más de 37.000 artículos que mencionan esta bacteria como agente de biocontrol, y existen 250 genomas de esta especie disponibles públicamente en bancos como el NCBI (Santamaría, 2021).

Muchas especies del género *Pseudomonas* tienen la habilidad de colonizar raíces, hojas o tallos de plantas, estas viven de los nutrientes que la planta les brinda, *Pseudomonas fluorescens* debido al movimiento flagelar, es capaz de adaptarse rápidamente y colonizar la rizósfera de la planta, a mayor movimiento flagelar mayor motilidad, este género posee actividades de biocontrol de patógenos y promoción del crecimiento vegetal (Álvarez *et al.*, 2020).

1.2.6.1 Importancia biotecnológica de *Pseudomonas*

Este género es capaz de vivir en diferentes hospedadores y ecosistemas, y su adaptabilidad a su medio ambiente, es porque poseen algunos genes o funciones de provecho. Según el estudio realizado por Santamaría (2021) utilizando genomas de diferentes especies de *Pseudomonas*, de diferentes ambientes y nichos como plantas, suelos, humanos, aguas residuales, animales, mamíferos, insectos, peces, nemátodos, algas, hongos y aves. Se ha realizado un estudio de genómica comparativa para estudiar los genes involucrados en la adaptación a distintos ambientes u hospederos. Los resultados del pan - genoma de *Pseudomonas*, muestran que es extremadamente diverso, ya que contiene miles de genes adicionales que están relacionados con alguna fuente de aislamiento, mostrando que la mayoría posee genes relacionados con nichos como el suelo, agua, plantas y animales. Al comparar las secuencias proteicas y sus características metabólicas, se observa una

relación entre las características metabólicas y su fuente de aislamiento, como el metabolismo de aminoácidos y de iones inorgánicos en *Pseudomonas* asociados a seres humanos. Es importante encontrar funciones asociadas que permiten descubrir su adaptabilidad y nos permitan ver las interacciones entre bacteria – hospedador, estos resultados pueden ser utilizados para el desarrollo de procesos biotecnológicos (Santamaría, 2021). Por ello es que este género es citado en diferentes estudios, con capacidad biorremediadora, como por ejemplo algunos poseen la habilidad de producir biosurfactantes, que son útiles en los hidrocarburos, moviendo la fase que no es acuosa en acuosa. En suelos contaminados con petróleo se logró aislar *Pseudomonas aeruginosa*. Este género también posee la capacidad biodegradadora de toxinas ambientales, se encuentran *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas mendocina* que son usadas en biorremediación (Sánchez, 2013).

Existen otras especies como *Pseudomonas fluorescens*, que produce sustancias como insecticidas, como por ejemplo la toxina que ejerce su función sobre el gusano del tabaco *Maduca sexta*, otras se relacionan con las plantas favoreciendo su crecimiento (Sánchez, 2013).

Las características ecológicas de *Pseudomonas* se pueden obtener estudiando interacciones antagónicas y benéficas entre *Pseudomonas*, y otros organismos (Lanteigne *et al.*, 2012), la utilización de enzimas para la disminución de sustancias contaminantes, así como los componentes de los detergentes, son cualidades metabólicas del género *Pseudomonas* (Phukon *et al.*, 2020). Esto nos lleva a analizar compuestos difíciles de degradar, para así poder aislar *Pseudomonas* en lugares contaminados que degraden estos compuestos (Fabryová *et al.*, 2018; Das *et al.*, 2020). De esta forma, futuros estudios metabólicos o ecológicos podrán revelar nuevas aplicaciones biotecnológicas de *Pseudomonas*.

En el proceso de biorremediación se debe tener en cuenta que *Pseudomonas*, al realizar los procesos de degradación, forma diferentes consorcios debido a que interactúa con otros microorganismos. En este proceso crea relaciones simbióticas, como el cultivo mixto de *Rhodococcus erythropolis*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas fluorescens* siendo comensales en la degradación de hidrocarburos poliaromáticos, también *Arthrobacter* y *Pseudomonas* para degradar fluoreno (Gómez *et al.*, 2008), otros ejemplos de *Pseudomonas* rizosféricas en la tabla 2.

Tabla 3. Antecedentes de *Pseudomonas* sp. rizosféricas empleadas en aplicaciones biotecnológicas

Rizobacteria	Planta	Resultados	Autor
<i>Pseudomonas</i> y <i>Bacillus</i>	<i>Persea americana</i>	Control biológico de <i>Phytophthora cinnamomi</i> y <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .	Solórzano, 2023
<i>P. denitrificans</i> , <i>P. aeruginosa</i>	No indica (suelo arrozero)	Desnitrificantes.	Camejo <i>et al.</i> , 2022
<i>Pseudomonas</i> sp.	De un sistema de acuicultura.	Eliminación de nitratos (> 95% en 28 h).	Deng Min <i>et al.</i> , 2021
<i>Bacillus</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> sp.	No indica	Reducción de materia orgánica 99% en aguas residuales.	Sampaio <i>et al.</i> , 2020
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	Rais de <i>Typha latifolia</i>	Tolerante a metales pesados	Rolón, 2020
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rizósfera	Reducción de nitratos, posee enzimas como celulasas, glucanasas, producción de biofilm.	Álvarez <i>et al.</i> , 2020
<i>Herbaspirillum</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp.	No indica	Reducción de materia orgánica 79.7% en aguas residuales.	Tang Gang <i>et al.</i> , 2021
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	No menciona	Eliminación del 96% de nitrato a 30 ° C y un pH de 7,5. Reducción de DQO (79%), nitrógeno total (78%) y nitrógeno amoniacal (85%).	Yu Guanlong <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> sp.	No indica	Reducción de materia orgánica 95.5% en aguas residuales.	Mahesh G. & Manu B., 2019
<i>Pseudomonas</i> sp.	Raíz <i>Mauritia flexuosa</i>	Posee enzimas proteolíticas	Alejandro <i>et al.</i> , 2017

1.2.7 Gen rRNA 16S

Este es un marcador molecular el cual ha sido utilizado para la taxonomía molecular, la codificación de su secuencia puede revelar datos filogenéticos. A través de este marcador es posible conocer la identificación a nivel de especie. Este gen de ADN está conformado por un aproximado de 1500 pb, conformada por regiones altamente conservadas, que se encuentran intercaladas con 9 regiones variables. A las regiones conservadas se unen los cebadores que permiten diferenciar diferentes taxones que va desde arqueas o no, mientras que las regiones variables son las que permiten diferenciar los taxones de diferentes ambientes microbianos. La diferencia en la amplificación de bacterias varía debido a dos aspectos que son: la diferencia entre las regiones conservadas de cada especie bacteriana y la hibridación de los cebadores (Schneyder *et al.*, 2021).

Los factores que influyen en la especificidad taxonómica haciendo uso del gen rRNA 16S son tres, los cuales son necesarios analizar cuidadosamente para evitar sesgos en los resultados (Schneyder *et al.*, 2021):

- Uso de un conjunto de cebadores
- Uso de canales bioinformáticos
- La eliminación de ruido y agrupamiento de la OTU

1.2.8 Secuenciación por Sanger

El método de secuenciación de ADN por Sanger, conocido como una técnica de primera generación, ha sido ampliamente utilizado. Este fue el método empleado para secuenciar el genoma humano durante el proyecto del genoma humano. Aunque en la actualidad no se usa para la secuenciación de genomas completos, sigue siendo muy útil para secuenciar fragmentos relativamente pequeños de ADN, como amplicones o plásmidos. La técnica tiene un límite alrededor de los 1.000 nucleótidos, ya que un nucleótido dideoxi tiende a incorporarse de manera aleatoria antes de alcanzar esa longitud, y los primeros 100 nucleótidos suelen tener una lectura deficiente debido a una baja resolución electroforética. Al final de la secuencia, es común observar una A extra añadida por la polimerasa (Cardona, 2024).

La secuenciación de Sanger se basa en la creación de una hebra complementaria del ADN de interés mediante polimerización y en el uso de dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) que actúan como terminadores de la reacción. Estos nucleótidos están diseñados sin el grupo 3'-OH, lo que impide la adición del siguiente nucleótido, deteniendo así la síntesis de la nueva hebra cuando uno de ellos es incorporado por la polimerasa. Como resultado, se obtienen fragmentos de ADN de diferentes tamaños que se pueden separar por peso molecular a través de una electroforesis (Comonfort, 2022).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDIO

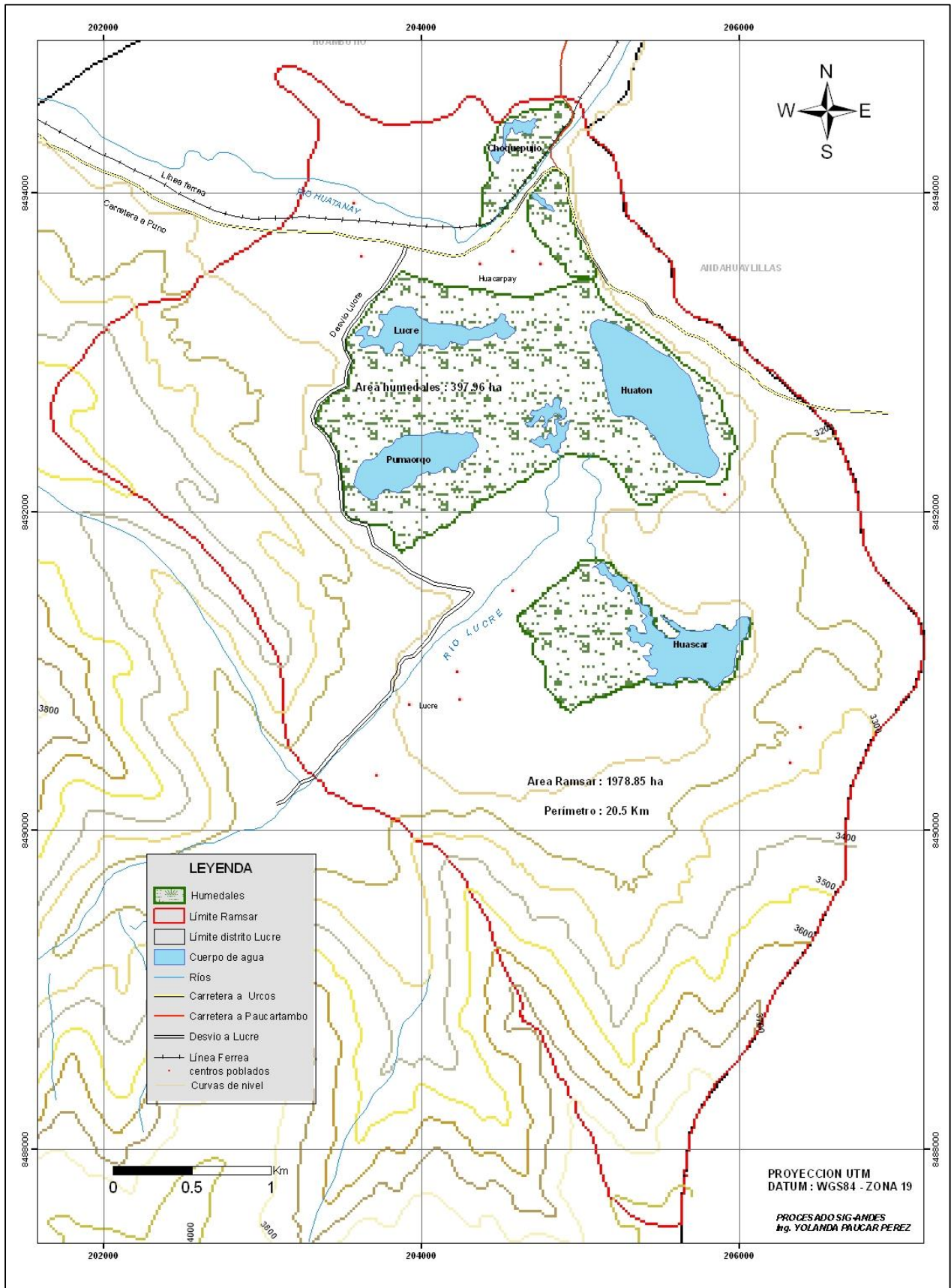
Humedal Lucre - Huacarpay

El humedal Lucre - Huacarpay se encuentra en la microcuenca del río Lucre, y forma parte de la sub cuenca del río Huatanay. El Humedal se sitúa en la parte baja del distrito de Lucre, con las siguientes coordenadas UTM 19L 206300 8497273 a una altitud de 3 086m. Este se encuentra dentro los atractivos turísticos de la región, entre ellas el parque arqueológico de Pikillaqta, ubicada en la parte superior del humedal (La Torre, 2018).

El humedal Lucre – Huacarpay, fue designado como sitio Ramsar en el 2006, así también se le confirió una ley de amparo de patrimonio cultural de la nación, que fue emitida por el Instituto Nacional de Cultura (INC). El nombre de la laguna Huacarpay, proviene de “Wakar” que es el nombre en quechua de un ave, la Garza Blanca (*Ardea alba*), este reside permanentemente en el humedal. Este cuenta con manantiales como Miskiunuyuc, Choquepucyo, Jayapucyo y Mancapucyo, pantanos como Pisconiyoc y Unca también cuenta con dos ríos de salida del humedal, este vierte al río Huatanay y a su vez vierte al río Vilcanota (La Torre, 2018).

Según Venero (2015) el humedal está compuesto por seis espejos de agua permanentes, estos son: Pumaorqo, Waton, Choqepuquio, Muyna, Huacarpay, Pesqoynioc estos conforman un grupo fragmentado de lagunas y pantanos, junto a un área natural con actividades antrópicas, así como se observa en la figura 5.

Figura 5. Mapa base del humedal Lucre - Huacarpay



Fuente: Venero, 2015

Espejo de agua de Waton

El espejo de agua, forma parte de uno de los 6 espejos de agua del humedal de Lucre – Huacarpay, figura 6. Posee una superficie lacustre con 39.71 ha (La Torre, 2018). Este espejo de agua cuenta con un observatorio, figura 7.

Figura 6. *Espejo de agua de Waton del humedal Lucre - Huacarpay*



Figura 7. *Observatorio del humedal Lucre - Huacarpay*



Flora del humedal Lucre - Huacarpay

Se ha determinado 236 especies en el humedal Lucre Huacarpay, con 66 familias, donde destaca la vegetación hidrofítica y halófito con las siguientes especies:

- La vegetación hidrofítica cuenta con un 35.29% dominadas por las especies *Typha angustifolia* “Matará” (Typhaceae), *Typha domingensis* y *Scyrpus californicus* “Totora” (Cyperaceae).
- La vegetación halófito cuenta con un 35.29%, dominadas por las especies *Salicornia cuzcoensis* (Chenopodiaceae), *Ranunculus cimbalaria* (Ranunculaceae), *Distichlis humilis* (Poaceae), *Hydrocotyle bonariensis* (Apiaceae), *Triglochin striatum* (Juncaginaceae), *Hypsela reniformis* (Campanulaceae), *Cotula coronopifolia* (Asteraceae), *Juncus arcticus var. Andicola* (Juncaceae).

En la vegetación del humedal Lucre Huacarpay, destaca la “Totora” ya que es la especie más dominante, el empleo y extracción se realiza sin restricciones (Uquiche 2019).

La vegetación emergente y flotante encontrada se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Flora de la vegetación emergente y flotante del espejo de agua de Waton

Vegetación emergente	
Familia	Especie
Brassicaceae	<i>Rorippa nasthuritium-aquaticum</i> (Berro Blanco)
Asteraceae	<i>Cotula australis</i> (sieber ex. Spreng). HF <i>Cotula corinipifolia</i> L.
Junicaceae	<i>Juncus arcticus</i> var. <i>Andicola</i> <i>Juncus</i> sp.
Aplacea	<i>Hydrocotyle ranunculoides</i> L.B
Caryophyllaceae	<i>Spergularia andina</i> Rohrb.
Cyperaceae	<i>Eleocharis palustris</i> (L.) <i>Scirpus americanus</i> (Macho Totora) <i>Scirpus calyformicus</i> (China Totora) <i>Scirpus</i> sp. (Totorilla) <i>Cyperus</i> sp.
Camapanulaceae	<i>Lobelia</i> sp.
Poaceae	<i>Phragmites australis</i> (Cav)Trin.ex Steud (Carrizo)
Typhaceae	<i>Typha dominguensis</i> pers.
Scrophulariaceae	<i>Veronica serpyllifolia</i> L. <i>Veronica pergrina</i> L. <i>Limosella aquatica</i> L.
Juncaginaceae	<i>Triglochin striatum</i> R & P
Vegetación flotante	
Salviniaceae	<i>Azolla filiculoides</i> Lam. (Helecho de agua)
Lemnaceae	<i>Lemna giba</i> (Lenteja de agua)
Zygnemataceae	<i>Spirogyra crossa</i> Kutz <i>Zygnema</i> sp.
Cladophoraceae	<i>Cladophora glomerata</i> (L) Kytz.

Fuente: Uquiche (2019)

Fases del trabajo de investigación

El trabajo de investigación se realizó en dos fases:

- Toma de muestra (1ra fase)
- Procesamiento de muestra (2da fase)

En la primera fase, se realizó la toma de muestra de la rizósfera de *Typha dominguensis* en el espejo de agua de Waton del humedal de Lucre - Huacarpay, Quispicanchi, Cusco.

La toma de muestra de *Pseudomonas* sp. de la raíz de *Typha dominguensis*, se realizó mediante colecta directa de la especie vegetal, en tres puntos diferentes con las siguientes coordenadas (tabla 5 y figura 8). Se tomó un ejemplar de la planta colectada, para su identificación taxonómica por el Herbario Vargas Cuz de la Facultad de Ciencias Biológicas, así mismo se tramitó el permiso de colecta de la planta, por la entidad competente SERFOR.

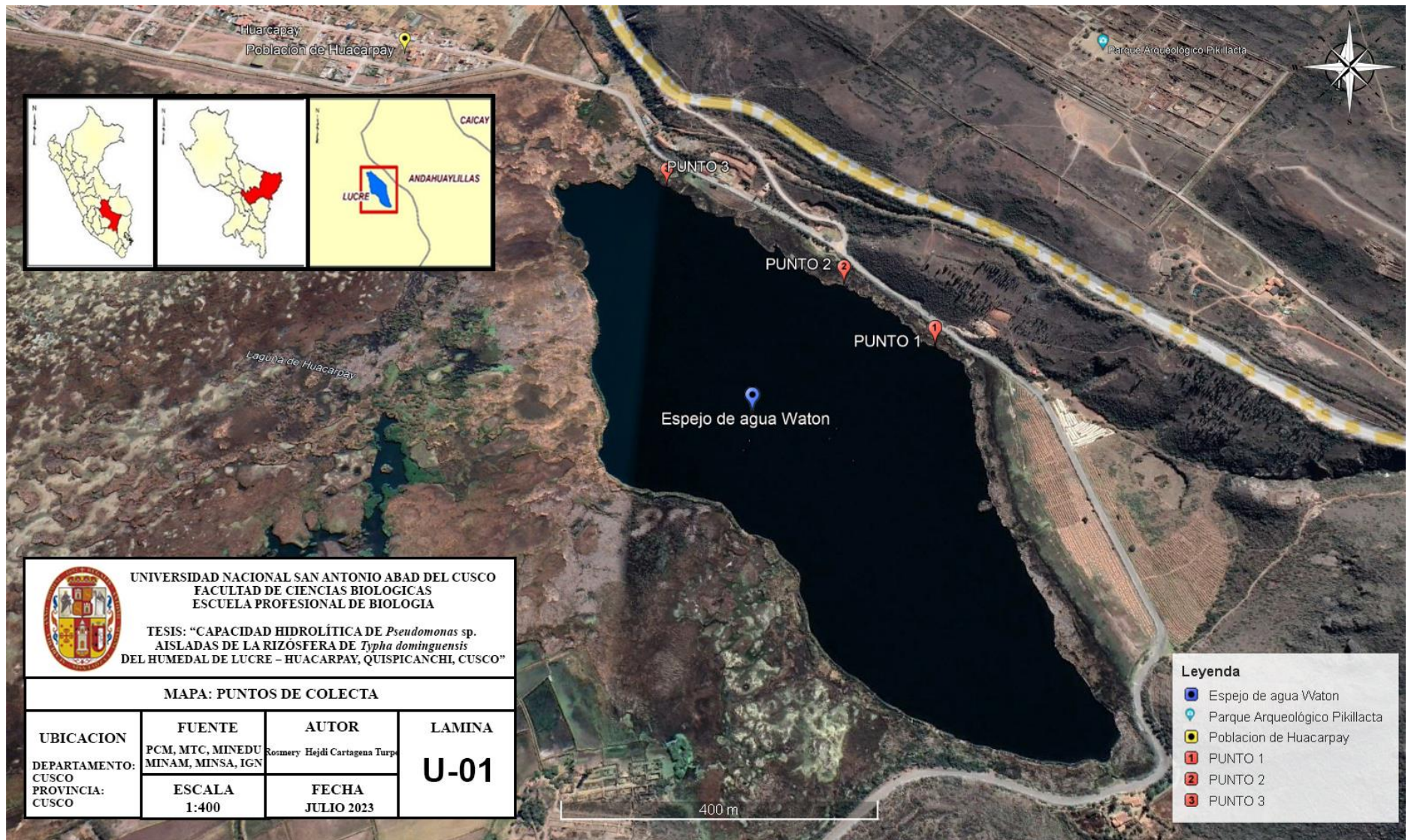
Tabla 5. *Coordenadas geográficas de los puntos de colecta de la rizósfera de Typha dominguensis*

Puntos de colecta	Número de plantas colectadas	Coordenadas	Altitud
Punto 1	01	19L 205680.01 8492864.07	3134m
Punto 2	01	19L 205537.03 8492979.70	3129m
Punto 3	01	19L 205231.79 8493175.29	3126m

Se realizaron dos muestreos, la primera en época de lluvias, el 25 de marzo y la segunda en época de secas, el 20 de mayo de 2023. Para ambos muestreos, los puntos de colecta fueron los mismos.

En la segunda fase, se realizó el procesamiento de muestras como el aislamiento, identificación y pruebas de capacidad hidrolítica. Las muestras fueron transportadas en cadena de frío a 4°C. Siendo procesadas ese mismo día, en el Laboratorio Institucional de Microbiología e Inmunología (LIMI) de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Figura 8. Mapa de los puntos de colecta de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay - Quispicanchi - Cusco



2.2 MATERIALES

2.2.1 Material biológico

- Muestras de la rizósfera de *Typha Dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay - Quispicanchi - Cusco.

2.2.2 Material de laboratorio

2.2.2.1 Equipos

- Incubadora (Binder modelo ED 11 E2)
- Autoclave (Austester modelo 437.P)
- Autoclave (Phoenix modelo AV-75plus)
- Balanza analítica (OHAUS modelo E11140)
- Cabina de bioseguridad (TELSTAR BIO-II-A modelo 21740)
- Destilador de agua (GLF modelo Typ 2004)
- Vórtex (Biosam modelo V-32)
- Microscopio óptico (ZEIZZ modelo 12V DC 30W)
- Horno pasteur (Binder modelo ED 115 E2)
- Congeladora (Double Action Clodex modelo Ch10)
- pH Metro (ADWA modelo AD 12)
- Cámara digital

2.2.2.2 Reactivos

- Cloruro de calcio (MERCK)
- Cloruro de sodio (MERCK)
- Cloruro de mercurio (MERCK)
- Ácido clorhídrico concentrado (MERCK)
- Fosfato di potasico (J. T. BAKER)
- Azul de bromotimol (MERCK)

- Ácido sulfanílico (MERCK)
- Ácido acético 5N (MERCK)
- Cloroformo (MERCK)
- L-Arginina (OXOID)
- Lugol (MERCK)
- Kit de tinción Gram (HIMEDIA)
- Polvo de zinc (OXOID)
- α -naftol (MERCK)
- BBL Oxidase Reagent Droppers (BD)

2.2.2.3 Medios de cultivo

- Agar nutritivo (MERCK)
- Agar bilis esculina (DIFCO)
- Agar agar (MERCK).
- Agar cetrimide (MERCK)
- Agar tripticasa soya (MERCK)
- Agar ADN (MERCK)
- Agar Muller Hinton (MERCK)
- Agar pseudomonas (OXOID)
- Agar TSI (LIOFILCHEN)
- Agar LIA (BD)
- Agar Citrato Simmons (BD)
- Agar MIO (BD)
- Agar urea (BD)

- Caldo RM-VP (HIMEDIA)
- Caldo nitrato (OXOID)
- Caldo BHI (MERCK)
- Peptona (BD)
- Peptona de caseína (ONDA)
- Leche descremada (OXOID)
- Almidón (MERCK)
- Glucosa (RIEDEL – DEHAEN)
- Gelatina (SIGMA)
- Tween 20 (MERCK)
- Tween 80 (MERCK)

2.2.2.4 Materiales de vidrio

- Placas petri de 100mm x 20mm.
- Placas petri de 60mm x 15mm.
- Tubos de vidrio tapa rosca de 13mm x 10mm.
- Tubos de ensayo de 13mm x 10mm.
- Probetas volumétricas de 100ml, 250 ml y 500ml.
- Vasos de precipitado de 600ml.
- Frascos estériles de 100ml, marca NIPRO
- Pipetas de 1ml, 2ml y 10ml.

2.2.2.5 Otros materiales de laboratorio

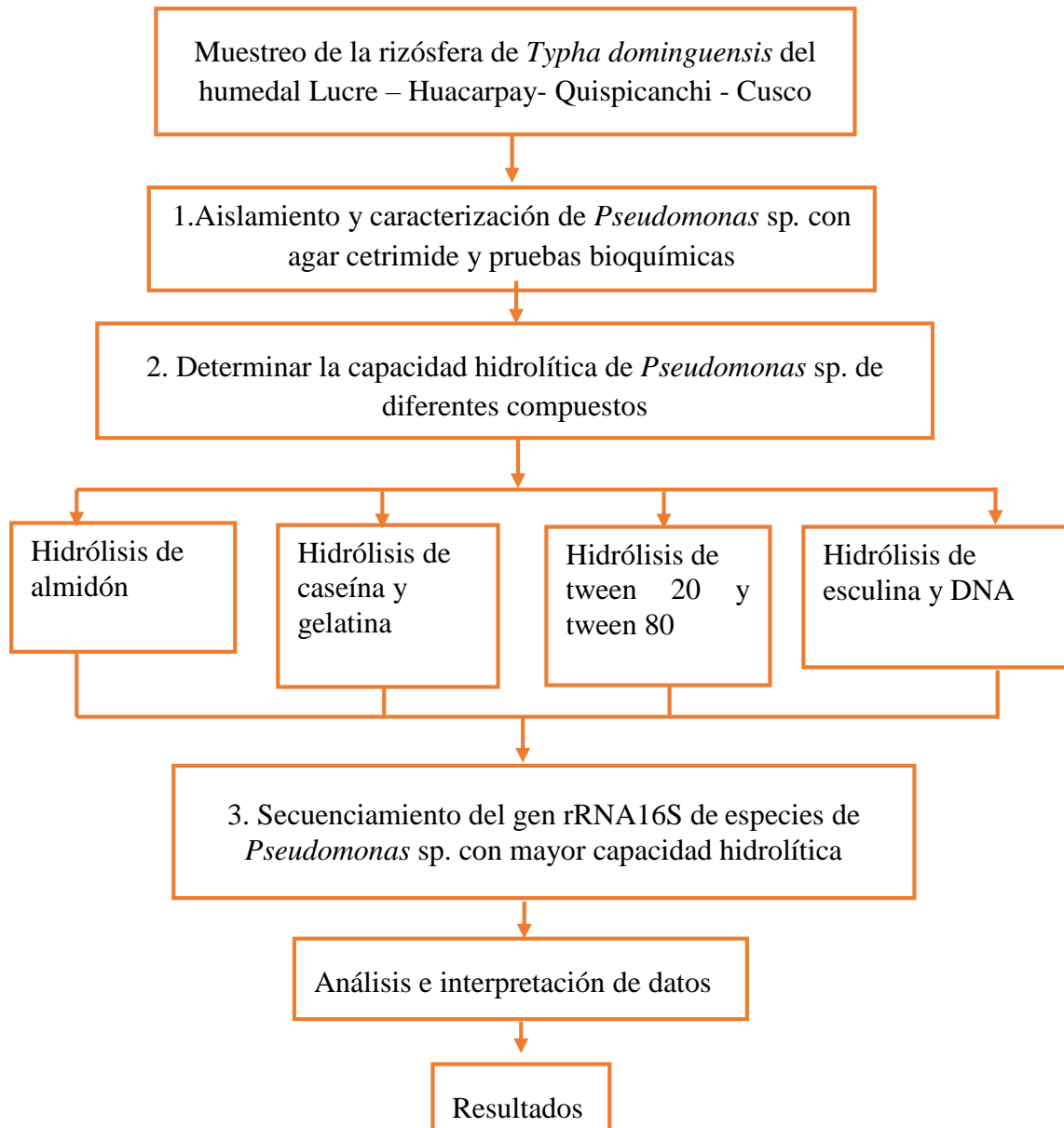
- Micropipetas
- Puntas de 100 μ L
- Mechero de campo

- Bolsas conservadoras estériles
- Filtro de membrana de 0,2u de porosidad y 47mm de diámetro
- Gradillas.
- Asas y agujas de siembra.
- Bolsas plásticas.
- Algodón.
- Mascarilla.
- Lejía.
- Detergente.
- Goteros de plástico de 2ml.
- Papel toalla.
- Papel kraft.
- Cooler
- Plumón indeleble
- Etiquetas de muestra
- Cuaderno de apuntes y lapiceros
- Alcohol
- Papel aluminio
- Mechero bunsen
- Aceite mineral (MERCK)

2.3 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación es de tipo experimental.

2.4 CAPACIDAD HIDROLÍTICA DE *Pseudomonas sp.* DE LA RIZÓSFERA DE *Typha dominguensis* DEL HUMEDAL LUCRE – HUACARPAY – QUISPICANCHI - CUSCO



2.5 MÉTODOS

2.5.1 Muestreo de la rizósfera de *Typha dominguensis*

Se tomó un ejemplar de *Typha dominguensis* según la clave taxonómica del género *Typha* (anexo 1) por cada punto de colecta del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco. Se aplicó el protocolo planteado por Muratova (2003):

- Primero se removió el suelo no rizosférico de las raíces
- Se procedió al lavado de la raíz con 100 ml de agua destilada estéril.
- Luego, el lavado fue vaciado a un frasco estéril de 200 ml, en condiciones estériles.
- Se realizó el rotulado del frasco estéril, con código, fecha y número de muestra.
- En cada punto de colecta se tomó los parámetros de pH y temperatura.
- Las muestras fueron transportadas en cadena de frío a 4°C, en un tiempo no mayor a 2 horas.

2.5.2 Aislamiento de *Pseudomonas* sp. de la rizósfera de *Typha dominguensis*

- Se agitó por 30 minutos usando vortex, el frasco con 100 ml del lavado, donde las partículas del suelo fueron sedimentadas.
- Con la suspensión se preparó diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} en agua peptonada al 0,1 %, para revivificar a *Pseudomonas* sp.
- Posteriormente, fueron sembradas por agotamiento en superficie, en tres placas de agar cetrimide por cada dilución, para ser incubadas a 25°C por 24 horas.

2.5.3 Observación de las características de la cepa ATCC 13525 *Pseudomonas fluorescens*

Para poder caracterizar correctamente a *Pseudomonas* sp. se utilizó, la cepa *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, que fue activada según las instrucciones del fabricante, también fue sometida a diferentes pruebas para observar sus características, con el propósito de comprobar el correcto funcionamiento de los medios y reactivos usados en las pruebas bioquímicas como:

- Tinción Gram
- Oxidasa
- Fluorescencia en 04 medios diferentes: Agar Muller Hinton, agar cetrimide, agar King B, agar pseudomonas.

- Características de la colonia en agar cetrímide
- Oxidación de la glucosa
- Nitrato
- Crecimiento a 42° C
- Prueba de gelatina
- Prueba de almidón
- Prueba de esculina
- Triple Sugar Iron (TSI)
- Lisina Hierro Agar (LIA)
- Motilidad Indol Ornitina (MIO)
- Citrato de Simmons
- Urea
- Rojo de metilo
- Voges Proskauer,

2.5.4 Caracterización de *Pseudomonas* sp. por pruebas bioquímicas

Se seleccionó del agar nutritivo de 24 horas, cepas puras que se encuentren aisladas, para observar las características visibles de las colonias de *Pseudomonas* sp. (Muratova, 2003). Posteriormente se realizó tinción Gram y pruebas bioquímicas de microbiología básica como Triple Sugar Iron (TSI), Lisina Hierro Agar (LIA), Motilidad Indol Ornitina (MIO), Citrato de Simmons, Urea, Rojo de metilo y Voges Proskauer, que permitió conocer el género *Pseudomonas*. Con la ayuda de la clave bioquímica para la taxonomía bacteriana del género *Pseudomonas*, según Nicola (2010) y Garrity *et al.* (2005) se realizó mas pruebas para conocer la especie, oxidasa, oxidación de la glucosa, fluorescencia, reducción de nitrato, crecimiento a 42°C, gelatina, almidon y esculina (anexo 2).

2.5.4.1 Oxidasa

La prueba consiste en la obtención de la enzima indo fenol oxidasa, que oxida un colorante redox que se encuentra en el reactivo, lo que genera una transformación del color amarillo a morado oscuro.

Esta enzima en presencia de oxígeno atmosférico, oxida el reactivo de fenilendiamina oxidasa, para formar un compuesto de color morado oscuro, el indo fenol.

Se utilizó BBL oxidasa reagent droppers, cuya reacción cualitativa, sirve para la identificación de bacterias Gram negativas.

- Para ello debe romperse las ampollas de los droppers, cerca de la parte central, para no perforar el plástico.
- Los cultivos deben ser recientes de 18 a 24h, con colonias aisladas.
- Luego añadir unas gotas del reactivo a una banda de papel filtro estéril, y con un asa de madera, extender sobre la banda de papel que fue saturado con el reactivo. No se debe usar asas de acero, puede dar lugar a falsos negativos.

La reacción es inmediata en un aproximado de 30 s como máximo, el cambio de color a purpura o violeta, indica que la prueba es positiva, mientras que la ausencia significa que es negativa (BD, 2015).

2.5.4.2 Oxidación / Fermentación (OxFerm)

Esta prueba consiste en que, si un microorganismo es capaz de metabolizar la glucosa, mediante la oxidación o fermentación. El medio utilizado es Hugh Leifson, fórmula para un litro que se prepara de la siguiente manera (tabla 6):

Tabla 6. *Composición del medio Hugh Leifson*

Composición para 1L	
Componentes	Cantidad (g)
Peptona de caseína	2,00
Fosfato di potásico	0,30
Cloruro de sodio	5,00
Azul de bromotimol	0,03
Agar bacteriológico	2,50
Aditivo (Glucosa)	10.00

Fuente: MacFaddin, 2003

- El medio fue esterilizado a 118°C durante 10 minutos, para evitar la degradación del azúcar, luego fue distribuido en tubos de 5 ml.
- Posteriormente se inoculó un cultivo puro de la cepa de *Pseudomonas* sp. aislada, en dos tubos diferentes, uno para condiciones aerobias y el otro para anaerobiosis.
- A los tubos se le agregó 2 ml de aceite mineral estéril y ambos tubos fueron incubados a temperatura óptima por 24 horas.

Al realizar la lectura las que respiran aerobiamente (tubo abierto), crecieron en la superficie oxidando la glucosa y produciendo dióxido de carbono que, al reaccionar con el agua del medio, hace que vire ligeramente amarillo por la formación del ácido carbónico; mientras que, en el tubo cerrado, el cultivo permanece del mismo color sin cambio alguno. Si las bacterias realizaron la fermentación de la glucosa estas produjeron ácidos, haciendo que el tubo cerrado y el tubo abierto vire a un color amarillo. El cambio de color se debió al azul de bromotimol que es un indicador ácido base (MacFaddin, 2003).

2.5.4.3 Reducción de nitratos

Según MacFaddin (2003) se utilizó el caldo nitrato que contiene (tabla 7):

Tabla 7. Composición de caldo nitrato

Composición para 1L	
Componentes	Cantidad (g)
Extracto de levadura	3,0
Peptona	5,0
Nitrato de potasio	1,0

Fuente: MacFaddin, 2003

- A un pH de 7,0 que fue esterilizado en autoclave por 15 min a 121°C
- Luego se sembró e incubó a 25°C por 12 a 24 horas
- Para el revelado se añadió 2 gotas de solución A:
 - Ácido sulfanílico 8,0 g
 - Ácido acético 5N 1000,0 ml
- Luego se añadió 2 gotas de solución B:
 - α -naftol 5,0 g
 - Ácido acético 5 N 1000,0 ml

Para realizar la lectura, se consideró como positivo a la aparición de una coloración rosada o roja, lo que indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito, mientras que la ausencia del cambio de color indica que es negativa, para comprobar este resultado es necesario añadir a la reacción negativa, polvo de Zinc, debido a que es probable que los nitratos fueron reducidos a N₂ gaseoso y esta reacción no produce cambio de color; Por ello es necesario comprobar. Si el medio viró a una coloración rosada o roja, el resultado fue negativo, en caso no se produzca el cambio de color, significa que se ha producido una desnitrificación, donde los nitratos fueron reducidos a N₂ gaseoso y por lo tanto la prueba fue positiva (MacFaddin, 2003).

2.5.4.4 Crecimiento bacteriano a 42 °C

Esta prueba permite diferenciar especies del género *Pseudomonas*. Se sembró cultivos puros mediante estrías en tubos y placas de agar cetrimide, para posteriormente ser incubadas a 42°C por un periodo de 24 hasta 48 horas, donde se observó el crecimiento de *Pseudomonas* sp. (MacFaddin, 2003).

2.5.4.5 Triple azúcar hierro (TSI)

Esta prueba permite observar la fermentación de tres azúcares: glucosa, lactosa y sacarosa, así como también la formación de gas (formación de burbujas) y producción de ácido sulfhídrico (ennegrecimiento del medio), estas reacciones se pueden observar por el cambio de color que vira de un color rojo a un amarillo, por la acidificación del medio. Se preparó el medio según las especificaciones de la marca (LIOFILCHEN) (Sulkin & Willett, 1940).

2.5.4.6 Lisina Hierro Agar (LIA)

Esta prueba permite observar si la bacteria es capaz de realizar la desaminación o descarboxilación de la lisina, así como también la producción de ácido sulfhídrico, esta reacción se observa por el cambio del color o no en el medio. Se preparó el medio según las especificaciones de la marca (BD) (Murray *et al.*, 2003).

2.5.4.7 Citrato de Simmons

Esta prueba permite observar si la bacteria es capaz de utilizar el citrato como fuente de carbono, haciendo que el medio vire a un color azul producto de la enzima citrato pemeasa, que produce oxalacetato y piruvato y alcaliniza el medio, generando el cambio de color. Se preparó el medio según las especificaciones de la marca (BD) (Murray *et al.*, 2003).

2.5.4.8 Motilidad, Ornitina e Indol

Esta prueba permite observar la movilidad de las bacterias, así como también la descarboxilación de ornitina, por la enzima ornitina descarboxilasa que produce putrescina el medio vira a un color purpura, esta reacción es favorable en condiciones de acidez, que se genera por la fermentación de la glucosa, haciendo que el medio vire a un color amarillo. También se observa la presencia de la enzima triptofanasa por la presencia de triptófano, que es necesario para la formación del indol, añadiendo el reactivo de Kovac's, se observa esta reacción, al observar un anillo rojo en la superficie del medio. Se preparó el medio según las especificaciones de la marca (BD) (Murray *et al.*, 2003).

2.5.4.9 Urea

Esta prueba permite observar si la bacteria usa urea como única fuente de nitrógeno, y son capaces de hidrolizar urea, por la acción de la enzima ureasa que genera dos moléculas de amoníaco, lo que acidifica el medio haciendo que vire a un color rosa o fucsia. Se preparó el medio según las especificaciones de la marca (BD) (Murray *et al.*, 2003).

2.5.4.10 Rojo de metilo y Voges Proskauer

Esta prueba permite observar la diferencia en el metabolismo de la glucosa, por la vía ácido mixta, produciendo productos ácidos como: ácido láctico, ácido acético o ácido fórmico; generando un anillo rojo al añadir el reactivo rojo de metilo; o si produce productos finales neutros por la vía butanodiólica, generando un anillo rojo al añadir alfa naftol e hidróxido de potasio. Se preparó el medio según las especificaciones de la marca (HIMEDIA) (MaccFaddin, 2003).

2.5.5 Determinación de la capacidad hidrolítica

2.5.5.1 Hidrólisis de almidón

Esta prueba se realizó para observar si *Pseudomonas* sp., tiene la enzima que puede hidrolizar el almidón.

- Como medio basal se utilizó agar nutritivo
- Luego se disolvió 20 g de almidón en 1 litro de agua destilada, se autoclavó y se distribuyó.
- Luego se inoculó en el medio y se incubó a 25°C durante 18 hasta 24 horas.
- Para el revelado se añadió Lugol unas gotas sobre la placa.

La prueba fue positiva cuando se observó un área incolora bordeando la colonia bacteriana, y negativa cuando no presentó el halo incoloro y todo el medio permanece de color púrpura azul (MacFaddin, 2003).

2.5.5.2 Producción de proteasas

Las cepas fueron evaluadas por la presencia de enzimas que hidrolizan las proteínas caseína y gelatina.

2.5.5.2.1 Hidrólisis de la caseína

Para la hidrólisis de la proteína caseína:

- Se sembró en un medio que tiene dos fases, la primera compuesta por agar tripticosa soya 20 g en 250 ml de agua destilada, y la otra por leche descremada 10 g en 250 ml de agua destilada. Cada fracción fue esterilizada por separado.
- La primera fase, durante 30 minutos a una temperatura de 115 °C.
- La segunda fase, durante 10 min a una temperatura de 115 °C, para evitar la desnaturalización de la proteína. Después esta solución fue enfriada a 45 °C, posteriormente se mezcló las dos fases y fue distribuida.
- Las cepas de *Pseudomonas* sp., fueron inoculadas con una estría central gruesa y se incubó a 25 °C por 5 días.

Al realizar la lectura se observó un halo de color transparente que rodea la colonia bacteriana, lo que indica que la bacteria puede hidrolizar la proteína caseína (Prescott, 2002 citado en Salgado *et al.*, 2012a).

2.5.5.2.2 Hidrólisis de la gelatina

Para la hidrólisis de gelatina:

- Se preparó agar nutritivo añadiendo 0,4% de gelatina a un pH de 7,2.
- Se esterilizó en autoclave durante 115 °C por 20 minutos.
- Se inoculó las cepas mediante una estría y se incubó a 25°C de 2 a 14 días.

Para revelar el ensayo se inundó las placas con 10ml de la solución de cloruro mercuríco que contiene lo siguiente:

- Ácido clorhídrico concentrado 20 ml
- Cloruro de mercurio 15 g

- Agua destilada 100 ml

Para realizar la lectura se dió como positivo a la aparición de una zona transparente rodeando la estría, fue negativo cuando la solución formó un precipitado blanco opaco (Prescott, 2002 citado en Salgado *et al.*, 2012a).

2.5.5.3 Producción de lipasas

Las lipasas se producen en carbono lipídico, como ácidos grasos, aceites, glicerol o tween (Gupta, 2004 citado en Salgado *et al.*, 2012a), por ello se evaluó la hidrólisis de lipasas mediante el medio tween 20 y tween 80. Los tweens al poseer en su estructura el ácido láurico o el ácido oleico que, mediante la acción de una lipasa (Lizano, 2012), son hidrolizados en ácidos grasos que reaccionan con un compuesto alcalino o sal (cloruro de calcio) del medio, forman cristales de jabones de calcio, producto de la saponificación (Garrity *et al.*, 2005; Moreno, 2021). Los tweens al ser compuestos tenso activos no afectan a la actividad de la enzima lipasa (García, 2018).

2.5.5.3.1 Hidrólisis del tween 20

Se preparó el medio agar tween 20 a un pH final 7,0 a 7,4 que contiene lo siguiente (tabla 8).

Tabla 8. Composición medio agar tween 20

Composición para 1000ml	
Componentes	Cantidad (g)
Cloruro de calcio	0,1
Tween 20 (mono laurato de polioxietilen sorbitano)	10ml
Peptona	10,0
Agar	15,0
Cloruro de sodio	5,0

Fuente: Gupta, 2004 citado en Salgado *et al.*, 2012a

Las cepas de *Pseudomonas* sp. fueron sembradas mediante una estría, e incubadas a 25° C por un periodo de 7 días.

Fue positivo cuando en el medio de cultivo, se observó un precipitado rodeando el crecimiento bacteriano. Esto se debe a la mezcla de los ácidos grasos con Ca²⁺ que fueron liberados por la hidrólisis. Es negativa la prueba cuando no se observó el precipitado (Gupta, 2004 citado en Salgado *et al.*, 2012a).

2.5.5.3.2 Hidrólisis del tween 80

Se preparó el medio agar tween 80 a un pH final 7,0 a 7,4 que contiene lo siguiente (tabla 9).

Tabla 9. Composición medio agar tween 80

Composición para 1000ml	
Componentes	Cantidad (g)
Cloruro de calcio	0,1
Tween 80 (mono oleato de polietilen sorbitan, éster del ácido oléico)	10ml
Peptona	10,0
Agar	15,0
Cloruro de sodio	5,0

Fuente: Gupta, 2004 citado en Salgado *et al.*, 2012a

Las cepas de *Pseudomonas* sp. fueron sembradas mediante una estría, e incubadas a 25° C por un periodo de 7 días.

Fue positivo cuando en el medio de cultivo, se observó un precipitado rodeando el crecimiento bacteriano. Esto se debe a la mezcla de los ácidos grasos con Ca²⁺ que fueron liberados por la hidrólisis. Es negativa la prueba cuando no se observó el precipitado (Gupta, 2004 citado en Salgado *et al.*, 2012a).

2.5.5.4 Hidrólisis de otros compuestos

2.5.5.4.1 Hidrólisis de esculina

Esta prueba se realizó para definir si un microorganismo es capaz de hidrolizar la esculina (glucósido) para producir esculetina y dextrosa.

- Se utilizó agar bilis esculina, se preparó el medio según las especificaciones, se autoclavó a 121°C durante 15min y distribuyó.
- Luego fueron inoculadas las cepas bacterianas mediante estrías y se incubó de 24 hasta 48 horas a una temperatura de 25°C.

La prueba fue positiva cuando la mitad o todo el medio viró de color castaño oscuro a un color negro, y fue negativa cuando no se presentó el cambio de color o el ennegrecimiento (MacFaddin, 2003).

2.5.5.4.2 Hidrólisis de DNA

Esta prueba permite ver la producción de DNAsas.

- Se utilizó el agar DNA, se autoclavó a 121°C durante 15min y se distribuyó en las placas correspondientes.
- Luego se sembró las cepas y se incubó a 25°C por 24 horas.

Para realizar la lectura se añadió sobre la placa HCl 1N, el cual hace que el ADN precipite lo que genera la opacidad, la reacción fue positiva cuando los microorganismos productores de la enzima presentan un halo más claro que rodea el crecimiento bacteriano (MacFaddin, 2003).

2.5.6 Secuenciamiento del gen rRNA 16S

Las cepas aisladas de *Pseudomonas* sp., que presentaron mayor capacidad hidrolítica, fueron enviadas al laboratorio BIOTECOOP con la orden de servicio N°060524, para su identificación molecular, donde realizaron la extracción del DNA usando el Kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research), y posteriormente la amplificación del gen rRNA 16S. Los cebadores utilizados fueron 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (Heuer *et al.*, 1997). El producto de la amplificación fue secuenciado por Macrogen (Chile).

CAPÍTULO III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PUNTOS DE COLECTA DE LAS ESPECIES DE *Pseudomonas* sp. AISLADAS DE LA RAÍZ DE *Typha dominguensis*

Los muestreos de la rizósfera de *Typha dominguensis* fueron realizados en dos temporadas, lluvias en el mes de marzo y secas en el mes de mayo, según lo menciona Canal & Torres (2023) el clima del humedal Lucre Huacarpay, tiene dos periodos marcados, la temporada de lluvias (noviembre a marzo) y la temporada de secas (abril a octubre), siendo los meses más lluviosos de enero a febrero. La colecta del ejemplar de *Typha dominguensis* (figura 10), cuenta con la autorización de SERFOR (anexo 3), y la identificación taxonómica en el Herbario Vargas Cuz de la Facultad de Ciencias Biológicas (anexo 4). Cabe mencionar que la extracción de esta planta fue riguroso por el difícil acceso, ya que *Typha dominguensis*, presenta tallo rizomatoso que emite raíces adventicias gruesas, debido a su carácter hidrófilo, avanza sumergido hacia el interior de la laguna (La Torre, 2018).

Se tuvieron tres puntos de colecta en el espejo de agua de Waton que pertenece al humedal de Lucre - Huacarpay. Estos puntos de colecta fueron seleccionados debido a la facilidad del acceso y al proceso de eutrofización. En cada punto de colecta se realizaron los registros de temperatura y pH (tabla 10), los datos de pH se encuentran en el rango de 7.05 a 7.30; lo que indica que todas las muestras se encuentran con un pH neutro. En cuanto a la temperatura, este varió según los meses de muestreo de la rizósfera de *Typha dominguensis*, para el primer muestreo que se realizó en el mes de marzo, se registró una temperatura promedio de 17.4 °C, para el segundo muestreo en el mes de mayo se registró una temperatura promedio de 15.3 °C (tabla 10). La temperatura media anual del humedal Lucre - Huacarpay, es de 12.3°C (Canal y Torres, 2023). Estos resultados nos ayudan a conocer las características de temperatura y pH del ambiente, del cual fueron aisladas.

Tabla 10. Características de los puntos de colecta de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay - Quispicanchi - Cusco.

Puntos de colecta	Coordenadas	Primer muestreo		Segundo muestreo		Observaciones
		T	pH	T	pH	
Punto 01	19L 205680.01 8492864.07	17.4	7.16	15.8	7.07	Punto más alejado al área de eutrofización.
Punto 02	19L 205537.03 8492979.70	17.6	7.10	15.1	7.29	Punto intermedio entre el punto 1 y 2.
Punto 03	19L 205231.79 8493175.29	17.2	7.05	14.9	7.30	Punto más cercano al área de eutrofización.

Se logró aislar un total de 33 cepas de *Pseudomonas* sp. de la rizósfera de *Typha dominguensis*, que fueron codificadas con el código “LHN°Ps-N°”, las letras “LH” hacen referencia al lugar del cual fueron aisladas Humedal Lucre Huacarpay, seguido por el número de muestreo y el número de cepa de *Pseudomonas* (tabla 11). Las cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas fueron organizadas según la época de muestreo y los puntos de colecta. Se observa que no hay diferencia en la cantidad de cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas frente a la época de muestreo, el 49% representan a cepas aisladas en la época de lluvias y el 51 % en época de secas (tabla 11).

Tabla 11. Cepas de *Pseudomonas sp.* aisladas según la época de muestreo de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay - Quispicanchi - Cusco.

Muestreo	Código de cepas aisladas	Puntos de colecta		
		Punto 1	Punto 2	Punto 3
Primer muestreo (Época de lluvias) Porcentaje de cepas aisladas - 49%	LH1Ps-1	x		
	LH1Ps-2	x		
	LH1Ps-3		x	
	LH1Ps-4		x	
	LH1Ps-5		x	
	LH1Ps-6		x	
	LH1Ps-7		x	
	LH1Ps-8			x
	LH1Ps-9			x
	LH1Ps-10			x
	LH1Ps-11			x
	LH1Ps-12			x
	LH1Ps-13			x
	LH1Ps-14			x
	LH1Ps-15			x
	LH1Ps-16			x
Segundo muestreo (Época de secas) Porcentaje de cepas aisladas - 51%	LH2Ps-17	x		
	LH2Ps-18	x		
	LH2Ps-19	x		
	LH2Ps-20		x	
	LH2Ps-21		x	
	LH2Ps-22		x	
	LH2Ps-23		x	
	LH2Ps-24		x	
	LH2Ps-25			x
	LH2Ps-27			x
	LH2Ps-28			x
	LH2Ps-29			x
	LH2Ps-30			x
	LH2Ps-31			x
	LH2Ps-32			x
	LH2Ps-33			x
	LH2Ps-34			x
		Total	5	10
	Porcentaje	15%	30%	55%

En el punto de colecta 3, se pudo aislar mayor cantidad de cepas en un 55%, probablemente por la cercanía a la zona eutrofizada. Estos resultados nos ayudan a conocer la posible relación que habría entre las bacterias y las características del ambiente de las que fueron aisladas como se observa en la figura 9. La colecta de la rizósfera de *Typha dominguensis* se observa en la figura 10.

Figura 9. Cepas de *Pseudomonas sp.* aisladas según el punto de colecta de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay - Quispicanchi - Cusco.

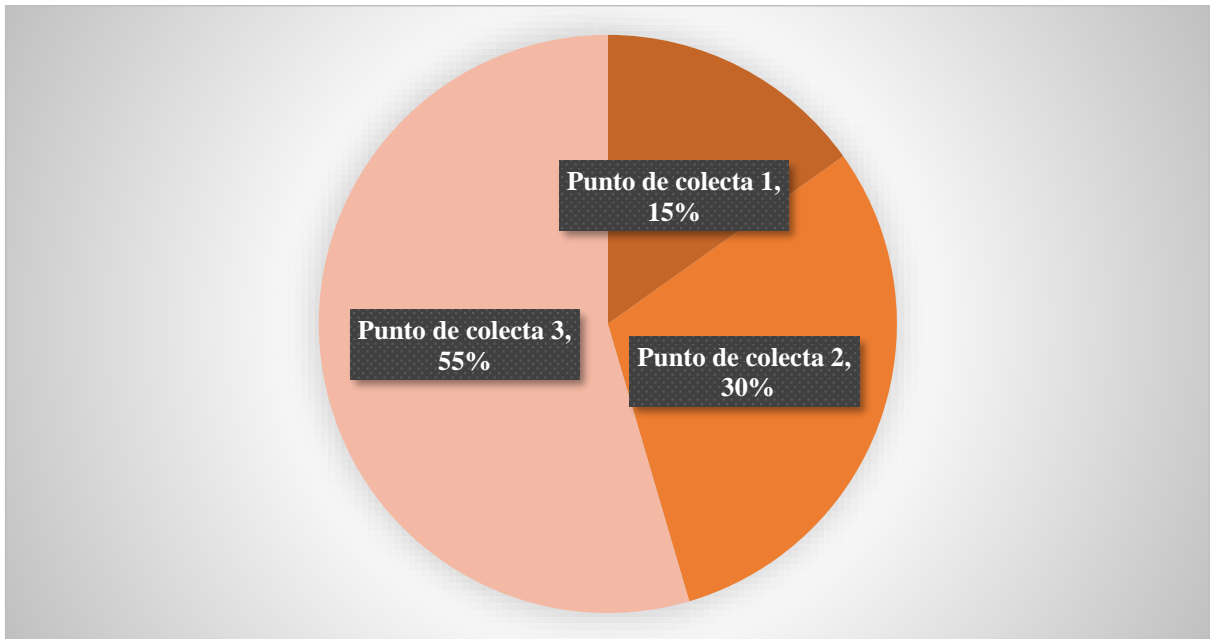


Figura 10. *Colecta de la rizósfera de Typha dominguensis del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.*



Nota. A, Obtención de *Typha dominguensis*. B, Raíz de *Typha dominguensis* siendo colocada dentro de la bolsa ziploc con agua destilada esteril. C, Lavado de la raíz. D, Devolución del lavado de la muestra a envase esteril. E. Medición de parámetros de pH y temperatura

3.2 CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA ATCC 13525 *Pseudomonas fluorescens*

Una vez activada la cepa *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, se procedió con la observación de las características, usando diferentes medios de cultivo como se observa en la tabla 12.

Tabla 12. Características bioquímicas de la cepa *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525

Prueba bioquímica	Resultado
Tinción Gram	Bacilo Gram negativo
Oxidasa	Positivo
Fluorescencia:	Positivo
Agar Muller Hinton	
Agar King B	
Agar pseudomonas	
Agar cetrimide	
Característica de la colonia en agar cetrimide	
Color	Verde crema
Forma	Circular
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Consistencia	Cremosa
Fermentación glucosa, lactosa y sacarosa	Negativo
Producción de gas	Negativo
Descarboxilación de la lisina	Positivo
Desaminación de la lisina	Negativo
Movilidad	Negativo
Indol	Negativo
Descarboxilación de la ornitina	Negativo
Citrato	Positivo
Rojo de metilo	Negativo
Voges Proskauer	Negativo
Urea	Negativo
Oxidación de la glucosa	Positivo
Reducción de nitrato	Negativo
Crecimiento a 42° C	Negativo
Hidrólisis de gelatina	Positivo
Hidrólisis de almidón	Negativo
Hidrólisis de esculina	Negativo

Estos resultados corroboran el correcto estado de los reactivos y medios usados porque confirman que la cepa ATCC 13525 corresponde a *Pseudomonas fluorescens*, según el manual de bacteriología de Bergey's, 8ª ed. (Garrity *et al.*, 2005), que describe las

características propias de la especie, de esta manera fue utilizada como cepa patrón en la identificación bioquímica, para así evitar falsos positivos y falsos negativos, Quispe (2021) menciona que la cepa patrón nos ayuda al aseguramiento de la validez de los resultados.

3.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS COLONIAS DE LAS CEPAS DE *Pseudomonas* sp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE *Typha dominguensis*

Las cepas aisladas fueron purificadas y se visualizó las características de las colonias en agar selectivo (agar cetrimide) según Liceta (2015) a las 48 horas de crecimiento a una temperatura de 25°C. Donde se observó: La forma, borde, elevación, superficie y consistencia. Los resultados de las características morfológicas de las colonias de las 33 cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*, se observan en la tabla 13 y en el anexo 5.

Tabla 13. Características morfológicas de las colonias de las cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*

Características morfológicas de las colonias de las cepas de <i>Pseudomonas</i> sp.		N°	%
Color	Verde crema	9	27
	Crema	24	73
Forma	Circular	33	100
Borde	Entero	33	100
Elevación	Convexa	31	94
	Umbilicada	1	3
	Plana	1	3
Superficie	Lisa	32	97
	Rugosa	1	3
Consistencia	Cremosa	33	100

3.4 CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Pseudomonas* AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE *Typha dominguensis* MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

A las 33 cepas de *Pseudomonas* sp. se realizó la identificación bioquímica (microbiología clásica) utilizando los medios Triple Sugar Iron (TSI), Lisina Hierro Agar (LIA), Motilidad Indol Ornitina (MIO), Citrato de Simmons, urea, rojo de metilo y Voges Proskauer; con estas pruebas se confirmó el género *Pseudomonas* (anexo 6). Para la identificación de las especies se utilizó 8 pruebas bioquímicas que son oxidasa, reducción de nitratos, OxFerm, crecimiento bacteriano a 42°C, fluorescencia, gelatina, almidón y esculina de acuerdo a Nicola (2010) y el manual de bacteriología de Bergey's, 8ª ed.

(Garrity *et al.*, 2005). Se identificó 4 especies que son *P. fluorescens*, *P. oryzihabitans*, *P. luteola* y *Pseudomonas* sp. Marquez (2018) utilizando la misma clave taxonómica propuesto por Nicola (2010), quien logró identificar a *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*, de la rizósfera de *Schoenoplectus tatora* del lago Titicaca. Según la tabla 14, el 24% corresponde a *P. fluorescens*, el 6% a *P. oryzihabitans*, el 3 % a *P. luteola* y el 64% a *Pseudomonas* sp.

Tabla 14. Pruebas bioquímicas de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.

Nº	Código	Especie	Oxidasa	Oxidación glucosa	Fluorescencia	Nitrato	Crecimiento 42°C	Gelatina	Almidón	Esculina
	ATCC 13525	<i>P. fluorescens</i>	P	P	P	-	-	P	-	-
1	LH1Ps-1	<i>P. fluorescens</i>	P	P	P	-	-	P	-	-
2	LH1Ps-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	P	-	-	-	P	-	-
3	LH1Ps-3	<i>P. fluorescens</i>	P	P	P	-	-	P	-	-
4	LH1Ps-4	<i>P. fluorescens</i>	P	P	P	P	-	P	-	-
5	LH1Ps-5	<i>P. luteola</i>	-	P	-	-	-	P	-	P
6	LH1Ps-6	<i>P. fluorescens</i>	P	P	P	-	-	P	-	-
7	LH1Ps-7	<i>P. fluorescens</i>	P	P	P	-	-	P	-	-
8	LH1Ps-8	<i>P. fluorescens</i>	P	P	P	-	-	P	-	-
9	LH1Ps-9	<i>P. luteola</i>	-	P	-	-	-	P	-	P
10	LH1Ps-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	P	-	P	-	-	-	-
11	LH1Ps-11	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	-	P	-	P	P	-
12	LH1Ps-12	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	-	P	-	P	-	-
13	LH1Ps-13	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	-	P	-	P	-	P
14	LH1Ps-14	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	-	-	P	-	P	-	-
15	LH1Ps-15	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	-	P	-	P	P	P
16	LH1Ps-16	<i>P. luteola</i>	-	P	-	P	-	P	-	P
17	LH2Ps-17	<i>P. oryzihabitans</i>	-	P	-	-	-	-	-	-
18	LH2Ps-18	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	-	P	-	P	-	-
19	LH2Ps-19	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	-	-	-	-	-	-
20	LH2Ps-20	<i>P. fluorescens</i>	P	P	P	P	-	P	-	-
21	LH2Ps-21	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	P	-	P	-	-	-	-
22	LH2Ps-22	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	P	-	P	-	P	-	-
23	LH2Ps-23	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	P	-	-	-	-	-
24	LH2Ps-24	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	P	-	P	-	-	-	-
25	LH2Ps-25	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	-	-	-	P	-	-
26	LH2Ps-27	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	P	P	-	P	P	-
27	LH2Ps-28	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	P	-	P	-	-
28	LH2Ps-29	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	-	P	-	P	-	-
29	LH2Ps-30	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	-	P	-	P	-	-
30	LH2Ps-31	<i>P. fluorescens</i>	P	P	P	P	-	P	-	-
31	LH2Ps-32	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	P	-	-	-	P	-	-
32	LH2Ps-33	<i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	P	-	-	P	-	-
33	LH2Ps-34	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	P	-	-	-	-

Nota. P, resultado positivo; -, resultado negativo

3.5 PRUEBAS HIDROLÍTICAS DE *Pseudomonas* AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE *Typha dominguensis* DEL HUMEDAL LUCRE – HUACARPAY – QUISPICANCHI - CUSCO

3.5.1 Hidrólisis de almidón de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.

Los resultados de la hidrólisis de almidón se muestran en la tabla 15, se observa que solo 3 cepas de *Pseudomonas* dieron positivo, y son LH1Ps-11 (*Pseudomonas* sp.), LH1Ps-15 (*Pseudomonas* sp.) y LH2Ps-27 (*Pseudomonas* sp.).

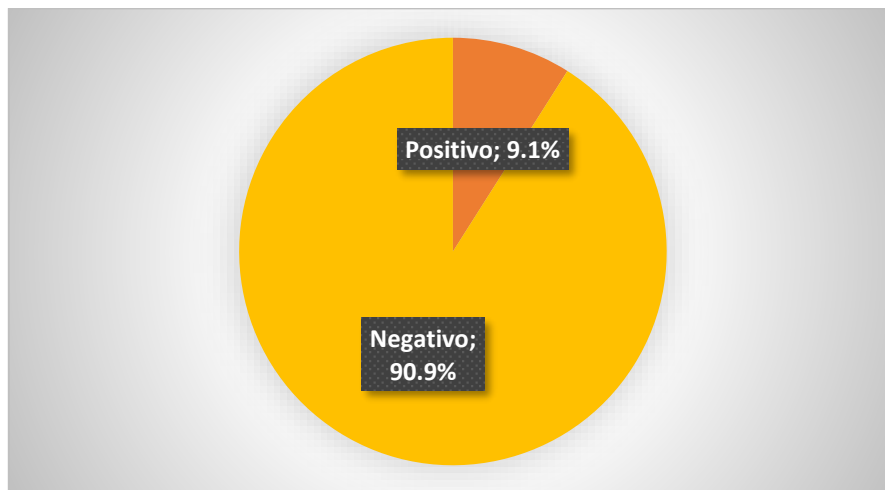
Tabla 15. Hidrólisis de almidón de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*

Cepas de <i>Pseudomonas</i>	Radio del halo de hidrólisis de almidón (mm)
<i>P. fluorescens</i> (ATCC 13525)	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-1)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-2)	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-3)	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-4)	–
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-5)	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-6)	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-7)	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-8)	–
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-9)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-10)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-11)	1.4
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-12)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-13)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-14)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-15)	1.68
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-16)	–
<i>P. oryzihabitans</i> (LH2Ps-17)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-18)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-19)	–
<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-20)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-21)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-22)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-23)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-24)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-25)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-27)	1.98
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-28)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-29)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-30)	–
<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-31)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-32)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-33)	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-34)	–
Total	3
Porcentaje	9.1%

Nota. –, resultado negativo

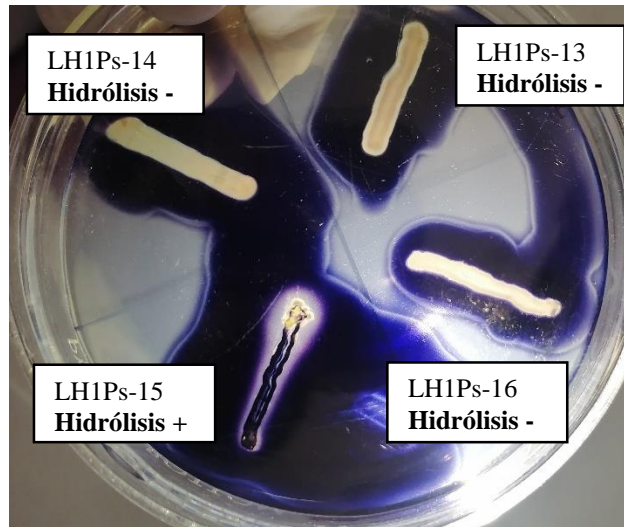
Solo el 9.1% de las cepas de *Pseudomonas* posee la enzima amilasa, mientras que el 90.9% no posee esta enzima figura 11, la hidrólisis de almidón fue revelada con Lugol, que tiñe el medio de un color azul violeta, en la figura 12 se observa un halo transparente alrededor de la cepa LH1Ps-15.

Figura 11. Capacidad hidrolítica de almidón de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*



Estos datos concuerdan con Márquez (2018) donde aisló cepas de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus subtilis*, aisladas de la rizósfera de *Schoenoplectus tatora*, estas cepas fueron sometidas a diferentes pruebas hidrolíticas, entre ellas la prueba de almidón, donde se observó que *Pseudomonas* sp. no presentó la capacidad amilolítica, siendo positivo *Bacillus subtilis*. Rodríguez, et al. (2019) aisló cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus* de la rizósfera de un cultivo de fresa, donde encontró que solo *Bacillus* poseía la enzima amilasa. Otros estudios demuestran que encontrar bacterias amilolíticas en el medio ambiente es escaso, así como Yoguez (2020) menciona que las bacterias rizosféricas de la planta *Bacopa monnieri* solo 4 cepas de un total de 25 poseen actividad amilolítica, Mukhtar et al., (2019) mencionan que las bacterias rizosféricas de *Atriplex amnicola*, una planta halófila, presentó actividad amilolítica en un 47%. Rodas M & Botello (2016) mencionan que el 20% que corresponde a 3 de un total de 15 cepas aisladas de efluente de frigorífico poseen actividad amilolítica. Támara & Mercado (2021) mencionan que, de 10 cepas aisladas de ambientes fríos, 2 cepas presentan actividad amilolítica. Santos & Villalta (2015) mencionan que *Pseudomonas fluorescens* aislada de las piscinas de Ecuasal produce en mayor proporción enzimas proteolíticas, en menor proporción amilasas.

Figura 12. *Hidrólisis de almidón de Pseudomonas aisladas de la rizósfera de Typha dominguensis*



3.5.2 Hidrólisis de caseína y gelatina de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre - Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.

El resultado fue según el tipo de proteína, las 33 cepas de *Pseudomonas* fueron sometidas a hidrólisis de caseína y gelatina, siendo positivo la observación de un halo transparente alrededor de la colonia y el radio del halo fue medido (tabla 16 y figura 14).

Tabla 16. Hidrólisis de caseína y gelatina de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*

Cepas de <i>Pseudomonas</i>	Radio del halo de hidrólisis de caseína (mm)	Radio del halo de hidrólisis de gelatina(mm)
<i>P. fluorescens</i> (ATCC 13525)	–	2
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-1)	10.49	16.35
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-2)	10.16	17.95
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-3)	9.28	20.36
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-4)	11.08	20.07
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-5)	–	4.72
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-6)	8.13	19.94
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-7)	8.11	19.5
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-8)	9.49	20.2
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-9)	6.22	15.4
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-10)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-11)	–	3.98
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-12)	3.39	12.71
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-13)	–	6.99
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-14)	10.19	14.64
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-15)	–	12.3
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-16)	11.47	20.34
<i>P. oryzihabitans</i> (LH2Ps-17)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-18)	12.2	15.95
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-19)	–	–
<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-20)	11	20.79
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-21)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-22)	10.31	19.02
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-23)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-24)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-25)	8.29	8.29
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-27)	8.49	21.18
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-28)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-29)	1.86	13.36
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-30)	7.64	19.6
<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-31)	10.8	18.37
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-32)	–	6.86
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-33)	10.85	21.29
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps.34)	–	–
Total	20	25
Porcentaje	60.6%	75.7%

Nota. –, resultado negativo

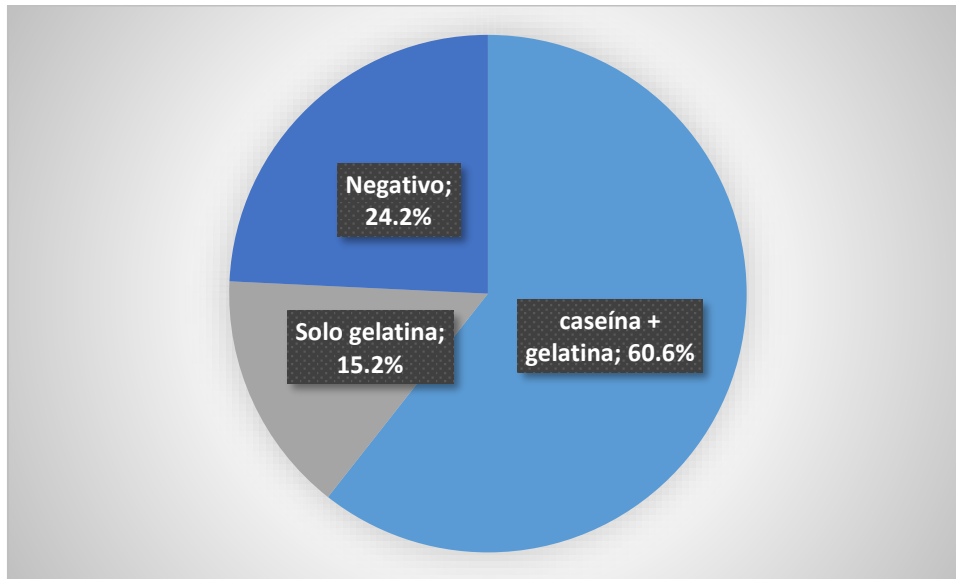
Según la tabla 16, muestra que el 60.6% de las cepas tienen la capacidad para hidrolizar caseína, debido a la presencia de la enzima caseinasa que rompe los enlaces peptídicos hasta aminoácidos, cabe mencionar que todas las cepas que hidrolizan caseína también hidrolizan gelatina, esta característica también se observa en Leon *et al.* (2000). El 75.7% de las cepas aisladas tiene la capacidad de hidrolizar gelatina, debido a que estas poseen la enzima gelatinasa que rompen los enlaces peptídicos en presencia de agua. Estos resultados fueron similares a los que obtuvo Salgado *et al.* (2012a), donde aisló bacterias

rizosféricas de *Typha dominguensis*, con capacidad para hidrolizar caseína en un 47% y el 36% gelatina de un total de 58 aislados.

En el medio caseína, el 50% de las cepas de *Pseudomonas* presentaron un halo cuyo radio fue mayor a 10mm, en el medio gelatina el 44% de las cepas presentaron un radio mayor a 19mm (tabla 16), esta información nos da a conocer que las cepas de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*, poseen un alto grado de actividad hidrolítica para proteínas, los resultados son parecidos a Paredes *et al.* (2017) menciona que *Pseudomonas* aislada de suelos presentó halos de hidrólisis de gelatina y caseína con valores de 22.2 mm y 22.3 mm, superando a las especies reportadas como productoras de proteasas como *Bacillus licheniformis* y *B. subtilis*. Las cepas que destacan porque poseen ambas enzimas hidrolíticas, caseinasas y gelatinasas son LH1Ps-1 (*P. fluorescens*), LH1Ps-2 (*Pseudomonas* sp), LH1Ps-3 (*P. fluorescens*), LH1Ps-4 (*P. fluorescens*), LH1Ps-8 (*P. fluorescens*), LH1Ps-16 (*P. luteola*), LH2Ps-18 (*Pseudomonas* sp.), LH2Ps-20 (*P. fluorescens*), LH2Ps-22 (*Pseudomonas* sp.), LH2Ps-31 (*P. fluorescens*) y LH2Ps-33 (*Pseudomonas* sp.).

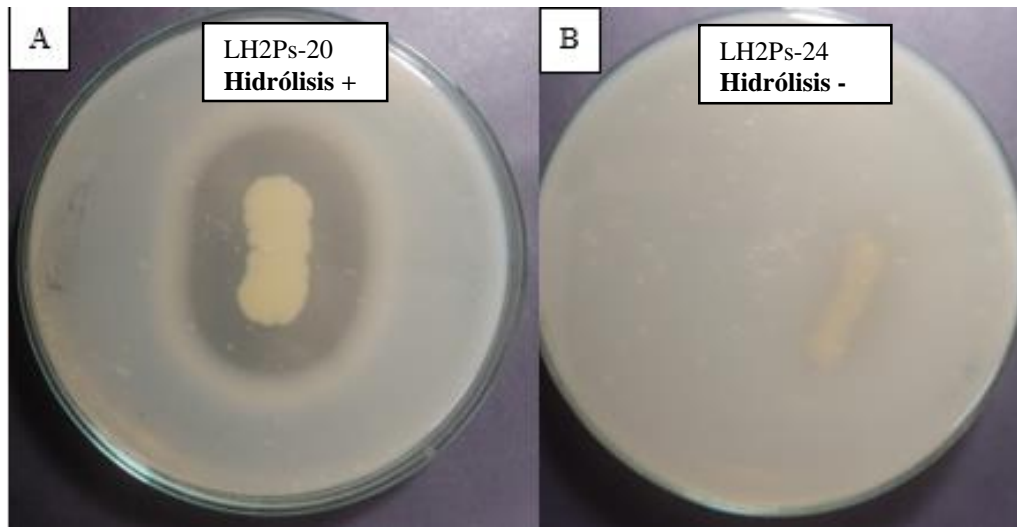
Según la figura 13, el 24.2% no presentó actividad hidrolítica para ninguna proteína, el 15,2% hidrolizó solo gelatina, y el 60.6% de las cepas de *Pseudomonas* son capaces de hidrolizar ambas proteínas. Estas cepas son de mucha importancia en tratamientos de remoción de materia orgánica de agua residual ya que las proteínas constituyen el 50% de la composición del agua residual típica (Osorio *et al.*, 2021). Mas del 50% de las cepas de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* mostraron tener la capacidad de hidrolizar caseína y gelatina, estos resultados coinciden con otra investigación donde aislaron *Pseudomonas* sp. de la rizósfera de *Schoenoplectus tatora*, realizaron la prueba de caseína, y se observó que *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* presentaron mayor capacidad proteolítica de caseína, destacando sobre otras cepas como *Bacillus subtilis* y *Enterobacter* sp. (Marquez, 2018).

Figura 13. Capacidad hidrolítica de caseína y gelatina de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*

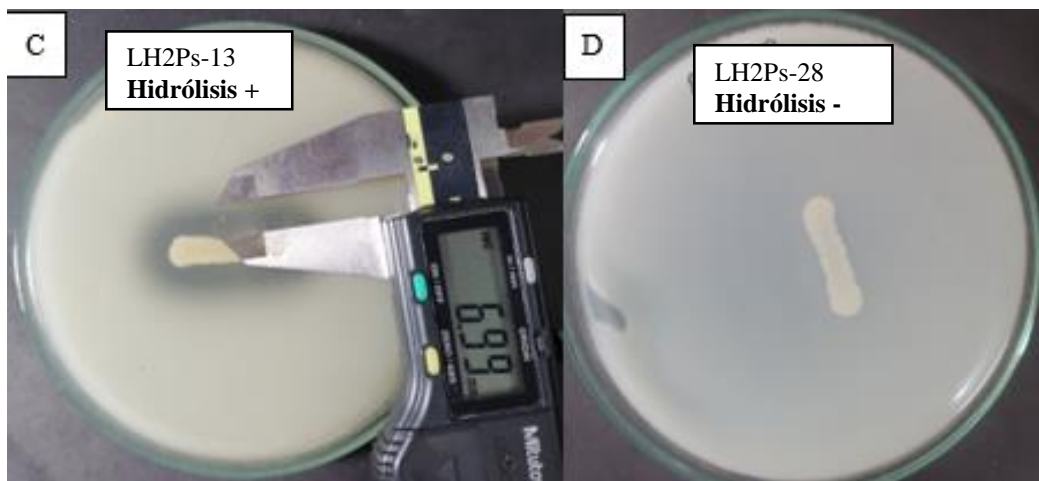


El 60.6% es capaz de hidrolizar ambas proteínas (caseína y gelatina), estos resultados superan frente a otros como, Mukhtar *et al.* (2019) menciona que las bacterias aisladas de la rizósfera de *Atriplex amnicola*, una planta halófila tiene actividad proteolítica en un 47%. López *et al.* (2021) menciona que las rizobacterias aisladas de *Sarcocornia neei* una planta halófila, son capaces de producir enzimas hidrolíticas para proteasas en un 10.80% (9 rizobacterias). Rodas & Botello (2016) menciona que el 46.6% de 15 aislados bacterianos de efluentes de frigorífico posee actividad proteolítica. Támara & Mercado (2021) mencionan que de las 10 cepas aisladas de ambientes fríos 5 presentan actividad proteolítica. La importancia de encontrar bacterias ambientales que sean capaces de producir enzimas proteolíticas es de gran interés, así como lo menciona Ramkumar *et al.* (2018) donde las proteasas de microorganismos son utilizadas en la industria, y representan el 40 a 60% del total de las ventas de enzimas en todo el mundo. Debido a sus diferentes aplicaciones, muchas proteasas han sido estudiadas, la mayoría de ellas se encuentran en cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus* (Rahman *et al.*, 2010). Es necesario encontrar bacterias con capacidad proteolítica para su utilización en tratamientos de biorremediación de aguas residuales, ya que las proteínas representan el 65% de un agua residual típica (Osorio *et al.*, 2021).

Figura 14. Pruebas de hidrólisis de caseína y gelatina de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*



A. Resultado positivo en agar caseína B. Resultado negativo en agar caseína



C. Resultado positivo en agar gelatina B. Resultado negativo en agar gelatina

3.5.3 Hidrólisis de tween 20 y tween 80 de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.

Los resultados de la hidrólisis de lípidos de las 33 cepas de *Pseudomonas* (tabla 17), indican que estas bacterias presentan la enzima lipasa, capaz de liberar ácido láurico y ácido oleico del medio tween 20 y tween 80, que reaccionaron con el cloruro de calcio del medio (saponificación) y formaron cristales (jabones de calcio) (Garrity *et al.*, 2005; Moreno, 2021), se puede ver en la figura 16.

Tabla 17. Hidrólisis de tween 20 y tween 80 de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*

Cepas de <i>Pseudomonas</i>	Hidrólisis de tween 20	Hidrólisis de tween 80
<i>P. fluorescens</i> (ATCC 13525)	P	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-1)	P	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH1Ps-2)	P	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-3)	P	P
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-4)	–	–
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-5)	P	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-6)	P	P
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-7)	P	P
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-8)	P	P
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-9)	P	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH1Ps-10)	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH1Ps-11)	P	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH1Ps-12)	P	P
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH1Ps-13)	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH1Ps-14)	P	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH1Ps-15)	P	P
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-16)	P	P
<i>P. oryzihabitans</i> (LH2Ps-17)	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-18)	P	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-19)	–	–
<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-20)	P	P
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-21)	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-22)	P	P
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-23)	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-24)	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-25)	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-27)	P	P
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-28)	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-29)	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-30)	–	–
<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-31)	P	P
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-32)	P	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps-33)	P	–
<i>Pseudomonas sp.</i> (LH2Ps.34)	–	–
Total	20	11
Prcentaje	60.6%	33.3%

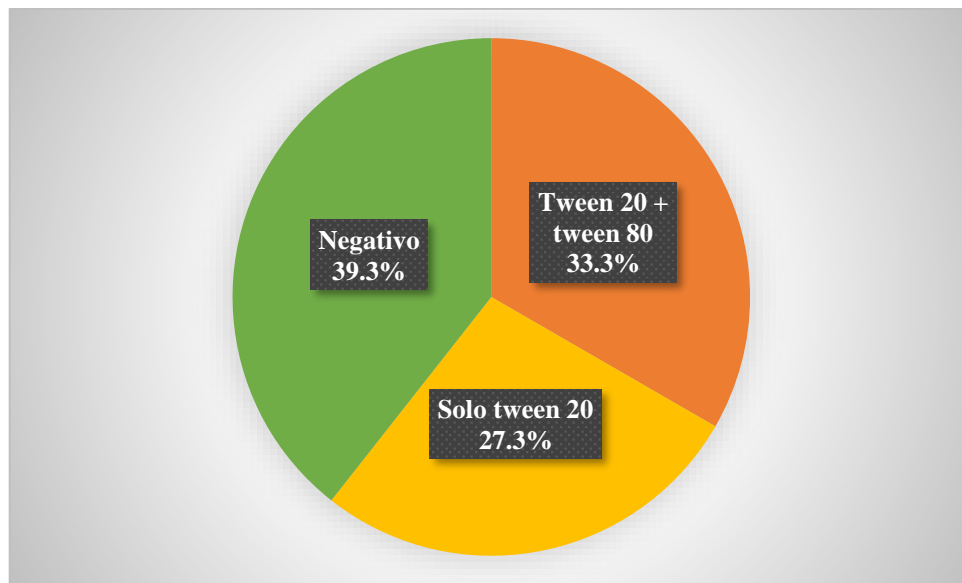
Nota. P, resultado positivo; -, resultado negativo

El porcentaje de cepas que tienen la capacidad para hidrolizar lípidos, varía según el tipo de sustrato, se observa que el 60.6% de las cepas de *Pseudomonas* aisladas presentaron

hidrólisis de tween 20, y el 33.3% para tween 80, cabe mencionar que todas las cepas que son capaces de hidrolizar tween 80, también hidrolizan tween 20.

Se observa que estas bacterias tienen mayor capacidad hidrolítica por tween 20. Este último tiene una relación casi cercana con los resultados de Salgado *et al.*, (2012a), las bacterias rizosféricas aisladas de *Typha dominguensis*, hidrolizaron tween 80 en un 38% de un total de 58 aislados.

Figura 15. Capacidad hidrolítica de tween 20 y tween 80 en *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*

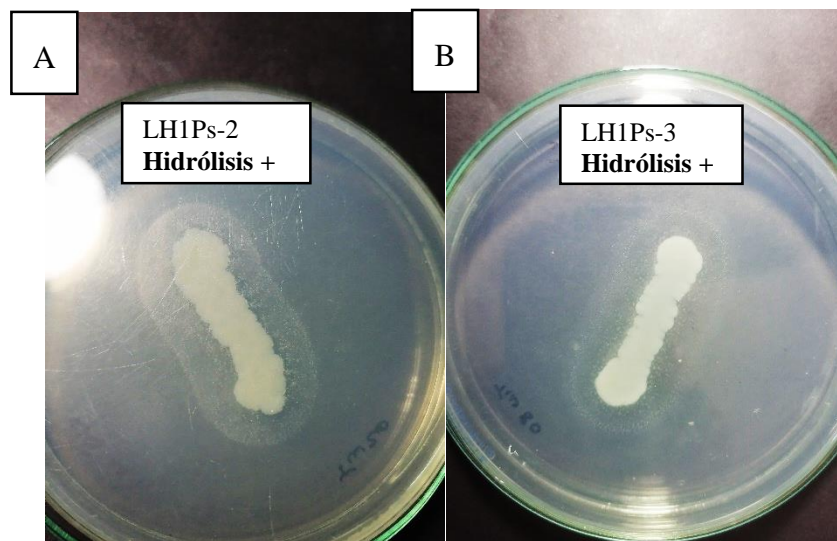


Según la figura 15 y la tabla 17, se encontró que el 39.3% no posee las enzimas capaces de hidrolizar tween 20 y tween 80, el 27.3% es capaz de hidrolizar solo tween 20 y el 33.3% son capaces de producir enzimas lipolíticas para ambos compuestos tween 20 y tween 80, y son 11 cepas de las 33 aisladas, LH1Ps-3 (*P. fluorescens*), LH1Ps-6 (*P. fluorescens*), LH1Ps-7 (*P. fluorescens*), LH1Ps-8 (*P. fluorescens*), LH1Ps-12 (*Pseudomonas* sp.), LH1Ps-15 (*Pseudomonas* sp.), LH1Ps-16 (*P. luteola*), LH2Ps-20 (*P. fluorescens*), LH2Ps-22 (*Pseudomonas* sp.), LH2Ps-27 (*Pseudomonas* sp.) y LH2Ps-31 (*P. fluorescens*). Estas cepas de *Pseudomonas* han demostrado tener diversidad metabólica destacando la degradación de lípidos, así como lo menciona Mendoza *et al.*, (2020) *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Corynebacterium* sp. son eficientes en la degradación de grasas y aceites, y que *Pseudomonas aeruginosa* es la bacteria que posee mayor actividad lipolítica. En otras investigaciones también se demostró que *Pseudomonas* sp. aislada de

la rizósfera de *Schoenoplectus tatora*, tiene la capacidad de degradar lípidos (Marquez, 2018). No todas las bacterias presentan la capacidad de hidrolizar lípidos para tween 20 y tween 80, las que lo realicen destacan para su utilización en tratamientos de biorremediación de aguas residuales, ya que los lípidos y las grasas representan el 10% de un agua residual típica (Osorio *et al.*, 2021). Por ello es necesario contar con bacterias que tengan la capacidad de reducir estos contaminantes. Mendoza *et al.*, (2020) menciona que *Pseudomonas aeruginosa* y *Corynebacterium aquaticum* han demostrado ser la combinación perfecta en la degradación de aceites y grasas de muestras de efluentes grasos de una industria aceitera, reduciendo la presencia de estos compuestos de una concentración de 160mg/l a 34mg/l.

Por ello los resultados obtenidos fueron más representativos que otros estudios, donde aislaron bacterias lipolíticas de otros ambientes diferentes, como Rodas & Botello (2016) reportó que el 13.4% que corresponde a 02 cepas aisladas de efluentes de frigorífico poseen actividad lipolítica. Támara & Mercado (2021) mencionan que de las 10 cepas aisladas de ambientes fríos 3 presentan actividad lipolítica.

Figura 16. Prueba de hidrólisis de tween 20 y tween 80 de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*



A. Hidrólisis en tween 20

B. Hidrólisis en tween 80

3.5.4 Hidrólisis esculina y DNA de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.

Los resultados de la prueba de hidrólisis de esculina y DNA, de las 33 cepas aisladas de *Pseudomonas*, se muestran a continuación (tabla 18).

Tabla 18. Hidrólisis esculina y DNA de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*

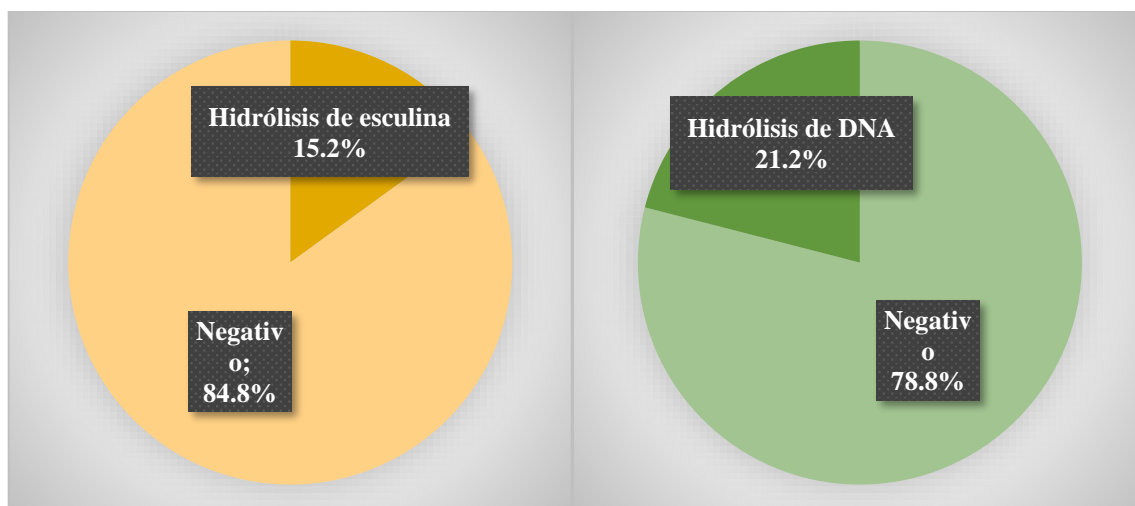
Cepas de <i>Pseudomonas</i>	Hidrólisis de esculina (mm)	Hidrólisis de DNA (mm)
<i>P. fluorescens</i> (ATCC 13525)	–	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-1)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-2)	–	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-3)	–	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-4)	–	–
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-5)	0.82	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-6)	–	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-7)	–	–
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-8)	–	–
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-9)	1.26	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-10)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-11)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-12)	–	3.5
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-13)	6.89	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-14)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-15)	5.79	6.5
<i>P. luteola</i> (LH1Ps-16)	12.06	10.79
<i>P. oryzihabitans</i> (LH2Ps-17)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-18)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-19)	–	–
<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-20)	–	6.9
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-21)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-22)	–	6
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-23)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-24)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-25)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-27)	–	1.56
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-28)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-29)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-30)	–	–
<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-31)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-32)	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-33)	–	3.18
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-34)	–	–
Total	5	7
Porcentaje	15.2%	21.2%

Nota. –, resultado negativo

Se observa que hay mayor capacidad hidrolítica por DNA, el 21.2 % que corresponde a 7 cepas de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* hidroliza DNA y el 15.2% hidroliza esculina. Las cepas LH1Ps-13 (*Pseudomonas* sp.), LH1Ps-15 (*Pseudomonas* sp.) y LH1Ps-16 (*P. luteola*) poseen mayor capacidad hidrolítica de

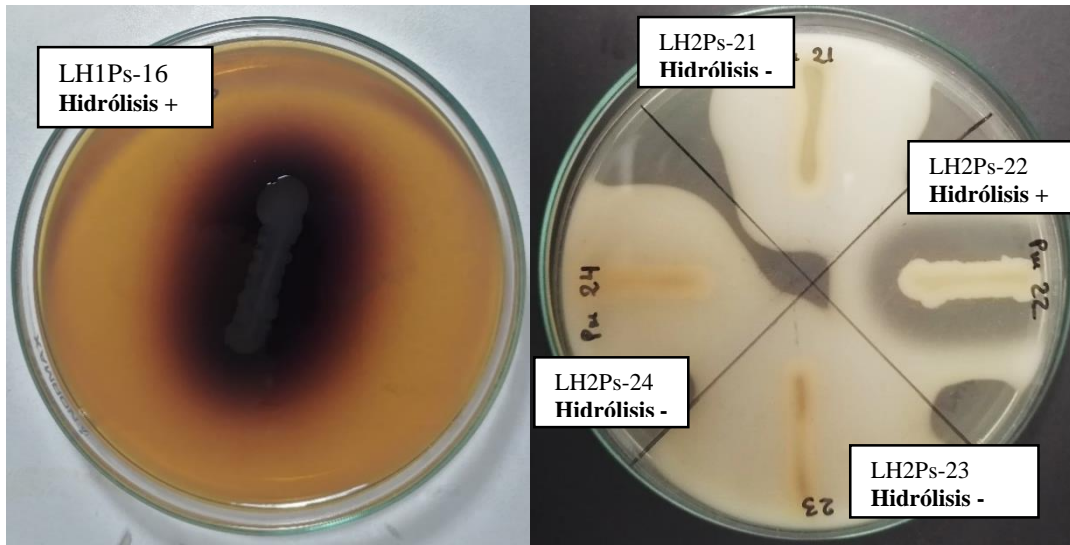
esculina; Las cepas LH1Ps-15 (*Pseudomonas* sp.), LH1Ps-16 (*P. luteola*) y LH2Ps-20 (*P. fluorescens*) poseen mayor capacidad hidrolítica de DNA, porque presentaron un halo de hidrólisis mayor a 5mm, que es la media de la medición del halo de hidrólisis.

Figura 17. Capacidad hidrolítica de esculina y DNA de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*



En la figura 17 y figura 18, se observa la actividad hidrolítica de esculina y DNA de las 33 cepas de *Pseudomonas*, el 84.8% no tiene capacidad hidrolítica para esculina y el 78.8% no tiene capacidad hidrolítica para DNA. El 6% que son 2 cepas son capaces de hidrolizar ambos compuestos, esculina y DNA. Estas son LH1Ps-15 (*Pseudomonas* sp.) y LH1Ps-16 (*Pseudomonas luteola*). Estas bacterias son de gran importancia por su acción multienzimática, y pueden ser utilizados en procesos de biorremediación de efluentes contaminados, así como lo menciona Moreno *et al.* (2013) las bacterias rizosféricas capaces de producir enzimas extracelulares como esculinasas y DNAsas, pueden participar en la descomposición de materia orgánica. Miovich & Porras (2021) mencionan que las bacterias rizosféricas más usadas, en la eliminación de materia orgánica de aguas residuales son *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* spp. Las *Pseudomonas* aisladas en este estudio pueden ser útiles en procesos de biorremediación de aguas residuales, por las enzimas DNAsas y esculinasas que poseen.

Figura 18. Prueba de hidrólisis de esculina y DNA de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis*



A. Hidrólisis de esculina

B. Hidrólisis de DNA

Nota- En la figura 18A, se observa un resultado positivo al generar un cambio de color oscuro en el medio, alrededor de la colonia, 18B. Se observa dos tipos de resultado, positivo por la formación el halo transparente alrededor de la colonia y negativo cuando hay ausencia de halo.

3.6 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD HIDROLÍTICA DE LAS 33 CEPAS DE *Pseudomonas* AISLADAS DE LA RIZÓSFERA *Typha dominguensis* DEL HUMEDAL LUCRE – HUACARPAY – QUISPICANCHI - CUSCO

Las 33 cepas de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* fueron sometidas a un total de 7 pruebas, donde se observó la capacidad hidrolítica que estas cepas tienen al degradar diferentes compuestos. Realizando un análisis de todas las cepas de *Pseudomonas* y todas las pruebas, se determinó que son 6 cepas, debido a la capacidad metabólica que poseen, son capaces de hidrolizar de 4 a 6 compuestos diferentes. También fueron seleccionadas por la temporalidad, lluvias y estiaje.

Así como se observa en la tabla 19, estas cepas son: LH1Ps-15 (*Pseudomonas* sp.), LH1Ps-16 (*P. luteola*), LH2Ps-20 (*P. fluorescens*), LH2Ps-22(*Pseudomonas* sp.), LH2Ps-27 (*Pseudomonas* sp.) y LH2Ps-31 (*P. fluorescens*), por lo que tienen gran importancia para usos en biorremediación. Las enzimas hidrolíticas que son producidas por bacterias rizosféricas, son de gran interés comercial debido a que posee aplicaciones biotecnológicas en la industria farmacéutica, agroindustrial y alimenticia (Amoozegar *et al.*, 2019; Corral *et al.*, 2020). Como las enzimas lipolíticas, contribuyen a aplicaciones industriales, mejoran el sabor de los alimentos, son utilizados en la producción de compuestos farmacológicos, son usados como aditivos en la industria de detergentes, las enzimas lipolíticas bacterianas más usadas son de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia*, destacando *Pseudomonas fluorescens* y *Serratia marcescens* como las mejores productoras de lipasas bacterianas (Cárdenas, 2023).

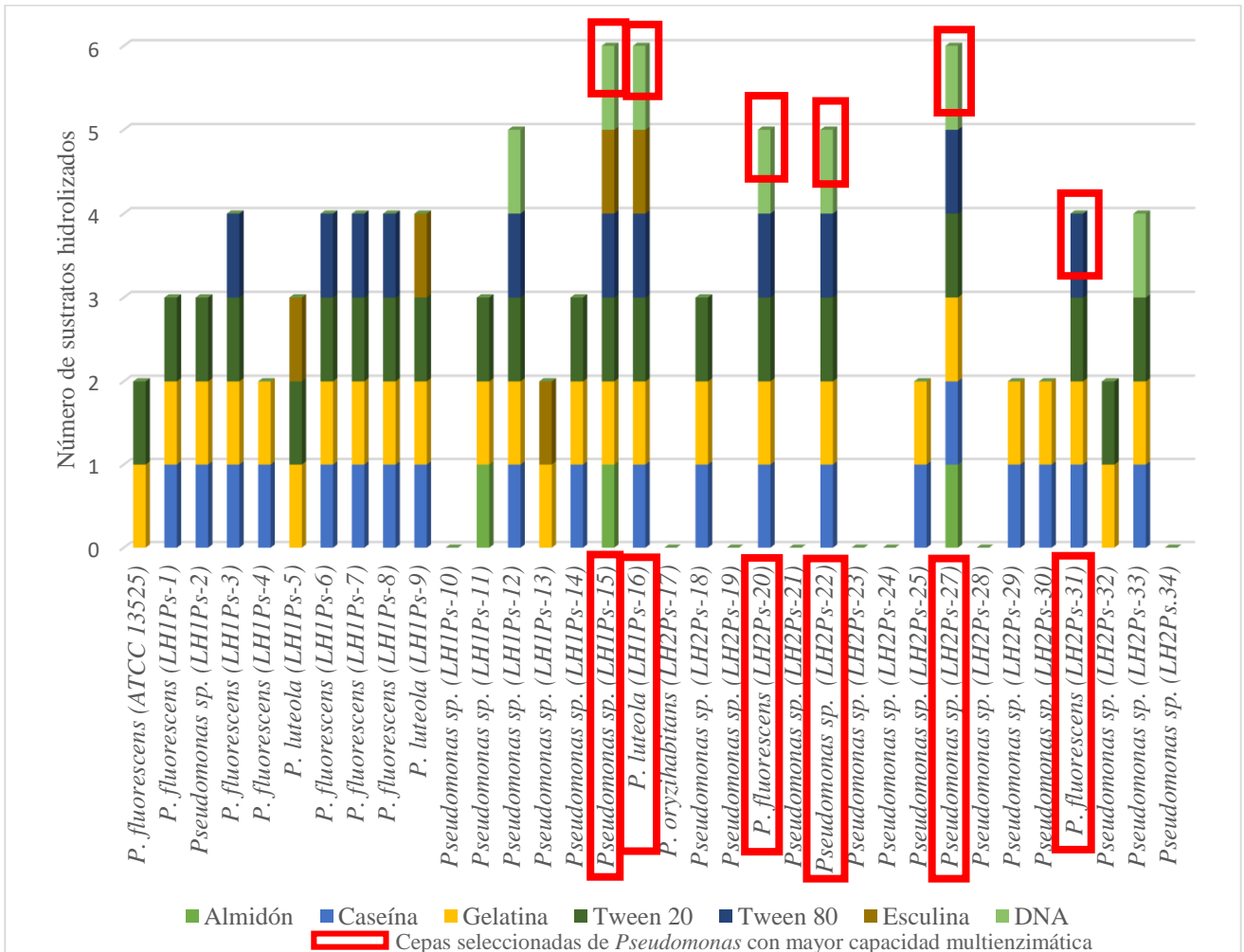
Además, las cepas que no presentaron capacidad hidrolítica para ningún compuesto fueron LH1Ps-10 (*Pseudomonas* sp.), LH2Ps-17 (*P. oryzihabitans*), LH2Ps-19 (*Pseudomonas* sp.), LH2Ps-21 (*Pseudomonas* sp.), LH2Ps-23 (*Pseudomonas* sp.), LH2Ps-24 (*Pseudomonas* sp.), LH2Ps-28 (*Pseudomonas* sp.) y LH2Ps-34 (*Pseudomonas* sp.), corresponden a un 24%.

Tabla 19. Capacidad hidrolítica de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha domingensis* del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.

N°	Código	Identificación bioquímica	Pruebas positivas	Carbohidrato	Proteínas		Lípidos		Otros compuestos	
				Almidón	Caseína	Gelatina	Tween 20	Tween 80	Esculina	DNA
1	LH1Ps-1	<i>P. fluorescens</i>	03		X	X	X			
2	LH1Ps-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	04		X	X	X			
3	LH1Ps-3	<i>P. fluorescens</i>	04		X	X	X	X		
4	LH1Ps-4	<i>P. fluorescens</i>	02		X	X				
5	LH1Ps-5	<i>P. luteola</i>	03			X	X			X
6	LH1Ps-6	<i>P. fluorescens</i>	04		X	X	X	X		
7	LH1Ps-7	<i>P. fluorescens</i>	04		X	X	X	X		
8	LH1Ps-8	<i>P. fluorescens</i>	04		X	X	X	X		
9	LH1Ps-9	<i>P. luteola</i>	04		X	X	X			X
10	LH1Ps-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	00							
11	LH1Ps-11	<i>Pseudomonas</i> sp.	03	X		X	X			
12	LH1Ps-12	<i>Pseudomonas</i> sp.	05		X	X	X	X		X
13	LH1Ps-13	<i>Pseudomonas</i> sp.	02			X			X	
14	LH1Ps-14	<i>Pseudomonas</i> sp.	03		X	X	X			
15	LH1Ps-15	<i>Pseudomonas</i> sp.	06	X		X	X	X	X	X
16	LH1Ps-16	<i>P. luteola</i>	06		X	X	X	X	X	X
17	LH2Ps-17	<i>P. oryzihabitans</i>	00							
18	LH2Ps-18	<i>Pseudomonas</i> sp.	03		X	X	X			
19	LH2Ps-19	<i>Pseudomonas</i> sp.	00							
20	LH2Ps-20	<i>P. fluorescens</i>	05		X	X	X	X		X
21	LH2Ps-21	<i>Pseudomonas</i> sp.	00							
22	LH2Ps-22	<i>Pseudomonas</i> sp.	05		X	X	X	X		X
23	LH2Ps-23	<i>Pseudomonas</i> sp.	00							
24	LH2Ps-24	<i>Pseudomonas</i> sp.	00							
25	LH2Ps-25	<i>Pseudomonas</i> sp.	02		X	X				
26	LH2Ps-27	<i>Pseudomonas</i> sp.	06	X	X	X	X	X		X
27	LH2Ps-28	<i>Pseudomonas</i> sp.	00							
28	LH2Ps-29	<i>Pseudomonas</i> sp.	02		X	X				
29	LH2Ps-30	<i>Pseudomonas</i> sp.	02		X	X				
30	LH2Ps-31	<i>P. fluorescens</i>	04		X	X	X	X		
31	LH2Ps-32	<i>Pseudomonas</i> sp.	02			X	X			
32	LH2Ps-33	<i>Pseudomonas</i> sp.	04		X	X	X			X
33	LH2Ps-34	<i>Pseudomonas</i> sp.	00							
Total				3	20	25	20	11	5	7
Porcentaje				9.1%	60.6%	75.7%	60.6%	33.3%	15.2%	21.2%

Nota: x, Representa el resultado positivo; negrita, cepas seleccionadas

Figura 19. Capacidad hidrolítica de almidón, proteínas, lípidos y otros compuestos de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha domingensis*



En la figura 19 se observa la capacidad multienzimática de las 33 cepas de *Pseudomonas*, siendo el 39.4% que poseen capacidad multienzimática, porque dieron como positivo a 4 pruebas de un total de 7. Estos resultados fueron más óptimos en comparación con otros estudios como, Támara & Mercado (2021) mencionan que de las 10 cepas aisladas de ambientes fríos solo 1 cepa, presenta actividad enzimática múltiple, como actividad amilolítica, proteolítica y lipolítica. Salgado *et al.*, (2012a) menciona que solo dos cepas de un total de 58 aislados bacterianos de la raíz de *Typha domingensis* tienen actividad multienzimática, ya que fueron los únicos que presentaron actividad hidrolítica de caseína, gelatina y tween 80.

La importancia de encontrar bacterias que sean capaces de utilizar diferentes compuestos que van desde carbohidratos, lípidos, proteínas y otros compuestos, especialmente los compuestos tóxicos, son importantes en los procesos de biorremediación, de aguas y

alimentos. Las especies de bacterias que destacan para usos en estos procesos son *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, y *Nocardia* spp (Brutti *et al.*, 2018). Debido a que *Pseudomonas* posee versatilidad metabólica según la fuente de aislamiento (Santamaría, 2021; Álvarez *et al.*, 2020). Estas cepas pueden ayudar a la remoción de materia orgánica de aguas residuales (Miovich & Porras, 2021), así como lo menciona Yu Gualong *et al.*, (2019), *Pseudomonas fluorescens* tiene la capacidad para reducir materia orgánica y nitratos en aguas residuales. Esto debido a que este género es capaz de adaptarse a situaciones extremas sin alterar sus funciones poco específicas (Brutti *et al.*, 2018).

3.7 RELACIÓN ENTRE EL PUNTO DE MUESTREO Y LA CAPACIDAD HIDROLÍTICA DE *Pseudomonas* AISLADA DE LA RIZÓSFERA DE *Typha dominguis* DEL HUMEDAL LUCRE – HUCARPAY – QUISPICANCHI - CUSCO

Al realizar un análisis de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguis* con los puntos de colecta, se ha determinado que existe una relación con la cantidad de cepas aisladas y la capacidad hidrolítica, así como se observa en la tabla 20.

Tabla 20. Relación de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguis* con los puntos de colecta

Punto 1	Punto 2	Punto 3
Característica: Lejos de la zona de eutrofización	Característica: Zona intermedia entre el punto 1 y 3	Característica: Zona cercana al punto de eutrofización
<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-1)	<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-3)	<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-8)
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-2)	<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-4)	<i>P. luteola</i> (LH1Ps-9)
<i>P. oryzihabitans</i> (LH2Ps-17)	<i>P. luteola</i> (LH1Ps-5)	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-10)
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-18)	<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-6)	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-11)
<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-19)	<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-7)	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-12)
	<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-20)	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-13)
	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-21)	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-14)
	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-22)	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-15)
	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-23)	<i>P. luteola</i> (LH1Ps-16)
	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-24)	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-25)
		<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-27)
		<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-28)
		<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-29)
		<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-30)
		<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-31)
		<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-32)
		<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-33)
		<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-34)

La mayoría de las cepas aisladas de *Pseudomonas* provienen del punto 3, las cepas representadas en negrita, corresponden a las cepas de *Pseudomonas* con mayor capacidad

hidrolítica, estas pertenecen al punto 2 y 3, que se encuentran más próximos al área de eutrofización del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco.

Esta eutrofización se debe a los efluentes de la planta de biorremediación de aguas residuales de Lucre que son vertidos al humedal Lucre Huacarpay, elevando las concentraciones de fosfatos y nitratos, influyendo en el avance de la eutrofización, por ello la calidad del agua del humedal Lucre – Huacarpay, no cumple con las condiciones para la categoría de lagos y lagunas de acuerdo a DS N° 004- 2017- MINAM, según La Torre (2018) y Canal & Torres (2023).

Estos datos explican la capacidad de *Pseudomonas* aisladas del punto 3, que se encuentra en contacto con la zona eutrofizada, ricos en materia orgánica, nitratos y fosfatos (La Torre, 2018). La adaptación a este tipo de ambiente es lo que le confiere la capacidad hidrolítica, así como lo menciona Ona (2021) la composición de los microbiomas en la rizósfera dependerá de la especie vegetal, y los factores que se asocian al suelo como la textura, pH, contenido de materia orgánica, nutrientes minerales y estructura, estas contienen señales químicas que hacen que los microorganismos específicos sean reclutados hacia las raíces.

La importancia de aislar *Pseudomonas* de la rizósfera de *Typha dominguensis*, es porque las bacterias rizosféricas, guardan una estrecha relación con la capacidad metabólica de la planta, así como lo menciona Ona (2021), las relaciones entre planta y microorganismos a nivel de la rizósfera, posee una característica sobresaliente de beneficio mutuo, los microorganismos obtienen un nicho y una fuente generosa de alimento, entre tanto las plantas experimentan mejoras en los procesos orientados a estimular el crecimiento vegetal, haciendo innecesaria la utilización de compuestos químicos que modifiquen el equilibrio del suelo. Varios estudios han demostrado la eficiencia de *Typha dominguensis* en la remoción de contaminantes (Torres Callupe, 2017; Torres Guerra, 2017). Así como *Pseudomonas rhodesiae* aislada de la raíz de *Typha latifolia*, ayuda a la tolerancia de cadmio (Rolón, 2020). Los resultados en este estudio corroboran la capacidad hidrolítica multienzimática de algunas cepas de *Pseudomonas* encontradas en la rizósfera de *Typha dominguensis*.

3.8 SECUENCIAMIENTO DEL GEN rRNA 16S, DE LAS CEPAS DE *Pseudomonas* CON MAYORES CAPACIDADES HIDROLÍTICAS

El informe emitido por el laboratorio BIOTECOOP, de las 2 cepas de *Pseudomonas* sp. con mayor capacidad hidrolítica, seleccionadas de acuerdo a la temporalidad y punto de muestreo que son LH2Ps-22 y LH2Ps-27%, se observan en la tabla 21 y anexo 7. El valor de identidad de la cepa LH2Ps-27 es de 99.32% y de LH2Ps-22 es menor a 98%, según Tamisier *et al.* (2015) los valores de identidad que se recomienda para clasificar aislamientos bacterianos, son 95% para género y 98.7 % para especie. La cepa LH1Ps-22, posee un valor de identidad de 74.34% lo que nos indica que pertenece a la familia Pseudomonadaceae, según Yarza *et al.* (2014) estos valores de indentidad también están influenciados por la baja calidad de las secuencias en estas muestras.

Así mismo, *Pseudomonas* es un grupo de bacterias cosmopolita y por ello su amplia diversidad genética, siendo uno de los grupos más numerosos dentro del grupo de las Gram negativas (Girard *et al.*, 2020; Santamaria, 2021; Girard *et al.*, 2021), al ser un grupo mega diverso, muchos no comparten una historia evolutiva común (Rudra & Gupta, 2024), por ello en la actualidad aún se redefinen los grupos y subgrupos de esta familia; Sin embargo, la identificación de *Pseudomonas* mediante el gen rRNA 16S, solo permite una diferenciación entre los géneros de la familia Pseudomonadaceae, como *Ventosimona*, *Pseudomonas*, *Oblitimonas*, *Thiopseudomonas* y *Cellvibrio*, así como también solo delimita los grupos principales como *P. pertucinogena*, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* (Girard *et al.*, 2021), además al momento de generarse las copias del gen rRNA 16S, se produce un fenómeno conocido como heterogeneidad intragenómica, y con valores de identidad ya establecidos de 98.2% a 99% de similitud, hace que no sea posible discriminar aislamientos ambientales a nivel de especie (Mende *et al.*, 2013; Lalucat *et al.*, 2020; Girard *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2014; Gutierrez, 2023). Por ello se recomienda la identificación de *Pseudomonas* ambientales mediante el uso de los genes *rpoB* y *rpoD*.

Tabla 21. Resultados del secuenciamiento del gen rRNA 16S de las cepas de *Pseudomonas* seleccionadas

N°	Cepas	Código de secuenciación	Longitud	Cobertura (%)	Identidad (%)	E-Value	Identificación molecular	ID Consulta	Fuente bibliográfica	Año
01	LH2Ps-22	Pm 22	1472	52	74.34	2e-34	<i>Pseudomonas</i> sp	KR085912.1	(Gulati <i>et al.</i> , 2015)	2015
02	LH2Ps-27	Pm 27	1392	100	99.32	0.0	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	MT386129.1	(Krinis <i>et al.</i> , 2020)	2020

La actividad hidrolítica de *Pseudomonas* de la rizósfera de *Typha dominguensis*, frente al resultado de la similaridad de secuencias obtenidas, del gen rRNA 16S, se tiene que la cepa LH2Ps-27, según el análisis de similaridad corresponde a *Pseudomonas nitroreducens*, han reportado que esta bacteria ha sido aislada de suelos, como Aswathi *et al.* (2019) indica que esta bacteria tiene la capacidad de degradar pesticidas como los organoclorados y clorpirifos, debido a que se encontraba en suelos contaminados. En las pruebas de hidrólisis, la cepa LH2Ps-27 posee la capacidad de reducir nitratos, así como actividad lipolítica y proteolítica. Watanabe *et al.* (1977) menciona que esta bacteria produce lipasas. Trinh *et al.* (2018) menciona que posee la capacidad de ser promotora de crecimiento vegetal, mediante la absorción de nitratos. Bedoya *et al.* (2021) menciona es muy buena degradadora de moléculas complejas, como sustancias aromáticas xenobioticas.

La cepa LH2Ps-22 según el análisis de similaridad corresponden a *Pseudomonas* sp. esta bacteria, es conocida por la versatilidad metabólica que posee (Álvarez *et al.*, 2020) como la capacidad hidrolítica de lípidos (Mendoza *et al.*, 2020) y proteínas (Rahman *et al.*, 2010; Marquez, 2018), así como los resultados obtenidos en esta investigación.

Al realizar la comparación entre la identificación bioquímica con el resultado del secuenciamiento del gen rRNA 16S, se encontró relación, pero es necesario realizar mas pruebas bioquímicas, debido a que las especies de *Pseudomonas* ambientales son muy diversas (Girard *et al.*, 2020; Santamaria, 2021; Girard *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES

1. Se logró aislar un total de 33 cepas del género *Pseudomonas* sp., de la rizósfera de *Typha dominguensis* del humedal Lucre – Huacarpay – Quispicanchi - Cusco, en dos periodos estacionarias época de lluvias y secas.
2. Se determinó la capacidad hidrolítica de las 33 cepas de *Pseudomonas*, el 9% hidroliza almidón; 76% gelatina, 61% caseína, 61% a tween 20, 33% a tween 80, 15% a esculina y 21% a DNA.
3. Se logró secuenciar parcialmente el gen rRNA 16S de 2 cepas, LH2Ps-22 a *Pseudomonas* sp. y LH2Ps-27 a *Pseudomonas nitroreducens*.

RECOMENDACIONES

- Realizar más pruebas hidrolíticas y pruebas de resistencia a otros compuestos químicos para conocer con más profundidad su versatilidad metabólica.
- Realizar estudios de enfrentamiento a muestras de aguas residuales diferentes, para corroborar los resultados obtenidos y probar el rendimiento frente a condiciones adversas, cultivando en biodigestores y aplicando estas bacterias de manera individual y en consorcios, para así determinar su uso en biorremediación de aguas residuales.
- Secuenciar el genoma completo *Pseudomonas* sp. de las especies con mayor capacidad LH1Ps-15 (*Pseudomonas* sp.), LH1Ps-16 (*P. luteola*), LH2Ps-20 (*P. fluorescens*), LH2Ps-22(*Pseudomonas* sp.), LH2Ps-27 (*Pseudomonas* sp.) y LH2Ps-31 (*P. fluorescens*) para poder conocer su identidad, así mismo la amplitud y precisión de los genes que codifican y le dan la capacidad hidrolítica de diferentes compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- Almansba, A., Kane, A., Nasrallah, N., Maachi, R., Lamaa, L., Peruchon, L., . . . Assadi, A. (2021). Innovative photocatalytic luminous textiles optimized towards water treatment: Performance evaluation of photoreactors. *Chemical Engineering Journal*, 416, pág. 129195. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129195>
- Almanzan, C. P., Alarcón, A., García, B. Ó., Mendarte, A. C., & Ferrera, C. R. (2024). Fitotoxicidad y fitorremediación de un suelo contaminado con gasolina utilizando plantas de girasoles asistidas por bacterias rizosféricas nativas. *Revista internacional de contaminacion ambiental*, 40, 251-262. doi:<https://doi.org/10.20937/RICA.55039>
- Álvarez, J. A., Santoyo, G., & Rocha, M. d. (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. *Revista Latinoamericana De Recursos Naturales*, 16(1), 01-10. Obtenido de <https://revista.itson.edu.mx/index.php/rlrn/article/view/286>
- Amarilla, S., Oggero, A. S., Nakayama, H. D., Avalos, C., Méndez, C., & Ries, . (2024). Development of a protocol with *Typha domingensis* Pers. for the treatment of wastewater from paper recycling. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 9, 100628. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cscee.2024.100628>
- Amoozegar, M. A., Safarpour, A., Noghabi, K. A., Bakhtiary, T., & Ventosa, A. (2019). Halophiles and their vast potential in biofuel production. *Frontiers in microbiology*, 10. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01895>
- Añez, L. P., & Gutiérrez, R. L. (2020). *Determinación del potencial de promoción de crecimiento de plantas [Tesis de licenciatura, Universidad De Santander]*. Repositorio institucional.
- Aswathi, A., Pandey, A., & Sukumaran, R. K. (2019). Rapid degradation of the organophosphate pesticide – Chlorpyrifos by a novel strain of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3. *bioresource Technology*, 292, 122025. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122025>
- Ayquipa, C. N. (2021). *Evaluación de la eficiencia de una trampa de grasa (interceptor de grasa hidromecánico) para el pretratamiento de aguas residuales grises en viviendas unifamiliares del distrito de Lares-Cusco - 2021 [Tesis de Licenciatura: Universidad*

Continental]. Repositorio institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12394/11474>

BD. (2015). *BD BBL Oxidase Reagent Droppers, Inserto*.

Bedoya, V. J., Martínez, G. J., Tobón, O. J., & Ochoa, A. S. (2021). Bioremediation potential of *Pseudomonas* genus isolates from residual water, capable of tolerating lead through mechanisms of exopolysaccharide production and biosorption. 32, 00685. doi:<https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00685>

Braz, L. M., Tambourgi, E. B., & Andrade, G. S. (2022). Avaliação da produção de biosurfactantes por *Pseudomonas fluorescens* em substrato de melação como fonte única de Carbono. *Concilium*, 22(6), 688–698. doi:<https://doi.org/10.53660/CLM-607-683>

Brutti, L., Beltrán, M., & Salamone, I. G. (2018). *Biorremediación de los recursos naturales* (1a. edición ed.). Hurlingham, Buenos Aires: Ediciones INTA.

Camejo, J. T., Halpay, M., Colón, R., Mejía, M., & Polanco, L. (2022). Determinación molecular de bacterias en procesos desnitrificantes región arrocera al norte de la República Dominicana. *Revista Agropecuaria y Forestal*, 11(02), 41-50. Obtenido de <https://www.sodiaf.org.do/apf/index.php/apf/article/view/150>

Campoy, O. E., Santana, V. A., Estrada, B. D., Estrada, M. J., & Hernández, M. M. (2020). Aislamiento e identificación de bacterias cultivables de la zona de raíz de granada roja (*Punica granatum*) en un huerto del Tephé Ixmiquilpan, Hidalgo, México. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química* 2020, 6. doi:<http://hdl.handle.net/11191/7777>

Canal, B. M., & Torres, P. E. (2023). *Influencia del efluente de la planta de biorremediación de aguas residuales en la calidad de agua del humedal Lucre - Huacarpay, sector Huáscar, provincia de Quispicanchis, región Cusco, 2021 [Tesis de licenciatura, Universidad Continental]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12394/13725>

Cárdenas, O. J. (2023). *Selección y caracterización de bacterias nativas productoras de lipasas aisladas de efluentes industriales con alto contenido de grasas [Tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]*. Repositorio intitucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12672/20520>

- Cardona, S. F. (2024). Introducción a la biología molecular. La PCR y la secuenciación de Sanger.
- Caviedes, D. C. (2010). *Aislamiento y selección de Pseudomonas sp., y Bacillus sp., promotoras de crecimiento vegetal en cultivo de Uchuva (Physalis peruviana L.) con actividad antagonica frente a Fusarium oxysporum [Tesis de licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana]*. Repositorio institucional.
- Chang, I. W. (2020). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburo mediada por Pseudomonas spp. en biorreactores [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Agraria de la Selva]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.14292/1818>
- Comonfort, J. H. (2022). Frederick Sanger: La secuenciación del alfabeto de la vida. *Revista de divulgación científica iBIO*, 4(2), 42-45.
- Cordero, L. C., & Velásquez, L. G. (2023). *Fitorremediación de aguas servidas mediante el uso de Typha dominguensis y Cyperus alternifolius [Tesis de licenciatura, Universidad de Guayaquil]*. Repositorio institucional.
- Córdova, L. M., Castillo, R. H., Carreño, C. R., Valdera, Z. G., & Mora, M. M. (2022). Obtención de *Bacillus* y *Pseudomonas* de la rizósfera de *Opuntia quitensis* “tuna” como promotores de crecimiento en *Zea mays* L. *Revista CIENCIA Y TECNOLOGÍA*, 18(1), 105-114. Obtenido de <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/4562>
- Corral, P., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2020). Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine. *Marine drugs*, 18(1), 33. doi:<https://doi.org/10.3390/md18010033>
- Del Moral, S., Ramírez, C. L., & García, G. M. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 2334-2501. Obtenido de https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/40709921/del_Moral_2015_aspectos_relevantes_de_enzimas-libre.pdf?1449680790=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAspectos_relevantes_del_uso_de_enzimas_e.pdf&Expires=1720654481&Signature=bVCXzv3mAF2eN-ix

- Fernández, E. I. (2012). *Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos en Pseudomonas putida* [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. Repositorio institucional . Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.14352/48370>
- Franco, M. d., Medici, S. K., Okada, E., & Pérez, D. J. (2020). Biorremediación de aguas contaminadas por actividades agropecuarias: Uso de la planta acuática *Typha spp.* (totora) como organismo fitorremediador. *Vision Rural*, 140, 42-45.
- García, B. M. (2022). Revision bibliografica de uso de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* en practicas de biorremediacion de ambientes contaminados. *Agricolae & Habitat*.
- García, J. C., Guerrero, J. K., Pillajo, A. M., & Ponce, S. C. (2022). Evaluación de la remoción de demanda química y bioquímica de oxígeno de lixiviados mediante bacterias rizosféricas de *Typha domingensis*. *Revista Científico-Académica Multidisciplinaria*, 7(7), 2420-2444. doi:10.23857/pc.v7i7.4353
- García, M. N. (2018). *Caracterización bioquímica de una lipasa obtenida a partir de una metagenoteca de aguas termales* [Tesis de maestria: Universidade da Coruña]. Repositorio intitucional. Obtenido de <http://hdl.handle.net/2183/20336>
- Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. (2005). *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. Volumen two). USA: Board.
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., Van Noort, V., . . . De Mot, R. (2021). The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida* Group. *Microorganisms*, 9, 1766. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081766>
- Girard, L., Lood, C., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., & De Mot, R. (2020). Reliable Identification of Environmental *Pseudomonas* Isolates Using the rpoD Gene. *Microorganisms*, 8, 1166. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081166>
- Gómez, R. S., Gutiérrez, b., Hernández, A. M., Hernández, c. Z., Losada, M. c., & Mantilla, P. c. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA - Publicacion científica en ciencias biomedicas*, 6(9), 101-212.
- Gonzales, R. K. (2023). *Evaluación de la eficiencia de trampas de grasa con microorganismos eficientes para el tratamiento de efluentes proveniente de restaurantes, Tarapoto, 2022*

- [Tesis de licenciatura: Universidad Cesar Vallejo]. Repositorio institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12692/115807>
- Granada, G. O., & Masias, S. M. (2022). *Eficiencia de rizobacterias aisladas de scirpus californicus y typha dominguensis en la reducción de DQO de aguas residuales bajo condiciones de laboratorio, Cusco 2022*. Tesis de grado, Universidad Andina del Cusco, Cusco. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12557/5060>
- Gulati, A., Kiran, S., Chawla, A., & Tewari, R. (2015). Análisis de la diversidad microbiana del lago Suraj Tal en la India Transhimalaya. *Laboratorio de Microbiología y Patología Vegetal*, Publicacion directa.
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *64*, 763-781.
- Gutierrez, H. V. (2024). *Análisis multilocus para asignación de especie en Pseudomonas [tesis de licenciatura, Universidad de los Andes]*. Resositorio institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/1992/73852>
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., & Wellington, E. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol*, *63*, 3233-41.
- Jacome, P. C., Ballesteros, C., Rea, E., Rea, C. L., & Poma, V. P. (2021). Microalgas en el tratamiento de aguas residuales generadas en industrias de curtiembres. *Ciencias Ambientales*, *14*(2), 47-55. doi:<https://doi.org/10.18779/cyt.v14i2.502>
- Jiménez, D. L. (2022). *Metabolismo de ácidos grasos y síntesis de biocombustibles en Pseudomonas putida*. Tesis de doctorado, Universidad Pablo de Olavide Sevilla, Sevilla.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Young, H. B., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., . . . Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, *10*, 5029. doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

- Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, *64*, 346–351.
- Kour, D., Lata Rana, K., Kaur, T., Sheikh, I., Nath Yadav, A., Kumar, V., . . . Kumar Saxena, A. (2020). Microbe-mediated alleviation of drought stress and acquisition of phosphorus in great millet (*Sorghum bicolor* L.) by drought-adaptive and phosphorus-solubilizing microbes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *23*, 101501. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101501>
- Krinos, A. I., Medina, D., Walke, J. B., Hughey, M. C., & Sarment, L. V. (2020). Las secuencias del gen ARNr 16S son un mal predictor de la capacidad antifúngica de aislamientos bacterianos de piel de anfibios. *Ciencias Biológicas*.
- La Torre, F. (2018). *Impacto ambiental de la colmatacion de la laguna de Huacarpay Cusco [Tesis de maestria, Universidad San Agustin de Arequipa]*. Repositorio institucional.
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in bacterial taxonomy: Impact on the Genus *Pseudomonas*. *Genes*, *11*, 139.
- León, J., Pellón, F., Unda, V., David, J., Anaya, C., & Mendoza, V. (2000). Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos. *Revista Peruana de Biología*, *7*(2).
- Liceta, M. L. (2015). *Aislamiento y caracterización de Pseudomonas y Bacillus provenientes de la rizósfera de diferentes variedades de quinua (Chenopodium quinoa Willd.) y su uso como potenciales promotoras del crecimiento vegetal [Tesis de licenciatura, UNAM]*.
- Lickes, S. A. (2019). Aislamiento y caracterización de bacterias lipolíticas en aguas residuales de la Planta de tratamiento de aguas residuales de la universidad de San Carlos de Guatemala. *Agua, Saneamiento & Ambiente*, *14*(1), 2222-2499. Obtenido de <https://revistas.usac.edu.gt/index.php/asa/article/view/1157/796>
- Lin, H., Liu, C., Li, B., & Dong, Y. (2021). *Trifolium repens* L. regulated phytoremediation of heavy metal contaminated soil by promoting soil enzyme activities and beneficial rhizosphere associated microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*, *402*, 123829. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123829>

- Liu, W., & Zhang, X. (2018). Presentación directa. *Universidad de Shandong*.
- Lizano, C. O. (2012). *Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de Pseudoalteromonas Atlantica aislada de la bahía de Paracas [Tesis de licenciatura, Universidad Mayor de San Marcos]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12672/3221>
- Lopardo, A. (2016). *Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología: Enterobacterias* (1ra Edición ed.). Buenos Aires - Argentina: Asociación Argentina de Microbiología.
- López, Y. A., Moreira, L. M., & Benítez, G. A. (2021). Bacterias asociadas a *Sarcocornia neei* (Lag.) con aparente actividad hidrolítica y control biológico provenientes del Chaco seco Paraguayo. *Reportes científicos de la FACEN*, 12(1), 21-31. doi:<https://doi.org/10.18004/rcfacen.2021.12.1.21>
- Ludeña, M. P. (2020). *Evaluación del potencial degradador de hidrocarburos por bacterias del género Pseudomonas aisladas de suelos agrícolas de Casa Blanca, Pachacámac [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de San Marcos]*. Repositorio institucional.
- MaccFaddin, J. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires: Medica Panamericana S.A.
- Mahesh, G. B., & Manu, B. (2019). Removal of ametryn and organic matter from wastewater using sequential anaerobic-aerobic batch reactor: A performance evaluation study. *Journal of Environmental Management*, 249, 109390. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109390>
- Marquez, L. (2018). *Capacidad degradativa in vitro de azúcares, grasas y proteínas por bacterias Pseudomonas, Bacillus y Enterobacter de la rizósfera Schoenoplectus tatora del lago Titicaca [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional del Altiplano]*. Repositorio institucional.
- Marquina, M. E., Ramirez, Y., & Castro, Y. (2018). Efecto de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del pimentón *Capsicum annum L.* var. Cacique Gigante. *Bioagro*, 30(1), 3-16. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612018000100001&lng=es&tlng=es

- Martín, M., Martínez, G. F., & Rivilla, R. (2011). Colonización de la rizósfera por *Pseudomonas*. *Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. Fundamentos y Aplicaciones Agroambientales de las Interacciones Beneficiosas Planta-Microorganismos*, 2, 333-334. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Marta-Martin-3/publication/233782241_Colonizacion_de_la_rizosfera_por_Pseudomonas/links/00b49519a1db6879ca000000/Colonizacion-de-la-rizosfera-por-Pseudomonas.pdf
- Mende, D., Sunagawa, S., Zeller, G., & Bork, P. (2013). Accurate and universal delineation of prokaryotic species. *Nat. Methods*, 10, 881–884.
- Mendoza, D. Y., Lopez, M. T., & Montaña, A. M. (2020). Evaluación de la adición de bacterias lipolíticas autóctonas para estimular a escala de laboratorio la biodegradación de efluentes grasos de una industria aceitera. *Acta Nova*, 9(4), 618-640. Obtenido de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1683-07892020000100009&lng=es&nrm=iso
- MINISTERIO DE VIVIENDA, S. (11 de Marzo de 2019). DS N° 010-2019-VIVIENDA Decreto Supremo que aprueba el Reglamento de Valores Máximos Admisibles (VMA) para las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario. *El Peruano*, págs. 17-31.
- Miovich, V. A., & Porras, V. E. (2021). *Revisión sistemática: Propiedades fisiológicas de bacterias rizosféricas en la eliminación de materia orgánica de aguas residuales [Tesis de licenciatura, Universidad Cesar Vallejo]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12692/87251>
- Mohanan, N., Hin, W. C., Budisa, N., & Levin, D. B. (2022). Characterization of polymer degrading lipases, LIP1 and LIP2 from *Pseudomonas chlororaphis* PA23. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 2296-4185. doi:<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.854298>
- Moreno, A. V. (2021). *Construcción y evaluación de un reactor continuo de mezcla completa para la reacción de saponificación a escala laboratorio [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/3402>

- Moreno, I. P., Ferrara, M. J., De León, F. G., Rivera, B. F., & González, H. D. (2013). Comunidad bacteriana cultivable asociada a la rizocoraza de *Amaranthus hypochondriacus*. *Terra Latinoamericana*, 31, 57-69. Obtenido de <https://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v31n1/2395-8030-tl-31-01-00057.pdf>
- Mukhtar, S., Mehnaz, S., Mirza, M. S., & Malik, K. A. (2019). Isolation and characterization of bacteria associated with the rhizosphere of halophytes (*Salsola stocksii* and *Atriplex amnicola*) for production of hydrolytic enzymes. *Biotechnology and Industrial Microbiology - Research Paper*, 50, 85-97. doi:<https://doi.org/10.1007/s42770-019-00044-y>
- Muñoz, K., & Vasquez, M. (2020). *Estudio de la eficiencia del tratamiento de aguas residuales domesticas con humedales artificiales de cinco especies de macrofitas [Tesis de licenciatura, Universidad Privada del Norte]*.
- Muratova, A., Hübner, T., Tischer, S., Turkovskaya, O., Möder, M., & Kuschik, P. (2003). Plant--rhizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil. 5(2), 137-151.
- Murray, Baron, Jorgensen, Pfaller, & Tenenbaum. (2003). *Manual of clinical microbiology*. (A. S. Microbiology, Ed.) Washington, D.C.: 8th ed.
- Nicola, F. (2010). *Curso de Bacteriología Clínica*. Univ. Kennedy.
- Nikel, P. I., Chavarría, M., Führer, T., Sauer, U., & De Lorenzo, V. (2015). *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and Pentose Phosphate Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 25920-25932. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.687749>
- Ona, L. E. (2021). Plantas y microorganismos rizosféricos: Una vía sostenible para generar crecimiento vegetal. *Revista Científica Interdisciplinaria Investigación y Saberes*, 11(3), 110-131. Obtenido de http://revistasdigitales.utelvt.edu.ec/revista/index.php/investigacion_y_saberes/article/view/126
- Osorio, R. M., Carrillo, B. W., & Negrete, C. J. (2021). La calidad de las aguas residuales domésticas. *Polo del conocimiento*, 56(3), 228-245. doi:10.23857/pc.v6i3.2360

- Pardo, F. M. (2012). Revisión del género *Typha* Tourn. ex L.(Typhaceae), en Extremadura (España). *Folia Botanica Extremadurensis*, (6), 5-17.
- Paredes, L. A., Flores, F. C., & Zavaleta, A. I. (2017). Optimización del medio para la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp.* M211 en fermentación sumergida. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(4), 449-462. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2017000400010&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1810-634X
- Paternina Mercado, F., Bedoya Vélez, J., & Ochoa Agudelo, S. (2022). Comportamiento cualitativo de *Pseudomonas* aisladas de aguas residuales, expuestas a mercurio. *Informador Técnico*, 86(2), 205-219. Obtenido de <http://doi.org/10.23850/22565035.4353>
- Patterson, H. L. (2021). *Caracterización de aislados endófitos de la raíz de la planta hiperacumuladora de níquel Leucocroton havanensis [Tesis de diploma: Universidad la Habana]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://accesoabierto.uh.cu/s/scriptorium/item/2156132#lg=1&slide=0>
- Pintado, N. J. (2019). *Especies de Pseudomonas en el aire de la ciudad de Piura, Peru, entre marzo y septiembre del 2017 [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Piura]*. Repositorio institucional.
- Prescott, H. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology* (Fifth ed ed.). The McGraw Hill Companies.
- Puma, E. K., & Palomino, K. A. (2019). Caracterización de *Pseudomonas sp.* en aguas residuales de cuatro restaurantes de la ciudad del Cusco, Perú. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 10(4), 15-21.
- Quiroz, R. M. (2021). *Introducción de bacterias rizosféricas en la agricultura para la reducción de fertilizantes químicos: revisión sistemática [Tesis de licenciatura, Universidad Cesar Vallejo]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12692/77529>
- Quispe, X. J. (2021). *Análisis, acreditación y validación en el área de microbiología de alimentos y ambiental en la empresa certificaciones y calidad SAC [Tesis de licenciatura, Universidad Agraria la Molina]*. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12996/4817>

- Rahman, R. N., Geok, L. P., Wong, C. F., Basri, M., & Salleh, A. B. (2010). Molecular investigation of a gene encoding organic solvent-tolerant alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *Journal of basic microbiology*, *50*, 143-149. doi: <https://doi.org/10.1002/jobm.200900133>
- Raio, A., & Puopolo, G. (2021). *Pseudomonas chlororaphis* metabolites as biocontrol promoters of plant health and improved crop yield. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *37*, 99. doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-021-03063-w>
- Ramírez, R. J. (2023). Tratamiento de aguas residuales y problemáticas ambientales del sector textil en Colombia: una revisión. *Informador Técnico*, *87(1)*, 82-106. doi:<http://doi.org/10.23850/22565035.5304>
- Ramkumar, A., Sivakumar, N., Gujarathi, A. M., & Victor, R. (2018). Production of thermotolerant, detergent stable alkaline protease using the gut waste of *Sardinella longiceps* as a substrate: Optimization and characterization. *Scientific Reports*, *12442* (2018), 8. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-018-30155-9>
- Ramos, P. A. (2021). *Aislamiento y caracterización de Pseudomonas benéficas de la microbiota asociada a la raíz de Plukenetia volubilis [Tesis de licenciatura, Universidad de los Andes Colombia]*. Repositorio institucional. Obtenido de <http://hdl.handle.net/1992/55551>
- Raudales, G. E., Acosta, T. J., & Aguilar, H. P. (2024). Economía circular: una revisión bibliométrica y sistemática. *Región científica*, *3(1)*, 2024192. doi:<https://doi.org/10.58763/rc2024192>
- Roca, H. A., & Arias, S. J. (2012). Microorganismos capaces de hidrolizar lípidos y su utilización en depuración de aguas. *Bio iliveris research & development*. Obtenido de <https://patentimages.storage.googleapis.com/73/de/e5/237b094d8cd6bc/WO2012143591A1.pdf>
- Rodas M, E., & Botello S, W. (2016). Actividad hidrolítica de aislados bacterianos con potencial aplicación en el tratamiento de efluentes de frigorífico. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, *8(1)*, 37-43. Obtenido de <https://doi.org/10.24188/recia.v8.n1.2016.202>

- Rodrigo, T. L. (2013). *Estrategias de identificación de genes de proteasas de una cepa de Pseudomonas Fluorescens alterante de la leche [Tesis de maestría, Universidad de Oviedo]*. Repositorio institucional. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10651/18230>
- Rodríguez, N. D., Rodríguez, B. N., De la Lastra, E., Galiano, M., Barrau, C., & Capote, N. (2019). Estudios in vitro de la capacidad de biocontrol de hongos y oomicetos fitopatógenos por cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*. *Transferencia tecnológica*, 311. Obtenido de https://www.phytoma.com/images/pdf/2019/311_Tt_forestales_in_vitro_biocontrol_Bacillus.pdf
- Rolón, G. A. (2021). *Pseudomonas rhodesiae* una bacteria benéfica para la planta *Typha latifolia*. *Revista Universitarios Potosinos*, 259, 6-6.
- Rudra, B., & Gupta, R. S. (2024). Phylogenomics studies and molecular markers reliably demarcate genus *Pseudomonas* sensu stricto and twelve other *Pseudomonadaceae* species clades representing novel and emended genera. *Front. Microbiol.*, 14, 1273665. doi:10.3389/fmicb.2023.1273665
- Salazar, C. L., Hinojoza, G. M., Acosta, G. M., Escobar, T. A., & Scrich, V. A. (2020). Caracterización, clasificación y usos de las enzimas lipasas en la producción industrial. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 39(4), e620. Obtenido de https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.es_ES
- Salgado, I., Carcamo, H., Martínez, A., Carballo, M., Cruz, M., & Domínguez, M. (2011). Efectos ambientales de contaminantes químicos en las aguas: Una propuesta biotecnológica para su eliminación. *Revista cubana de química*, 23(3), 97-95.
- Salgado, I., Cruz, A., Durán, M., Oviedo, R., Carballo, M., & Martínez, A. (2010). Bacterias como herramientas potenciales en el mejoramiento de humedales artificiales para el tratamiento de aguas. *Revista CENIC*, 41(4), 1-10.
- Salgado, I., Durán, C., Cruz, A., Carballo, M., & Martínez, A. (2012a). Bacterias rizosféricas con potencialidades fisiológicas para eliminar materia orgánica de aguas residuales. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(1), 17-26.
- Salgado, I., Martínez, A., Carballo, M., Cruz, M., & Durán, M. d. (2012b). Diversidad de las bacterias rizosféricas asociadas a plantas de *Typha domingensis* en humedales del río Almendares. *CENIC Ciencias Biológicas*, 43(3), 1-7.

- Sampaio, G. F., Dos Santos, A. M., Da Costa, P. R., Rodriguez, R. P., & Sancinetti, G. P. (2020). High rate of biological removal of sulfate, organic matter, and metals in UASB reactor to treat synthetic acid mine drainage and cheese whey wastewater as carbon source. *Water Environment Research*, 92(2), 245-254. Obtenido de <https://doi.org/10.1002/wer.1235>
- Sánchez, B. D. (2013). *Estudio molecular de poblaciones de Pseudomonas ambientales*. Universitat de les Illes Balears . doi:<http://hdl.handle.net/11201/149197>
- Santamaría, Z. S. (2021). *Análisis del metabolismo, las funciones, la ecología y la taxonomía del género Pseudomonas [Tesis doctoral, Universidad de Salamanca]*. Repositorio institucional.
- Santos, J., & Villalta, J. (2015). Halotolerancia y síntesis enzimática en *Pseudomonas fluorescens* aislada de las piscinas de Ecuasal, provincia de Santa Elena, Ecuador. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 9(1), 21-25.
- Schneyder, I. A., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., . . . Neuhaus, K. (2021). Cebadores, canales y parámetros: problemas en la secuenciación del gen ARNr 16S. *Ecología microbiana*, 6(1), 01202-20. doi:<https://doi.org/10.1128/msphere.01202-20>
- Silva, R. V., & Nieto, A. C. (2020). *Comparacion de la capacidad degradadora de tres cepas de Pseudomonas frente al tereftalato de polietileno, poliestireno y polipropileno [Tesis de licenciatura, Universidad nacional san Antonio Abad del Cusco]*. Repositorio institucional.
- Solórzano, R. A. (2023). *Inoculación de Persea americana con rizobacterias de los géneros Pseudomonas y Bacillus antagonistas de Phytophthora cinnamomi y Lasiodiplodia theobromae [Tesis doctoral, Universidad Agraria la Molina]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12996/5814>
- Srivastava, J., Kalra, S., & Naraian, R. (2014). Environmental perspectives of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex. Steudel. *Applied Water Science*, 4, 193-202.
- Su, B. (2015). Presentación directa. *Instituto de Protección Vegetal*.
- Sulkin, E. S., & Willett, C. (1940). A triple sugar-ferrous sulfate medium for use in identification of enteric. *J. Lab. Clin. Med.*, 25, 649-653.

- Támara, A. K., & Mercado, B. R. (2021). *Caracterización de bacterias adaptadas al frío lipolíticas, proteolíticas, celulolíticas y amilolíticas de la Isla Livingston, Antártida [Tesis de licenciatura, Universidad Tecnológica de Bolívar]*. Repositorio institucional.
- Tamisier, M. R., Benamar, S., & Raoult, D. (2015). Cautionary tale of using 16S rRNA gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 1929–1934. doi:10.1099/ijs.0.000161
- Tang Gang, H., Zheng, X., Li, X., Liu, T., Wang, Y., Ma, Y., . . . Pan, B. (2021). Variation of effluent organic matter (EfOM) during anaerobic/anoxic/oxic (A2O) wastewater treatment processes. *Bioresource Technology*, 326, 124764. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115830>
- Torres Callupe, G. (2017). *Humedal artificial con la especie Typha dominguensis para el tratamiento de aguas grises domésticas, AA.HH. San Benito – Carabayllo, 2017 [Tesis de licenciatura, Universidad Cesar Vallejo]*. Repositorio institucional.
- Torres Guerra, J., Magno, J., Pineda, R., & Cruz, M. (2017). Evaluación de la eficiencia en el tratamiento de aguas residuales para riego mediante humedales Artificiales de flujo libre superficial (FLS) con las especies *Cyperus Papyrus* y *Phragmites Australis*, en Carapongo Lurigancho. *Revista de Investigación Ciencia, Tecnología y Desarrollo*, 3(2). doi:DOI:http://dx.doi.org/10.17162/rictd.v1i2.954
- Trinh, C. S., Lee, H., Lee, W. J., Lee, S. J., Chung, N., Han, J., . . . Lee, H. (2018). Evaluation of the plant growth-promoting activity of *Pseudomonas nitroreducens* in Arabidopsis thaliana and Lactuca sativa. *National Center for Biotechnology Information*, 37, 873-885. doi:10.1007/s00299-018-2275-8
- Uquiche, R. (2019). *Alimentación y biología reproductiva de la carpa común (Cyprinus carpio(Linnaeus, 1758)) en las lagunas de Huacarpay y Urcos, provincia de Quispicanchi–región Cusco [Tesis de licenciatura, UNSAAC]*.
- Vazquez, F. P. (2012). Revision del genero *Typha* Tourn. ex L. (Typhaceae), en Extremadura (España). *Fol. Bot. Extremad*, 6, 5-17.
- Velasco, J., Castellanos, O., Acevedo, G., Clarenc, R., & Rodriguez, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 333-345. doi:<https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>

- Venero, G. J. (2015). *Guía de Macrofauna y Etnornitología en "Lucre-Huacarpay* (Moderna ed.). Cusco.
- Watanabe, N., Ota, Y., Minoda, Y., & Yamada, K. (1977). Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agricultural and Biological Chemistry*(41(8)), 1353–1358. Obtenido de <https://doi.org/10.1080/00021369.1977.10862697>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., . . . Móra, R. R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol*, 12, 635–645. doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yoguez, A. L. (2020). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Bacopa monnieri wettst [Tesis de maestria, Instituto Politecnico Nacional]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/30642/Tesis%20Yoguez%20Alcantara%20Leonardo.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- Yu Guanlong, c., Peng, H., Fu, Y., Yan, X., Du, C., & Chen, H. (2019). Enhanced nitrogen removal of low C/N wastewater in constructed wetlands with co-immobilizing solid carbon source and denitrifying bacteria. *Bioresource Technology*, 280, 337-344. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.043>

ANEXOS

ANEXO N° 1

CLAVE TAXONOMICA DEL GÉNERO *Typha*

Revisión del género *Typha* Tourn. ex L. (Typhaceae), en Extremadura (España)

Francisco M^a Vázquez Pardo

Grupo de investigación HABITAT. Departamento de Producción Forestal y Pastos. Centro de Investigación La Orden-Valdesequera. Consejería de Empleo, Empresa e Innovación. Gobierno de Extremadura. Apartado de Correos 22. 06080. Badajoz (España). Email: frvazquez50@hotmail.com

Resumen:

En el presente trabajo se revisa la diversidad del género *Typha* Tourn. ex L., en Extremadura, aportándose información que facilita la identificación de todos sus taxones. Se estudia y tipifica los taxones *T. angustifolia* L., *T. domingensis* (Pers.) Steud., *T. australis* Schumand., y *T. latifolia* L. Se propone la combinación *T. domingensis* subsp. *australis* (Schumand.) F.M.Vázquez comb. nov., y por último se pone de manifiesto por primera vez para Extremadura de presencia de los siguientes taxones: *T. domingensis* subsp. *australis* (Schumand.) F.M.Vázquez; *T. xglauca* Godr., y *T. xgezei* Rothm. Vázquez, F.M. 2012. Revisión del género *Typha* Tourn. ex L. (Typhaceae), en Extremadura (España). *Fol. Bot. Extremad.* 6: 5-17.

Palabras clave: Extremadura, *Typha*, Typhaceae, Taxonomía, Corología, Biodiversidad.

Abstract:

The *Typha* Tourn. ex L., study from Extremadura, revealed information for discrimination between different taxa. Also, are study and typified the taxa: *T. angustifolia* L., *T. domingensis* (Pers.) Steud., *T. australis* Schumand., y *T. latifolia* L., is proposed the combination *T. domingensis* subsp. *australis* (Schumand.) F.M.Vázquez comb. nov., and finally are indicated the first occasion for Extremadura the following taxa: *T. domingensis* subsp. *australis* (Schumand.) F.M.Vázquez; *T. xglauca* Godr., y *T. xgezei* Rothm. Vázquez, F.M. 2012. Review of *Typha* Tourn. ex L. (Typhaceae) from Extremadura (Spain). *Fol. Bot. Extremad.* 6: 5-17.

Key words: Extremadura, *Typha*, Typhaceae, Taxonomy, Chorology, Biodiversity.

Introducción

El estudio de la diversidad vegetal de los humedales, y las cuencas fluviales de los espacios del sudoeste de la Península Ibérica, nos obliga a conocer uno de los grupos de vegetales que con más frecuencia y más abundantemente aparecen representados: enneas o espadañas. Las espadañas se integran dentro del género *Typha* Tourn. ex L., y ocupan lugares encharcados con una profundidad media que no suele superar el metro de profundidad, habitualmente aparecen arraigados en zonas de aguas someras con una profundidad que varía entre los 20-80 cm, colonizando las orillas de lagunas, charcas y márgenes de ríos, siempre que las aguas dispongan de baja o nula corriente, ya que uno de los limitantes al asentamiento de estas especies son las fuertes corrientes, de modo que son especies que no ocupan los márgenes de torrentes o vías de aguas procedentes de zonas montañas o de fuertes pendientes. El interés de estudio de la diversidad de este género obedece al enorme poder depurador que tienen las especies de enneas, sin embargo no se dispone de un estudio pormenorizado y amplio de toda la diversidad y variabilidad de las especies del género *Typha* Tourn. ex L., para Extremadura y consecuentemente para el SW de la Península Ibérica. Conocer las especies y variantes que tiene el género *Typha* Tourn. ex L., en Extremadura es el objetivo de este trabajo por diversos motivos: a) la selección de materiales de este género para su posterior mejora en la depuración de aguas residuales; b) evaluar la posible distribución de variantes y especies del género dependiendo de criterios geográficos, y/o ambientales; c) determinar la diversidad real del género en Extremadura; d) disponer de criterios y herramientas acertadas que faciliten la identificación de la diversidad del género *Typha* Tourn. ex L., en Extremadura.

Cuando nos pusimos a estudiar la diversidad y distribución del género *Typha* Tourn. ex L., en Extremadura confirmamos que las obras clásicas centradas en Extremadura, ponían de manifiesto la presencia de al menos tres especies *T. latifolia* L. (Rivas Mateos 1931; Rivas Goday, 1964; Devesa, 1995); *T. angustifolia* L. (Rivas Mateos 1931; Devesa, 1995) y *T. domingensis* (Pers.) Steud. (Rivas Goday, 1964 (sub. *T. angustifolia* ssp. *australis* (Schum. & Thonn.) Graebner); Devesa, 1995). Las monografías de flora local como la de Ladero (1970), para la comarca de Villuerca-Ibores (Cáceres); Belmonte (1986) para la comarca de Monfragüe; Ruiz (1988), para la comarca del Campo Arañuelo; Vázquez (1989), para el Sur de Badajoz; Amor & al. (1992) para la Vera, habían puesto de manifiesto la misma diversidad, aunque no en todos los casos se contemplaban las tres especies previamente indicadas. La última revisión para flora Ibérica (Cirujano, 2010), nos ponía de manifiesto la ausencia en territorio extremeño de *T. angustifolia* L., al igual que en otras zonas de la Península Ibérica, donde previamente se había indicado su presencia, habiéndose confundido frecuentemente con *T. domingensis* (Pers.) Steud. Esta situación, unida a la existencia de híbridos y a la presencia de algunas poblaciones de espadañas que no podíamos asignar a la diversidad recogida en Flora Ibérica, nos generó interés en la revisión del género *Typha* Tourn. ex L., en la comunidad extremeña.

Metodología

Apoyándonos en el objetivo previamente propuesto se procedió a una campaña extensa de recolección por toda la geografía extremeña, con el fin de rescatar toda la diversidad y variabilidad de taxones que potencialmente pudieran existir en el territorio. Unido a la campaña de recolecciones se procedió al estudio de los materiales conservados previamente en el herbario HSS, junto con el estudio y revisión de materiales en los herbarios K, S-LINN, BM-L, UPS-BURSER y puntualmente P y C (Holmgren & al., 1990), a fin de completar un conocimiento más extenso y acertado de la diversidad de este género en las zonas tropicales y subtropicales.

Junto con la revisión de los materiales se procedió a un estudio morfológico y parcialmente de la anatomía foliar de las hojas inferiores a fin de completar un listado amplio de caracteres que facilitara la segregación de los taxones de forma sólida, y permitiera reconocer con acierto la identidad de los materiales tipos a los que hemos tenido acceso.

La información obtenida del estudio morfológico y anatómico, junto con el de revisión de una gran cantidad de bibliografía sobre el género *Typha* Tourn. ex L., en buena parte del mundo se ha organizado en tablas y descripciones que permiten distinguir y caracterizar acertadamente cada uno de los taxones encontrados en el estudio.

El estudio se ha completado con una revisión taxonómica de los taxones disponibles, donde se ha incluido revisión de nombres, claves e ilustraciones que facilitan la comprensión de cada uno de los taxones encontrados en dos apartados anexos a las descripciones que son "Anotaciones" y "Observaciones". Finalmente se anexa un listado de los materiales estudiados.

Resultados y discusión

Los resultados que se aportan se circunscriben a poner de manifiesto la descripción de toda la diversidad encontrada para el género *Typha* Tourn. ex L., en Extremadura.

Bibliografía básica para el género *Typha* Tourn. ex L., en Extremadura: Schnizlein, A. 1845. *Typhaceen*. In Ruecksicht, B. D. *Natur. Pfl. Fam.* 28 pp; Rohrbach, P. 1870. Ueber die europäischen Arten der Gattung *Typha*. *Verh. Bot. Ver.* 11: 67-101; Kronfeld, M. 1889. Monographie der Gattung *Typha* Tourn. *Verh. Zool. Bot. Ges. Wien*, 39: 89-190; Graebner, P. 1900. *Typhaceae* u. *Sparganiaceae*. In Engler, A. *Das Pfl.* 1(2): 1-29; Geze, M.J.B. 1911. Le *Typha domingensis* Pers. (*sensu amplo*). *Bull. Soc. Bot. France* 58: 457-461. Cirujano, S. 2010. *Typha* L. In Castroviejo, S. (ed. Gral) *Flora Ibérica* XVIII: 259-266.

***Typha* Tourn. ex L., Sp. Pl. 971. 1753.**

Sinónimos:

Typha Costa, *Introd. Fl. Catal.* p. lxx. 292 (Index). 1864.

Massula Dulac, *Fl. Hautes-Pyrénées* 47. 1867.

Rohrbachia (Kronf. ex Riedl) Mavrodiev, *Bot. Zhurn.* (Moscow & Leningrad) 86(9): 120. 2001.

Especie tipo: *Typha angustifolia* L.

Plantas herbáceas, glabras. Rizoma horizontal. Tallos erectos, simples, cilíndricos. Hojas alternas, ensiformes, lineares, envainantes; vaina que rodea largamente al tallo, con la parte interna superior lisa o cubierta de glándulas mucilaginosas de color pardo, que se atenúa paulatinamente hacia el limbo o con 2 aurículas terminales; lámina convexa por el envés. Inflorescencia terminal, formada por dos partes espiciformes, muy densas, con 1 o más brácteas foliáceas caedizas que pueden estar en contacto, o separadas por una porción desnuda del eje; la masculina, ligeramente cónica; la femenina con raquis secundarios papiliformes, subpiramidales o filiformes. Flores masculinas con numerosas bractéolas desde filiformes hasta espatulado-lanceoladas, simples o ramificadas; estambres 1-5(7), filamentos total o parcialmente soldados; anteras oblongas, basifijas, con dehiscencia longitudinal; conectivo prolongado en ápice obtuso o apiculado; polen en mónadas o en tétradas; las femeninas ebracteoladas, o con bractéolas filiformes ensanchadas en el ápice; las fértiles insertadas en los raquis secundarios y entre ellos, con ginóforo filiforme provisto de largos pelos sedosos; las estériles generalmente en la parte superior del raquis, solitarias o agrupadas, con ginóforo provisto de un menor número de pelos que las fértiles. Ovario fértil fusiforme, unilocular, con un rudimento seminal anátropo; estilo filiforme; estigma lanceolado, ovado-lanceolado o filiforme, a veces arqueado; en las flores estériles el ovario es obovoide u obcónico, con estilo y estigma rudimentarios. Fruto fusiforme monospermo, con dehiscencia longitudinal. Semilla fusiforme, truncada en el extremo superior. Embrión cilíndrico.

Anotación a la selección de la especie típica del género:

La elección de esta especie como tipo del género obedece a la propia descripción original de Linnaeus (1753), en la que incluye todas las descripciones genéricas de *Typha* bajo la descripción de esta especie:

2. TYPHA foliis semicylindricis, spica mascula feminea – *angustifolia*.
que remotis. It. Scan. 198.

Typha. Hort. cliff. 439. Fl. Suec. 772. Roy. luqdb. 73.

Gmel. Sib. I. p. 133. Fuchs. hist. 822.

Se pone en evidencia, que aunque como habitualmente hace Linnaeus (1753), al describir un grupo de especies dentro de un género, suele incluir la descripción genérica o insertar las descripciones genéricas previas sobre la primera especie de la lista, en este caso salta esta regla para designar como especie que debe disponer o recibir las descripciones del género a la designada con número “2”. En este caso, al igual que en los casos precedentes, donde la especie tipo del género es aquella que aparece en primer lugar de la lista y le acompaña las descripciones previas para el género, la especie tipo para el género debe ser *Typha angustifolia* L.

x 0,5-0,9 cm, cilíndrica, de color pardo oscuro; frecuentemente separada de la femenina por una porción limpia de hasta 4,5 cm; la parte femenina de 8-20(22) x 0,8-1,7 cm, cilíndrica, de color oscuro. Flores masculinas con bractéolas de 2-4,5 mm, de filiformes a espatuladas, simples o ramificadas, con estambres; filamentos de hasta 3,5 mm, flexibles; anteras 1,5-3 mm, con el ápice del conectivo variable, de obtuso hasta apiculado; polen en mónadas; las femeninas con bractéolas de 3,5-6,5 mm, de ápice redondeado y mucronado; las fértiles de 4-8 mm; ovario fusiforme, de 1-1,6 mm, con ginóforo provisto de numerosos pelos dispuestos en 2-4 verticilos, que no sobrepasan los estigmas de hasta 1,8 mm, claramente arqueados, lanceolados, ensanchados en el tercio inferior, de margen ondulado, con tonos rojizos, a veces maculados; las estériles de 3-6,5 mm; ovario 1-1,4 mm, ovoide, con ginóforo provisto de 1-3 verticilos de pelos que no sobrepasan el estigma rudimentario. Fruto fusiforme de 0,9-1,2 mm. n = 15.

Anotaciones a la tipificación:

De la descripción original de Linnaeus (1753), podemos rescatar varias fuentes en las que buscar el tipo. El primer lugar a buscar es el propio herbario de Linnaeus, y en este sentido disponemos de un ejemplar (LINN 1094.1), que se ajusta a la descripción original, y se trata de material con el que contaba Linnaeus previo a la publicación de *Species Plantarum*. Los posibles tipos adicionales reflejados en la descripción *Typha palustris, clava gracili*, Bauh. Pin. 20/ *Typha palustris media*. Moris. hist. 3. p. 246. s. 8. t. 13. f.2, hemos de buscarlos en el herbario UPS-BURSER y en las lámina nº 2 de la Sección 8 tabula 13 en Morisson (1680), respectivamente. En UPS-BURSER no existe material asignable a la descripción de Bauhinus (1623), y en la obra de Morisson (1680) existe un material perfectamente asignable a la descripción de Linnaeus (1753). Una vez expuesto los posibles tipos existentes es preciso indicar que de los dos posibles tipos (LINN 1094.1, Morisson 1680 (Sección 8 Tab. 13 fig. 2)), el conservado en LINN dispone de flores femeninas con estigma lineal, arqueado, con ginóforos provistos con 1-2 verticilos de pelos hialinos por debajo del estigma, y con bractéolas de ápice ensanchado y redondeado, mientras que la lámina de Morisson (1680), puede ser asignable a *T. angustifolia* L., *T. domingensis* (Pers.) Steud., *T. laxmannii* Lepechin, o cualquier otra especie del género con hojas de tamaño medio, inflorescencias masculina y femenina separadas, de color amarillento en la floración. La lámina de Morison (1680), es asignable a *Typha media* Schleich., *Cat. pl. Helv.* ed. 1: 59 1801. (ind. loc.: "Moris." Lectotipo: Moris. hist. 3. p. 246. s. 8. t. 13. f.2! Morison (1680) (designado aquí) (*nom. nud.* sensu Graebner 1900)), ya que la lámina y descripción de Morison (*l.c.*) no define/discrimina con claridad la especie. Este criterio más tarde se complicará en *Typha media* DC. in Lamarck & DC., *Syn. Fl. Gall.*:148. 1806 *nom. nud.*, que suma la descripción a *T. media* Schleich, más *T. angustifolia* β L. 1378, de Linnaeus (1763), es decir, se integra bajo *T. media* DC., a *Typha palustris media* + *Typha minima duplicis clava nobis* de Morison (1680). Como pueden entender de los potenciales materiales incluidos en la descripción original de Linnaeus (1753), sólo es posible seleccionar al material conservado en LINN, como tipo de esta especie, ya que el resto han desaparecido o son conflictivos en el uso y definición del taxón. Atendiendo al criterio de tipificación que se indica el Art. 9.2 (MacNeil & al., 2006), seleccionamos como lectotipo de *Typha angustifolia* L., el material conservado en LINN 1094.1! (ejemplar central)

Observaciones:

El estudio de las poblaciones de esta especie en el territorio extremeño nos ofrece una visión parcial de la diversidad con la que debe contar este taxón, ya que aparece de forma dispersa y habitualmente conviviendo con otras especies del género de amplia distribución. A pesar de la escasa representación hemos podido observar dos patrones de variación en el porte y morfología de las inflorescencias a nivel de especie. Existen ejemplares de porte medio a elevado que pueden llegar a alcanzar más de 2,30 m de altura, con inflorescencia alargadas de hasta 18 cm las femeninas y hasta 15 cm las masculinas que se ajustaría a la variante denominada *T. angustifolia* var. *inaequalis* Kronf., *Verh. Zool.-Bot. Ges. Wien* XXXIX: 52. 1889; mientras que las plantas de inflorescencias cortas (<14 cm), de porte medio a bajo (<1,8 m) y hojas de sección semicircular se ajustaría a la variedad típica. En nuestra opinión todas estas variaciones están asociadas a las condiciones del hábitat donde se desarrolla la especie y no debe tener consideración taxonómica.

Sin embargo es preciso hacer notar que existe una enorme diversidad de sinónimos nomenclaturales asociados a esta especie que se generan porque cuando Linnaeus (1753), describe la especie introduce el sinónimo *Typha palustris media* Morison (1680), que para algunos autores (*Typha media* Schleich., *Cat. pl. Helv.* ed. 1: 59 1801. (ind. loc.: "Moris." (*nom. nud.* sensu Graebner 1900)) (= *T. angustifolia* β L. 1378) *Typha media*, DC. in Lamarck & DC., *Syn. Fl. Gall.*:148. 1806 *nom. nud.* (= *T. angustifolia* β L. 1378) *Typha media* DC. in Lamarck & DC., *Fl. Franc.* VI: 302. 1815 (= *T. angustifolia* β L. 1378) *Typha media* Pollini, *Fl. Veron.* III: 100. 1824. (= *T. angustifolia* β L. 1378)) estaba próximo a la variante "β" de la edición 2ª de *Species Plantarum* (Linnaeus, 1763), aunque la variante "β" se corresponde con *Typha minima* Funck ex Hoppe, *Bot. Taschenb. Anfanger Wiss. Apothekerkunst* 1794: 187. 1794. (Sinónimos: *Typha minor* Smith, *Fl. Brit.* 3: 960. 1804. (Ind. loc.: "In palustribus." Lectotipo: Lobelius (1581) pg. 81, *Typha minor* A.41. T.114! (designado aquí)) (= *T. angustifolia* β L. 1378). Esta situación es la que generó confusión en la identificación de taxones próximos a *T. angustifolia* L., como *T. domingensis* (Pers.) Steudel, o *T. laxmannii* Lepech. Taxones que podrían integrarse dentro de la definición de *Typha media* de Clusius (1583) o *Typha palustris media* de Morison (1680), sinónimos que se recogen en Bauhinus 1623 y Linnaeus 1753 respectivamente para describir a *T. angustifolia* L. En esta situación el epíteto específico "media", para algunos autores (Schleicher 1801; De Candolle, 1806; Pollini, 1824), integraba a los dos sinónimos de Bauhinus (1623): *Typha palustris clavis gracilis* Bauh. y *Typha media* Clus. Mientras que el sentido de Linnaeus (1753), para *T. angustifolia* L., fue sólo *Typha palustris clavis gracilis* Bauh.

2.- *Typha domingensis* (Pers.) Steud., *Nomencl. Bot.*: 860. 1824.

Basónimo: *Typha latifolia* * *domingensis* Pers., *Syn. Pl.* 2: 532. 1807. (Ind. loc.: "Hab. ad St. Domingo". Lectotipo: P02178233! (ejemplar único, designado aquí) "Typha domingensis Persoon/ p. 481/ St. Domingo, [H A Poiteau]" <http://sonneratphoto.mnhn.fr/2011/02/07/9/P02178233.jpg>)

Sinónimos:

Typha tenuifolia Humb., Bonpl. & Kunth, *Nov. Gen. Sp. Pl.* I: 68. 1816. Ind. loc.: *Crescit in humidis, inundatis lacus Tacariguae, Laguna de Valencia, juxta Cura (Prov. Venezuelae). Floret Martio.*. Holotype P00129678! (ejemplar único, designado aquí) ("Typha tenuifolia mihi/ Typha latifolia diffe a typha /Latif. Calycibus Staminiibus que/ Laguna de Valencia, inaquis? /Bonpland A.J.A. 736)

Typha spiralis Raf., *Atl. J.* 1: 148. 1832.

Typha angustifolia β *domingensis* (Persoon) Griseb., *Fl. Brit. W. Ind.* 512. 1864.

Typha americana L.C. Richard ex Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 97. 1870.

Typha essequeboënsis Meyer ex Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 97. 1870.

Typha media Barbieri ex Rohrb., *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 90. 1870.

- Typha minuta* Schrenk ex Rohrb., *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 90. 1870.
Typha balansae Reuter ex Rohrb., *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 90. 1870.
Typha gigantea Schur ex Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 97. 1870.
Typha maxima Schur ex Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 97. 1870.
Typha angustifolia var. *domingensis* (Pers.) Hemsl., *Rep. Challenger, Bot.* 1(1): 73. 1885.
Typha bracteata Greene in *Bull. Calif. Acad.* II: 413. 1887.
Typha angustifolia subsp. *domingensis* (Pers.) Rouy, *Flore France* XIII: 331. 1912.

Planta de hasta 3,75 m. Hojas de color verde oscuro, con lámina de (0,5)0,7-1,8(2,2) mm de grosor, de margen hialino, y sección plana a ligeramente abarquillada, con la vaina abrazadora, de margen membranoso al menos en la parte distal, y de ápice ligeramente redondeado, conectado a la lámina, desprovista de glándulas en el envés y con abundantes glándulas en la parte apical de la vaina, con superficie acanalada en ambas caras. Inflorescencia espiciforme, habitualmente sin brácteas foliáceas; la parte masculina de 12-24(26) x 0,7-1,4 cm, cilíndrica, de color pardo claro; frecuentemente separada de la femenina por una porción limpia de hasta 3,5 cm; la parte femenina de 8-28(37) x 1-2 cm, cilíndrica, de color pardo rojizo a pajizo. Flores masculinas con bractéolas de 3-4 mm, de filiformes a espatulados-lanceoladas, simples o ramificadas; estambres con filamentos de hasta 4,5 mm, flexibles; anteras 1,8-4 mm, con el ápice del conectivo variable, de obtuso hasta apiculado; polen en mónadas; las femeninas con bractéolas de 4-8 mm, acuminadas; las fértiles de 4-10(11) mm; ovario fusiforme, de 0,6-1,4 mm, con ginóforo provisto de numerosos pelos dispuestos en 2-4 verticilos de ápice engrosado o liso, que no sobrepasan los estigmas lineares de hasta 1,8 mm, ligeramente arqueados, lanceolados, ensanchados en el tercio inferior, de margen ondulado, con tonos rojizos, a veces maculados; las estériles de 3-7(8) mm; ovario 1-2mm, ovoide, con ginóforo provisto de 1-3 verticilos de pelos que sobrepasan el estigma rudimentario. Fruto fusiforme de 1-1,7 mm. n = 15.

Observaciones:

Dentro de esta especie es preciso hacer notar la enorme diversidad que encontramos en relación a los caracteres florales y foliares sobre los que se ha apoyado la taxonomía del grupo. Estas variaciones y la ausencia de conocimientos sobre las características de los materiales tipos procedentes de otras regiones del mundo ha facilitado una enorme confusión para poder describir la diversidad de la especie y especialmente en la relación de nombres disponibles para explicar dicha diversidad. Posiblemente la primera descripción del taxón se debe a autores prelinneanos como Clusio (1583, *Rar. Stir. Pann.* P 716), cuando describe: "*Typha media*", mas tarde recogida por Bauhinus (1623), e integrada como sinónimo de "*Typha palustris clava gracilis*", polinombres que posiblemente integraban a varios taxones (Graebner, 1900). Pero no será hasta finales del siglo XVIII y principios del siglo XIX, cuando se comience a usar el nombre de este taxón de forma correcta, aunque inicialmente se confundió en parte con *T. angustifolia* L., (ver comentarios previos para *T. angustifolia* L.)

Junto a la problemática del reconocimiento del taxon como consecuencia de la proximidad morfológica aparente con *T. angustifolia* L., es preciso hacer notar que se han generado una enorme cantidad de nombres que pretendían describir por primera vez a la especie y que en algunas ocasiones de forma arbitraria y apoyados en caracteres morfológicos foliares, facilitaron una enorme confusión en la validez, identificación y segregación de la diversidad con la que cuenta en todo el mundo *T. domingensis* (Pers.) Steud. Un prueba de los comentarios previos son los nombres que se hacen eco de las hojas estrechas en la especie (*Typha tenuifolia* Humb., Bonpl. & Kunth.), la que se concentran en el porte mayúsculo de algunas variantes (*Typha gigantea* Schur ex Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 97. 1870; *Typha maxima* Schur ex Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 97. 1870.) o de la distribución y tamaño comparado de la inflorescencia masculina y femenina (*Typha aequalis* Schnizlein in Ruecksicht, *B. Nat. Pfl.-Fam. Typhaceae*: 25. 1845.), todos, nombres que han intentando describir la diversidad del taxón a nivel morfológico. Sin embargo esta diversidad es posible diferenciarla en base a los tipos de variaciones: a) los caracteres que son plásticos y asociados a las variaciones ambientales, que no disponen de entidad taxonómica y que sólo reflejan aspectos como estrés ambiental, régimen de precipitaciones o humedad ambiental; y b) caracteres constantes que aparecen reflejados invariablemente en cualquier ambiente y que son variaciones conservadas genéticamente. En el primer caso (a) las variaciones no se han considerado, mientras que en el segundo (b), se ha podido discriminar dos grupos de plantas atendiendo a las variaciones en la morfología de las flores, y de las hojas. Existen 1.- plantas con flores femeninas provistas de verticilos de pelos capilares, de ápice simple y agudo, con 1-2 verticilos de pelos en el ginóforo de las fértiles y con (2)3-5 en el ginóforo de las estériles; con hojas de semicircular a sub-trígona en la base de la lámina, con vainas provistas de glándulas en la zona adaxial y con el ápice de margen contiguo; frente a 2.- plantas de flores femeninas provistas de 3-5 verticilos en el ginóforo, con pelos de ápice ensanchado a engrosado; con hojas en la base de la lámina de sección plana a abarquillada, con vainas provistas o no de glándulas en la zona adaxial y con el ápice habitualmente truncado, ocasionalmente contiguo a la lámina. El primero de los casos (1.) se ajusta al tipo de *Typha australis* Schumach, frente al caso segundo (2.), que es el más frecuente en las poblaciones estudiadas y que se ajusta al tipo de *Typha latifolia* * *domingensis* Pers., (Persoon, 1808). Atendiendo a estos resultados y estimando que las diferencias encontradas entre los dos grupos no son suficientes para separarlos a nivel específico se ha propuesto considerar las variaciones encontradas a nivel de subespecies y estimar que en territorio extremeño existirían dos taxones dentro de este grupo:

- *Typha domingensis* subsp. *domingensis* (Pers.) Steud
- *Typha domingensis* subsp. *australis* (Schumach.) F.M.Vázquez comb. nov.

2a.- *Typha domingensis* subsp. *domingensis* (Pers.) Steud., *Nomencl. Bot.*: 860. 1824.

Sinónimos:

Typha domingensis var. *eudomingensis* Geze, *Bull. Soc. Bot. France* 58: 459. 1911.

Typha media Bory & Chaub., *Exp. Sc. Morée* 3(2): 29. 1832.

Typha angustata Bory & Chaub., *Exp. Sc. Morée* 3(2): 338. 1832. (Ind. loc.: "Les marais de Modon; au point culminant de la couchée de Paleogrissi, en se rendant à Coron; aux environs de Scardamule; à l'embouchure de l'Eurotas, etc.". Lectotipo: probablemente en P).

Typha angustata var. *leptocarpa* Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 88. 1870. Ind. loc.: "In Abyssinien: in

- den Thälern bei Djeladscheranne (Schimper!).” Lectotipo: K! (ejemplar único) (Schimper iter Abyssinicum./ Section tertia./ 1563. *Typha angustifolia* L./ Ad rivus in vallibus angustis prope Djeladscheranne/ U. i. 1844, d 23. Apr. 1841)
- Typha angustata* var. *gracilis* (Schur) Nyman, *Consp. Fl. Eur.* 757. 1882.
- Typha angustifolia* subsp. *angustata* (Bory & Chaub.) Briq., *Prodr. Fl. Corse* 1: 643. 1910.
- Typha angustifolia* var. *virginica* Tidestr., *Rhodora* 13(156): 242–243. 1911. (Ind. loc.: “with *Myrica cerifera* and *Baccharis halimifolia* in marsh near Millstone (Mouth of the Patuxen River), Md. (Tm. 5141) type material.” Holotipo: US n.v.)
- Typha domingensis* var. *angustata* (Bory & Chaub.) Geze, *Bull. Soc. Bot. France* 58: 459. 1911.
- Typha angustifolia* subsp. *angustata* (Bory & Chaub.) Fiori, *Agric. Colon.* (Firenze) 18(5-6): 16?. 1924.
- Typha angustifolia* var. *angustata* (Bory & Chaub.) Jordanov, *Izv. Bot. Inst.* (Sofia) 24: 123. 1973.

Hojas con la vaina amplia provista o no de glándulas circulares en la cara abaxial, principalmente en el ápice, que no continúan por la lámina, con el margen membranoso y ápice truncado, ocasionalmente contiguo con la lámina; en la cara adaxial con glándulas circulares o longitudinales en el tercio apical, alojadas en los resaltes de los nervios. Lámina de sección plana a abarquillada, de hasta 1 cm de anchura. Las inflorescencias femenina y masculina, separadas de 0,5-1,5(2,7) cm, con brácteas caducas. La inflorescencia femenina de 8-16(20) x 1-1,6 cm, con flores femeninas (fértils o estériles) de 4-7(9) mm, provistas de un ginóforo con 3-5 verticilos de pelos ensanchados en el ápice. n = 15.

Observaciones:

Dentro de la variabilidad del taxón se han detectado poblaciones con ejemplares de hojas con lámina estrecha (<7 mm), otras con inflorescencias masculinas y femeninas solapadas (no separadas), algunas de inflorescencias de menos de 10 cm, otras con las vainas de las hojas desprovistas de glándulas en la cara adaxial. Todas estas variaciones se han considerado dentro del rango de variación de la subespecie y no se han considerado con rango taxonómico. Por otro lado, en la literatura consultada se han detectado, un taxón con entidad infra-subespecífica, que pudiera tener validez, pero no hemos estudiado ningún material de origen: *Typha angustata* var. *aethiopica* Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 89. 1870. (Ind. loc.: “Am oberm Bahrel- Abiad im Land der Kitsch 7°– 9° nördl. Br. (Hartmann!), in Abyssinien (Quartin Dillon et Petit!), im District Simen (Schimper!)” Lectotipo: posible K n.v.) ≡ *Typha angustata* subsp. *aethiopica* (Rohrb.) Kronf., *Verh. K.K. Zool.-Bot. Ges. Wien* 39: 162. 1889. ≡ *Typha abyssinica* Rchb. f. ex Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 89. 1870. ≡ *Typha angustata* var. *abyssinica* (Rchb. f. ex Rohrb.) Graebn. In Engler A. D. *Pflanzenr.* 1(2): 14. 1900.

2b.- *Typha domingensis* subsp. *australis* (Schumach.) F.M.Vázquez **comb. nov.**

Basionimo: *Typha australis* Schumach. In Schumach. & Thonn, *Beskr. Guin. Pl.* 401. 1827. Ind. loc.: “Kásâmae Incolis.” Holotipo: C10004646! C-THONNING 341! (ejemplar único) HB. SCHUM. 341 *Typha* (angustifolia media m: crossed out) *australis*. *Guin/ Sp. orig!* (IDC C-Isert et Thonning n 107 III, 4,5 (<http://plants.jstor.org/specimen/c10004646>))

Sinónimos:

- Typha media* Duby in DC. *Bot. Gall.* I: 432. 1828. *nom. nud.*
- Typha daenatica* Ehb. ex Steud. *Nom. Bot.* ed. 2, II: 726. 1841.
- Typha aequalis* Schumach. in Ruedtschicht, B. *Nat. Pfl.-Fam. Typhaceae*: 25. 1845.
- Typha macranthelia* Webb in Webb & Berthel., *Phytogr. Can.* 3: 291, tab. 218. 1847. (Ind. loc.: “Hanc plantam in aquosis convallis Teneriffae Goyonje dictae prope Tacorontem legimus, prope Iquestem Buchius, eandem a Canaria misit Despreaux, nuperque ad rivulum Sancti Johannis de la Rambla Teneriffae nodum florentem vidit Bourgeaues.” Lectotipo: FI-WEBB n.v., Material adicional tipo: Webb & Berthelo 1847; tab. 218!)
- Typha angustifolia* β *australis* (Schumach.) Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 83. 1870.
- Typha damiattica* Ehrenb. ex Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 88. 1870.
- Typha erenbergii* Schur ex Rohrb. *Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg* 11: 88. 1870.
- Typha angustifolia* var. *tenuispicata* Debeaux, *Rech. Fl. Pyr.-Orient.* 2: 45. 1878.
- Typha angustifolia* subsp. *australis* (Schumach.) Graebn. in *Engler D. Pfl.* 1(2): 13. 1900.
- Typha angustifolia* var. *saulseana* Legr., *Bull. Soc. Bot. Rochel.* 23: 19. 1901.
- Typha angustifolia* subsp. *domingensis* rac. *australis* (Schumach.) Rouy, *Flore France* XIII: 331. 1912.
- Typha domingensis* var. *australis* (Schumach.) Geze, *Bull. Soc. Bot. France* 58: 459. 1911.
- Typha angustifolia* *auct. pl.* non Linnaeus (1753)

Hojas con la vaina amplia provista de glándulas circulares en la cara abaxial, principalmente en el ápice, que pueden continuar por la lámina, con el margen membranoso y ápice contiguo con la lámina; en la cara adaxial con glándulas longitudinales en el tercio apical, alojadas en los resaltes de los nervios. Lámina de sección sub-trigona a semicircular, de hasta 1,3 cm de anchura. Las inflorescencias femenina y masculina, separadas de 0,7-2,5(3,5) cm, con brácteas caducas. La inflorescencia femenina de 12-28(37) x 1,2-2 cm, con flores femeninas de 6-10(11) mm, provistas de un ginóforo con 1-2 verticilos de pelos capilares en las flores fértiles y con (2)3-5 verticilos de pelos capilares en las flores estériles. n = 15.

Observaciones:

Dentro de las variaciones encontradas en esta subespecie es preciso destacar que las mayores variaciones se encuentran ligadas a las dimensiones de las inflorescencias (con variaciones en más de 15 cm de longitud dentro de una misma población). Sin embargo, se han mantenido constante la morfología de la sección a nivel de la base de la lámina, la presencia de glándulas en la cara adaxial de la lámina y el número de verticilos de pelos en el ginóforo y la morfología del ápice de los pelos. Estos resultados no han justificado la segregación de ningún taxón a nivel infra-subespecífico.

Apéndice I
MATERIAL ESTUDIADO

***Typha angustifolia* L.**

- HS: Badajoz (Ba): Badajoz, San Isidro, 29SPD89, orilla del lago, 20-VI-1993, A. Buzo & S. Buzo (HSS 97); Badajoz, 29SPD70, 17-VI-2004, D. García (HSS 13958); Badajoz, Ctra. Badajoz - Valverde de Leganés, km. 2, 29SPD70, charcas, albercas artificial. 28-VI-2006, M. Fernández & D. García (HSS 25815); Lobón, Guadajira. Centro de Investigación "Finca La Orden-Valdesequera", 29SQD00, Cultivo experimental, 12-IX-2011, E. Albano & J. Blanco (HSS 52897); Mérida, Cornalvo, 29SQD41, márgenes de arroyos temporales, 24-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52130); Santa Amalia, 29SQD52, Márgenes de cultivos de arroz, 25-VIII-2011, J. Blanco & F.M. Vázquez (HSS 52101); Valdebotoa, 29SPD81, margen río Gévora, 16-V-1998, J. Blanco, J. M. Cerrato & F. A. Manzano (HSS 21543); Valverde de Burguillos, río Bodión, 29SQC14, 31-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52610).
- HS: Cáceres (Cc): Coria, hacia Rincón del Obispo, 29SQE12, 26-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52073); Cañamero, río Ruecas, 30STJ96, márgenes y ribazos sobre suelos ricos y encharcados, 04-IX-2011, L. Concepción & F.M. Vázquez (HSS 52624); La Granja, proximidades al pueblo, 30TTK45, pastizales, 18-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52080).

***Typha domingensis* subsp. *australis* (Schumach.) F.M. Vázquez**

- HS: Badajoz (Ba): La Albuera, ribera de La Albuera, 29SPC88, 31-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52584); Mérida, Cornalvo, 29SQD41, márgenes de arroyos temporales, 24-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52125); Santa Amalia, 29SQD52, márgenes de cultivos de arroz, 25-VIII-2011, J. Blanco & F.M. Vázquez (HSS 52105); Valverde de Burguillos, río Bodión, 29SQC14, 31-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52613).

***Typha domingensis* subsp. *domingensis* (Pers.) Steud.**

- HS: Badajoz (Ba): Ba: Badajoz, márgenes del río Guadiana, 29SPD70, 15-IX-2003, D. Peral & F. M. Vázquez (HSS 12765); Badajoz, Ctra. Ex100. Arroyo Guerrero, 29SPD92, márgenes de arroyo, 12-IX-2011, F.M. Vázquez (HSS 52847); Higuera de la Serena, la Laguna, 30STH68, margen de arroyo y charca artificial, 04-IX-2011, J. Blanco & J.M. Pavo (HSS 52618); La Albuera, ribera de La Albuera, 29SPC88, 31-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52589); La Coronada, río Zújar, 30STJ71, orillas de río, 25-VIII-2011, J. Blanco & F.M. Vázquez (HSS 52116); Lobón, Guadajira. Centro de Investigación "Finca La Orden-Valdesequera", 29SQD00, cultivo experimental, 12-IX-2011, E. Albano & J. Blanco (HSS 52827); Mérida, Cornalvo, 29SQD41, márgenes de arroyos temporales, 24-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52122); Puebla de Alcocer, presa del Zújar, Presa del Zújar, proximidades. Piscinas "naturales", 30STJ90, márgenes embalse, 14-VIII-2007, J. Blanco & J. M. Pavo (HSS 35577); Torremejía, arroyo Bonhaval, 29SQC29, márgenes de ribera, 07-IX-2011, F.M. Vázquez (HSS 52678); Santa Amalia, 29SQD52, márgenes de cultivos de arroz, 25-VIII-2011, J. Blanco & F.M. Vázquez (HSS 52100); Valverde de Burguillos, río Bodión, 29SQC14, 31-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52614).
- HS: Cáceres (Cc): Aliseda, 29SPD96, 12-IX-2011, F.M. Vázquez (HSS 52832); Cáceres, 29SQD27, Parques y jardines, 03-VI-2006, F.M. Vázquez (HSS 51389); Cañamero, río Ruecas, 30STJ96, márgenes y ribazos sobre suelos ricos y encharcados, 04-IX-2011, L. Concepción & F.M. Vázquez (HSS 52626); Casar de Cáceres, 29SQD28, 26-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52145); Coria, hacia Rincón del Obispo, 29SQE12, 26-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52069); Herrerueta, 29SPD86, 12-IX-2011, F.M. Vázquez (HSS 52848); Moraleja, proximidades de núcleos urbanos, 29TPE93, 26-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52082).
- HS: Salamanca (Sa): Bejar, Ctra. N630, dirección Cantagallo, 30TTK67, márgenes de carretera, 13-X-2011, F.M. Vázquez (HSS 53023).
- LU: Bajo Alentejo (BAL): Mértola, Alcaria Ruiva. Vale de Camelos. Monte Novo das Horcas, 29SNB98, juncal, 27-VI-2011, J. Blanco, C. Martins, C. Meireles, C. Pinto-Gomes & F.M. Vázquez (HSS 51677).

***Typha latifolia* L.**

- HS: Badajoz (Ba): Lobón, Guadajira. Centro de Investigación "Finca La Orden-Valdesequera", 29SQD00, cultivo experimental, 12-IX-2011, E. Albano & J. Blanco (HSS 52899); Mérida, Cornalvo, 29SQD41, márgenes de arroyos temporales, 24-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52117); Santa Amalia, 29SQD52, márgenes de cultivos de arroz, 25-VIII-2011, J. Blanco & F.M. Vázquez (HSS 52106).
- HS: Cáceres (Cc): Alcuéscar, ctra. Alcuéscar - Montánchez, ctra. Alcuéscar hacia Montánchez, EX - 382, KM 11, 29SQD44, cunetas de carretera, con presencia de *Adenocarpus desertorum*, 27-IV-2006, D. García, M. Gutiérrez & S. Rincón (HSS 20735); Arroyomolinos de la Vera, 30TTK53, 23-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52067); Baños de Montemayor, 30TTK56, 06-VII-2006, S. Ramos & F. M. Vázquez (HSS 27297); Baños de Montemayor, salida Autovía A-66, 30TTK56, 18-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52142); Coria, hacia Rincón del Obispo, 29SQE12, 26-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52071); Cuacos de Yuste - Garganta la Olla, 30TTK64, prados húmedos, 23-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 51049); Guadalupe, vía de Ferrocarril Guadalupe-Puertollano, 30SUJ06, márgenes de vías, 04-IX-2011, L. Concepción & F.M. Vázquez (HSS 52633); Hervás, salida de la ciudad. Ctra. Cáceres - Salamanca, 30TTK56, 18-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52184); La Granja, proximidades al pueblo, 30TTK45, pastizales, 18-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52078); Moraleja, proximidades de núcleos urbanos, 29TPE93, 26-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52086); San Martín de Trevejo, 29TPE85, 26-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52096); Villamiel a Trevejo, 29TPE84, 26-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52087).
- HS: Salamanca (Sa): Bejar, ctra. N630, dirección Cantagallo, 30TTK67, márgenes de carretera, 13-X-2011, F.M. Vázquez (HSS 53024).

***Typha xgezei* Rothm.**

- HS: Badajoz (Ba): Mérida, Cornalvo, 29SQD41, márgenes de arroyos temporales, 24-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52122).

***Typha xglauca* Godr.**

- HS: Cáceres (Cc): La Granja, proximidades al pueblo, 30TTK45, pastizales, 18-VIII-2011, F.M. Vázquez (HSS 52078).



Lámina 1. Figura de *Typha latifolia* L. A: inflorescencia; B: Hoja caulinar con secciones en la base del limbo (1), y a media altura del limbo (2); C: Flores femeninas y frutos; D: Brácteas y agrupaciones de estambres.



Lámina 2. Figura de *Typha angustifolia* L. A: inflorescencia; B: Hoja caulinar con secciones en la base del limbo (1), a media altura del limbo (2), y fracción de unión entre limbo y vaina (3) ; C: Brácteas de la inflorescencia femenina, flores femeninas y frutos; D: Brácteas de la inflorescencia masculina y agrupaciones de estambres.

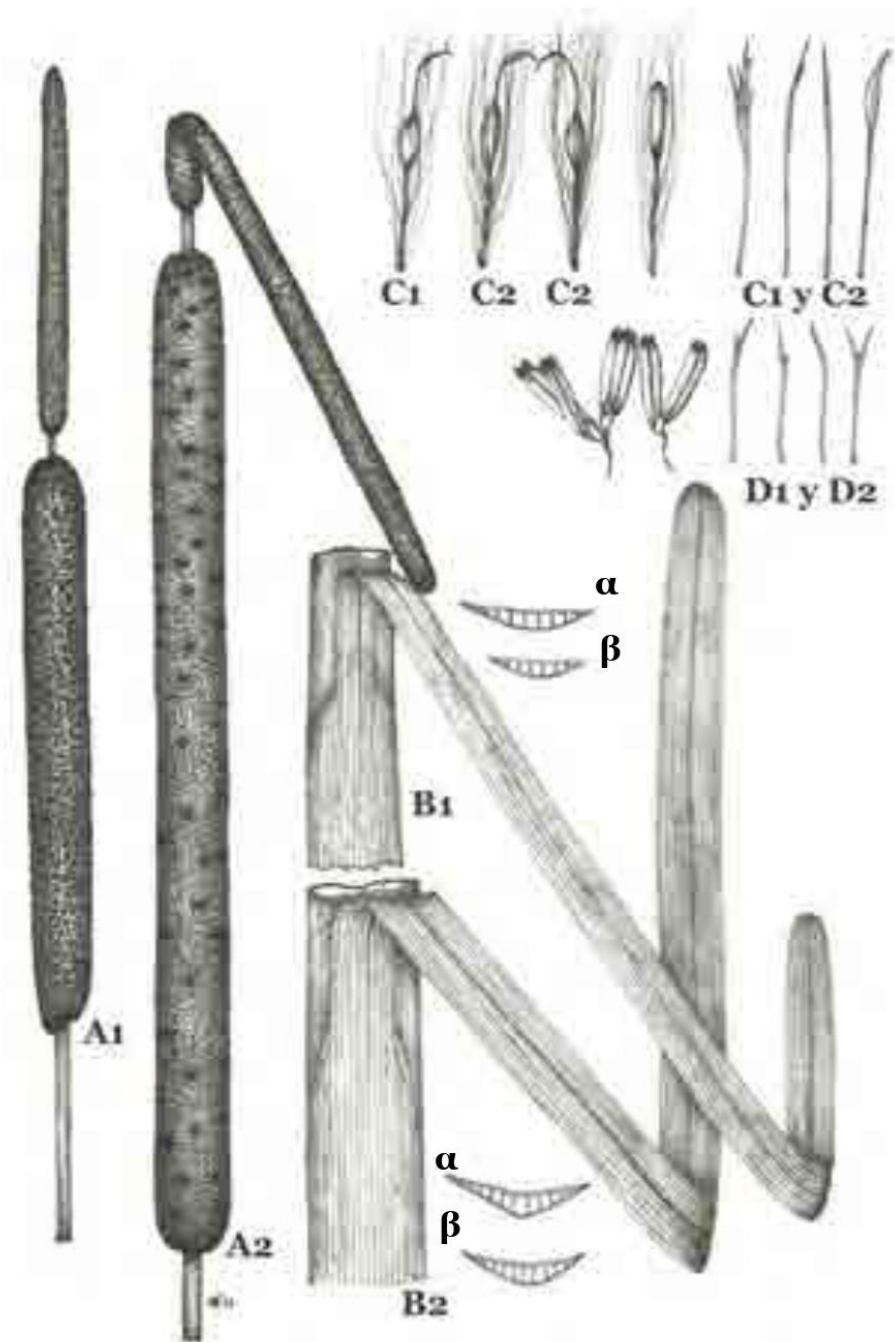


Lámina 3. Figura de (1) *Typha domingensis* subsp. *domingensis* (Pers.) Steud., y (2) *Typha domingensis* subsp. *australis* (Schumach.) F.M.Vázquez. A: inflorescencia; B: Hoja caulinar con secciones en la base del limbo (α), y media altura del limbo (β); C: Brácteas de la inflorescencia femenina, flores femeninas y frutos; D: Brácteas de la inflorescencia masculina y agrupaciones de estambres.

ANEXO N° 2

CLAVE BIOQUÍMICA PARA LA TAXONOMIA BACTERIANA DEL GÉNERO *Pseudomonas*

Cepa bacteriana	Oxidasa	Glucosa (oxidación)	Fluorescencia	Nitrito	Crecimiento a 42°C	Gelatina	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. oryzae</i>	-	+	-	-	-/+	-/+	-	-

Fuente: Nicola, 2010; Garrity *et al.* 2005.

ANEXO N° 3

PERMISO DE COLECTA DE SERFOR



Firmado digitalmente por
CHANCASANAMPA MEDINA Ronald
Serial FAU 20562836927 soft
Cargo: Administrador Técnico
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 21.12.2023 08:44:19 -05:00

SERFOR

RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

Cusco, 21 de Diciembre del 2023

RA N° D000284-2023-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS - CUSCO

VISTO:

El Informe Técnico N° D000311-2023-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO del 29 de noviembre de 2023 y la solicitud S/N del 26 de octubre de 2023 con número de expediente 2023-0050423, presentada por la señora Rosmery Hejdi Cartagena Turpo, identificada con DNI N° 73640887, quien solicita autorización con fines de investigación científica en flora y/o fauna silvestre, fuera de Áreas Naturales Protegidas, como parte de la investigación titulada "Capacidad hidrolítica de *Pseudomonas sp.* aisladas de la rizosfera de *Typha dominguensis* de la laguna de Lucre – Cusco", a desarrollarse en el área de la Laguna de Lucre - Huacarpay, provincia de Quispicanchi, departamento de Cusco; y todo lo actuado en el expediente administrativo, y;

CONSIDERANDO:

Que, el artículo 66° de la Constitución Política del Perú, establece que los recursos naturales, renovables y no renovables, son patrimonio de la Nación. El Estado es soberano en su aprovechamiento; asimismo, en su artículo 68° establece que es obligación del Estado promover la conservación de la diversidad biológica.

Que, la Ley N° 26821, Ley Orgánica para el Aprovechamiento Sostenible de los Recursos Naturales, establece en su artículo 9°, referido a la investigación científica, que el Estado promueve la investigación científica y tecnológica sobre la diversidad, calidad, composición, potencialidad y gestión de los recursos naturales. Asimismo, promueve la información y el conocimiento sobre los recursos naturales. Para estos efectos, podrá otorgarse permisos para investigación en materia de recursos naturales.

Que, el artículo 13° de la Ley N° 29763, crea el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-SERFOR, como organismo público técnico especializado, con personería jurídica de derecho público interno, como pliego presupuestal adscrito al Ministerio de Agricultura y Riego. Asimismo, se señala que el SERFOR es la autoridad nacional forestal y de fauna silvestre, ente rector del Sistema Nacional de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre (SINAFOR), y se constituye en su autoridad técnico normativa a nivel nacional, encargada de dictar las normas y establecer los procedimientos relacionados a su ámbito.

Que, el Reglamento de Organización y Funciones del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-SERFOR, aprobado mediante Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI, y modificado mediante el D.S. N° 016-2014-MINAGRI, establece en su primera Disposición Complementaria Transitoria que, las Administraciones Técnicas Forestales y de Fauna Silvestre (en adelante, ATFFS) se incorporan al SERFOR, como órganos desconcentrados de actuación local del SERFOR, con pliego presupuestal adscrito al Ministerio de Agricultura y Riego, hoy Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego.

Que, el artículo 137° de la precitada Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre, declara de interés nacional realizar la investigación, el desarrollo tecnológico, la mejora del conocimiento y el monitoreo del estado de conservación del patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación.

Firmado digitalmente por ASALDE
ALVAREZ Cinzia Jessica FAU
20562836927 soft
Motivo: Doy V° B°
Fecha: 20.12.2023 18:33:40 -05:00

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: ZMNSAJU



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

Que, el Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI, que aprueba el Reglamento para la Gestión Forestal, regula el procedimiento de otorgamiento de autorizaciones con fines de investigación científica de flora silvestre, estableciendo para tal efecto los requisitos y consideraciones para su otorgamiento, de acuerdo con los lineamientos aprobados por el SERFOR, así como las obligaciones materia de cumplimiento por parte de la titular de la autorización.

Que, el artículo 154° del Reglamento para la Gestión Forestal, establece que la investigación científica del Patrimonio se aprueba mediante autorizaciones, salvaguardando los derechos del país respecto de su patrimonio genético nativo y que son las ARFFS las que otorgan las autorizaciones con fines de investigación científica que impliquen la utilización de métodos directos e indirectos para especies no categorizadas como amenazadas y no listadas en los Apéndices CITES y que en ningún caso otorgue el acceso a los recursos genéticos o sus productos derivados. Asimismo, menciona que los derechos otorgados a través de las autorizaciones de investigación científica, no otorgan derechos sobre los recursos genéticos contenidos en ellos.

Que, mediante Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, del 01 de abril del 2016, se aprueban los "Lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre".

Que, mediante solicitud S/N, presentada el 26 de octubre de 2023, la señora Rosmery Hejdi Cartagena Turpo, identificada con DNI N° 73640887, en su calidad de investigadora principal, solicitó autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre, para la investigación titulada: "Capacidad hidrolítica de *Pseudomonas sp.* aisladas de la rizosfera de *Typha dominguensis* de la laguna de Lucre – Cusco", a desarrollarse en el área de la Laguna de Lucre - Huacarpay, provincia de Quispicanchi, departamento de Cusco, por el período de dos (2) meses.

Que, en el actual Texto Único de Procedimientos Administrativos - TUPA del SERFOR, aprobado por Decreto Supremo N° 001-2016-MINAGRI y modificado por Resolución Ministerial N° 613-2016-MINAGRI, Resolución Ministerial N° 026-2019-MINAGRI, Resolución de Dirección Ejecutiva N° D000103-2020-MINAGRI-SERFOR-DE y Resolución de Dirección Ejecutiva N° D000099-2021-MIDAGRI-SERFOR-DE; no se contempla el procedimiento de autorización para realizar investigación científica fuera de ANP.

Que, en observancia del principio de impulso de oficio, previsto en el numeral 1.3 del artículo IV del Título Preliminar del Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado con Decreto Supremo N° 004-2019-JUS; se colige que, las autoridades deben dirigir e impulsar de oficio el procedimiento y ordenar la realización o práctica de los actos que resulten convenientes para el esclarecimiento y resolución de las cuestiones necesarias.

Que, por tanto, la solicitud presentada ha sido evaluada verificando el cumplimiento de los requisitos exigidos en el numeral 9¹ del ANEXO N° 1 del Reglamento para la Gestión

¹ El numeral 9 del ANEXO N° 1 del Reglamento para la Gestión Forestal, establece los requisitos para la autorización con fines de investigación de flora, con o sin contrato de acceso a recursos genéticos, conforme la siguiente documentación:

- Solicitud con carácter de declaración jurada dirigida a la autoridad competente, según formato, que contenga hoja de vida del investigador principal, relación de investigadores y el Plan de Investigación.
- Carta de presentación de los investigadores participantes expedida por la institución científica de procedencia.
- Documento que acredite el consentimiento informado previo, expedido por la respectiva organización comunal representativa, de corresponder.

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: ZMN5AJU



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

Forestal, establece los requisitos para la solicitud de autorizaciones con fines de investigación de flora en concordancia con el numeral 6.6 de los lineamientos aprobados por Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, se establecen los siguientes requisitos para la autorización con fines de investigación científica fuera de ANP: i) Solicitud con carácter de declaración jurada que contenga información sobre el investigador, según formato; ii) Hoja de vida del investigador principal y plan de investigación, según formato; iii) Carta de presentación de los investigadores participantes, emitida por la institución académica u organización científica nacional o extranjera de procedencia; iv) Documento que acredite el consentimiento informado previo, expedido por la respectiva organización comunal representativa, de corresponder; y v) Documento que acredite el acuerdo entre las instituciones que respaldan a los investigadores nacionales y extranjeros, en caso la solicitud sea presentada por un investigador extranjero.

Que, el Informe Técnico del visto, concluye que la administrada reúne las condiciones mínimas para el otorgamiento de la autorización solicitada y que cumple con los requisitos establecidos en el numeral 9 del anexo N° 1 del Reglamento para la Gestión Forestal y los lineamientos aprobados por Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, y con los criterios técnicos para llevar a cabo el proyecto denominado "Capacidad hidrolítica de *Pseudomonas sp.* aisladas de la rizosfera de *Typha dominguensis* de la laguna de Lucre – Cusco" por el periodo de dos (2) meses, según el cronograma de trabajo del plan de investigación presentado, el cual se llevará a cabo en el área de la Laguna de Lucre - Huacarpay, provincia de Quispicanchi, departamento de Cusco, fuera de áreas naturales protegidas y de territorios de comunidades campesinas y nativas.

Que, la investigación tiene como objetivo general el determinar la capacidad hidrolítica de *Pseudomonas sp.* aisladas de la rizósfera de *Typha dominguensis* de la laguna de Lucre.; y establece como sus objetivos específicos: i) Aislar *Pseudomonas sp.* de la rizósferade *Typha dominguensis* de la laguna de Lucre; ii) Identificar *Pseudomonas sp.* mediante pruebas bioquímicas y iii) Determinar la capacidad hidrolítica de carbohidratos (Almidón, Glucosa, Lactosa, Xilosa y Fructuosa) proteínas (Gelatina y Caseína), lípidos (Tween 20 y Tween 80) y reducción de nitratos de *Pseudomonas sp.*

Que, respecto a la justificación del proyecto, la solicitante menciona que *Typha dominguensis* es considerada una especie con capacidad biorremediadora y el estudio de las bacterias presentes en los ritidomas de dicha especie pueden brindar soluciones tecnológicas a problemas ambientales.

Que, en cuanto a los métodos y técnicas a utilizar, esta consiste en la colecta de seis (6) ejemplares de la planta completa en seis zonas de la laguna de Lucre, cuidando no se dañe la raíz, solo considerando la accesibilidad y facilidad de la ubicación para la colecta. Posteriormente solo se usará la parte de los rizomas para la obtención del material que mantiene a las bacterias.

Que, conforme a los objetivos, métodos y técnicas detallados en el plan de investigación presentado, así como los plazos establecidos en el cronograma del proyecto, analizados en el Informe Técnico N° D000311-2023-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO del 29 de noviembre de 2023, es pertinente otorgar la autorización con fines de investigación científica de flora silvestre a la señora Rosmery Hejdi Cartagena Turpo identificada con DNI N° 73640887, como investigadora principal, para la ejecución del proyecto titulado "Capacidad hidrolítica de *Pseudomonas sp.* aisladas de la rizosfera de *Typha dominguensis* de la laguna de Lucre – Cusco".

- d. Documento que acredite el acuerdo entre las instituciones que respaldan a los investigadores nacionales y extranjeros, en caso la solicitud sea presentada por un investigador extranjero.

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: ZMN5AJU



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

Que, de conformidad a lo dispuesto en la Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre; el Reglamento para la Gestión Forestal, aprobado por Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI; el Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General aprobado con Decreto Supremo N° 004-2019-JUS; el Decreto Supremo N° 007-2013- MINAGRI, que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR, modificado mediante Decreto Supremo N° 016-2014- MINAGRI, en el cual incorpora a las Administraciones Técnicas Forestales y de Fauna Silvestre como Órganos desconcentrados de actuación local del SERFOR y la Resolución de Dirección Ejecutiva N° D00022-2023-MIDAGRI-SERFOR-DE;

SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Otorgar la autorización con fines de investigación científica de flora silvestre con colecta, a la señora Rosmery Hejdi Cartagena Turpo identificada con DNI N° 73640887, para la realización de la investigación científica titulada: "Capacidad hidrolítica de *Pseudomonas sp.* aisladas de la rizosfera de *Typha dominguensis* de la laguna de Lucre – Cusco" en la que participará como investigadora principal, en virtud de las consideraciones antes expuestas, correspondiéndole el Código de Autorización N° **08-CUS-AUT-IFL-2023-006**.

Artículo 2°.- El desarrollo de la investigación científica autorizada se circunscribe a el área de la Laguna de Lucre - Huacarpay, provincia de Quispicanchi, departamento de Cusco, fuera de áreas naturales protegidas y de territorios de comunidades campesinas y nativas, de acuerdo con las coordenadas referenciales detalladas en el Plan de Investigación presentado.

Artículo 3°.- La investigación científica autorizada incluye la colecta de especies de flora silvestre a realizarse en la localidad señalada en el artículo anterior, fuera de Áreas Naturales Protegidas y por el periodo señalado en el Plan de Investigación presentado.

Artículo 4°.- En mérito a la autorización que precede, la titular se encuentra sujeta al cumplimiento del cronograma de trabajo del plan de investigación aprobado, por el periodo comprendido de dos (2) meses, contados a partir del día siguiente de la notificación de la presente Resolución.

Artículo 5°.- Autorizar la participación de los investigadores propuestos por la titular para integrar el equipo de investigación, el cual queda conformado según se indica a continuación:

N°	Nombres y Apellidos	Tipo de document	N° documento de identidad	Participación en la investigación
1	Rosmery Hejdi Cartagena	DNI	73640887	Investigadora principal

Artículo 6°.- La titular de la autorización y su colaborador tienen las siguientes obligaciones:

- No extraer especímenes, ni muestras biológicas de flora silvestre no autorizada, no ceder los mismos a terceras personas, ni utilizarlos para fines distintos a lo autorizado.
- No contactar ni ingresar a los territorios comunales sin contar con la autorización de las autoridades comunales correspondientes.
- Retirar todo el material empleado para la ejecución del presente estudio una vez

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: ZMNSAJU



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

- terminado el trabajo de campo y levantamiento de información biológica.
- d) En caso corresponda, depositar el material colectado en una institución científica nacional depositaria de material biológico, así como entregar a la ATFFS Cusco la constancia de dicho depósito. En casos debidamente justificados, y siempre que el material colectado no constituya holotipos ni ejemplares únicos, el depósito se podrá realizar en una institución distinta a la mencionada para ellos se requiere la autorización del SERFOR.
 - e) Solo en el caso que por razones científicas acotadas se requiere enviar al extranjero parte del material colectado, el interesado deberá gestionar el correspondiente permiso de exportación ante la Dirección General Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR, así como pasar el control respectivo. Los ejemplares únicos de los grupos taxonómicos colectados y holotipos solo podrán ser exportados en calidad de préstamo.
 - f) Entregar a la ATFFS Cusco una (01) copia del informe final en idioma español (incluyendo versión digital) como resultado de la autorización otorgada, copias del material fotográfico y/o slides que pueda ser utilizadas para difusión. Asimismo, entregar una (01) copia de las publicaciones producto de la investigación realizada en formato impreso y digital.
 - g) El informe final deberá contener una lista taxonómica de las especies objeto de la presente autorización de colecta, en formato MS Excel. Esta lista deberá contar con sus respectivas coordenadas en formato UTM (Datum WGS84), incluyendo la zona (17,18 o 19). Asimismo, incluir los datos de colecta de cada espécimen. El informe final que debe ser usado se encuentra en el Anexo 1 de la presente resolución.
 - h) El plazo de cumplimiento de lo señalado en el literal d) y g) no deberá ser mayor a los seis (06) meses al vencimiento de la presente autorización.
 - i) Solicitar anticipadamente a la ATFFS Cusco y dentro del plazo de vigencia de la resolución, cualquier cambio en las características de la investigación aprobada, que demanden la modificación de la presente resolución.
 - j) Indicar el número de la resolución en las publicaciones generadas a partir de la autorización concedida.

Artículo 7°.- Exhortar a la titular de la presente autorización, cumplir en estricto con las disposiciones legales en materia forestal y de fauna silvestre, caso contrario se procederá a instaurar procedimiento administrativo sancionador.

Artículo 8°.- La titular deberá implementar todas las medidas de seguridad y eliminación de impactos que se puedan producir por las actividades propias de la fase de campo, como toma de datos, tratamiento y transporte de muestras, transporte de equipos, personal, entre otros.

Artículo 9°.- Los derechos otorgados a través de la presente autorización, no eximen a la titular de contar con la autorización respectiva para el ingreso a territorios de comunidades nativas o comunidades campesinas, ANP, predios privados ni áreas comprendidas en títulos habilitantes, por lo que es responsabilidad de la titular obtener las citadas autorizaciones.

Artículo 10°.- La Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre Cusco del SERFOR, no se responsabiliza por accidentes o daños sufridos por la solicitante durante la ejecución del proyecto; asimismo, se reserva el derecho de demandar al proyecto de investigación, los cambios a que hubiese lugar en los casos en que se dicten nuevas disposiciones legales o se formulen ajustes sobre la presente autorización.

Artículo 11°.- Informar que el incumplimiento de los compromisos adquiridos podrá

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: ZMN5AJU



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

ser causal para denegar futuras autorizaciones a nivel institucional.

Artículo 12°.- Notificar la presente resolución y el Informe Técnico N° D000311-2023-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO del 29 de noviembre de 2023, a la señora Rosmery Hejdi Cartagena Turpo, para su conocimiento y fines. Contra la presente resolución, es posible la interposición de los recursos impugnativos previstos en el TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado por Decreto Supremo N° 004-2019-JUS, en el plazo de quince (15) días hábiles más el término de la distancia (en caso corresponda), contados a partir del día siguiente de notificada la presente.

Artículo 13°.- Remitir la presente resolución y el Informe Técnico N° D000311-2023-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO a la Dirección General de Información y Ordenamiento Forestal y de Fauna Silvestre, para su correspondiente registro; así como, a la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre.

Artículo 14°.- Disponer la publicación de la presente Resolución en el Portal Web del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre: www.gob.pe/serfor

Regístrese y comuníquese,

Documento firmado digitalmente

RONALD SENIN CHANCASANAMPA MEDINA
ADMINISTRADOR TECNICO
ATFFS - CUSCO

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: ZMN5AJU

ANEXO N° 4

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Typha domingensis*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APARTADO POSTAL
N° 921 - Cusco - Perú
- FAX: 238156 - 238173 - 222512
- RECTORADO
Calle Tigre N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- CIUDAD UNIVERSITARIA
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226
- CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210
243835 - 243836 - 243837 - 243838
- LOCAL CENTRAL
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015
- MUSEO INKA
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"
Av. De la Cultura N° 721
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

HERBARIO VARGAS CUZ

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N°002-2024-HVC-FCB-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas CUZ, Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), certifica que la Bachiller en Ciencias Biológicas **Rosmery Hejdi Cartagena Turpo**, egresada de la **Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco**, presentó a la Dirección del Herbario Vargas (CUZ) una muestra botánica para su determinación y certificación taxonómica (Expediente N° 601827), para el proyecto de tesis "**Capacidad hidrolítica de *Pseudomonas sp.* aisladas de la rizosfera de *Typha domingensis* de la Laguna de Lucre - Cusco**", la que al ser diagnosticada por el M.Sc. Manuel Jesús Marca Zevallos, utilizando claves dicotómicas, consulta de bibliografía especializada y, comparación con las colecciones del herbario, concuerda con la siguiente especie; de acuerdo a la clasificación del Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group - APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE LOCAL
1	Typhaceae	<i>Typha domingensis</i> Pers.	"totora"

Se le expide la presente certificación a petición formal de la interesada para los fines que viera por conveniente.



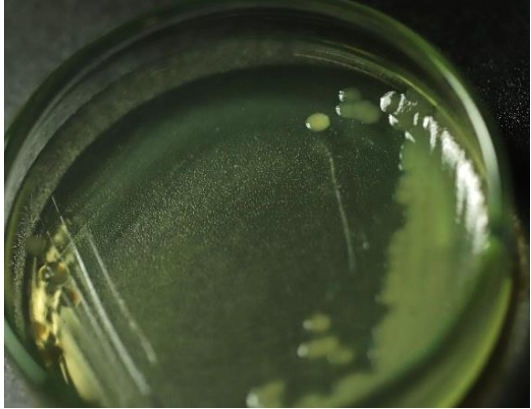

Cusco, 08 de febrero de 2024





Blga. María Luisa Ochoa Cámara
Directora del Herbario Vargas CUZ










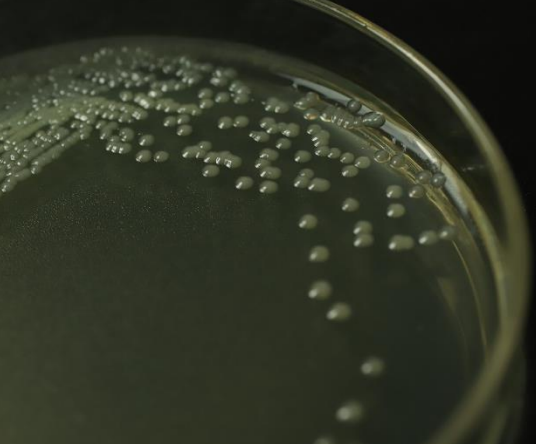
ANEXO N° 5




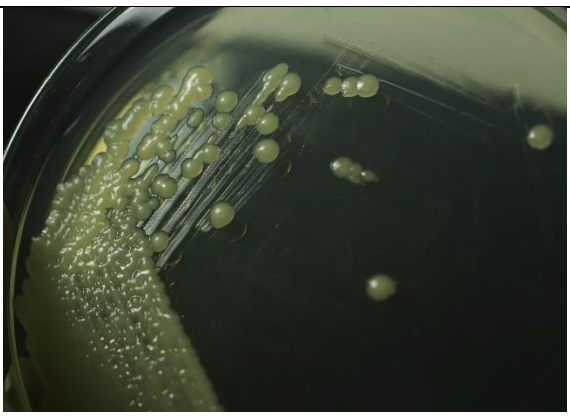
CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS DE LAS 33 CEPAS AISLADAS


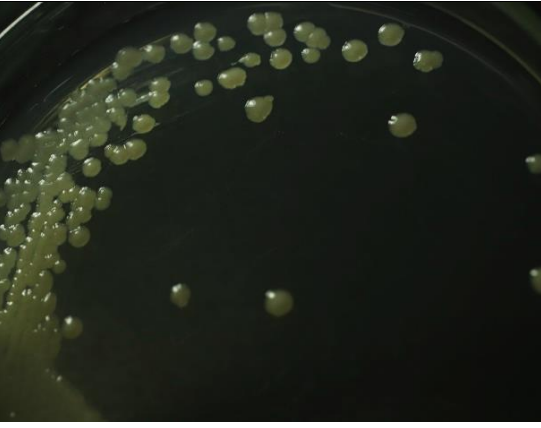
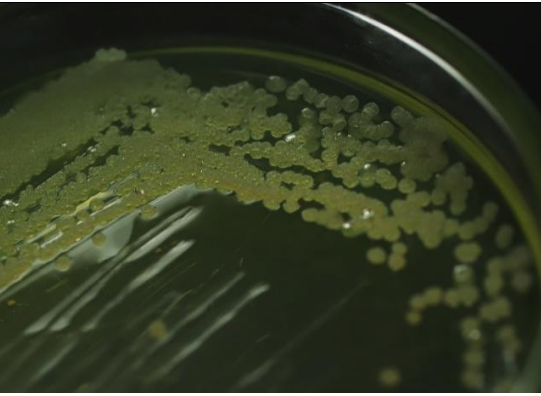

Código	Foto	Características colonia
LH1Ps-1		Identificación bioquímica: <i>P. fluorescens</i> . Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,5 mm
LH1Ps-2		Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,2 mm
LH1Ps-3		Identificación bioquímica: <i>P. fluorescens</i> . Color: Verde crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,0 mm
LH1Ps-4		Identificación bioquímica: <i>P. fluorescens</i> . Color: Verde crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 1,0 mm


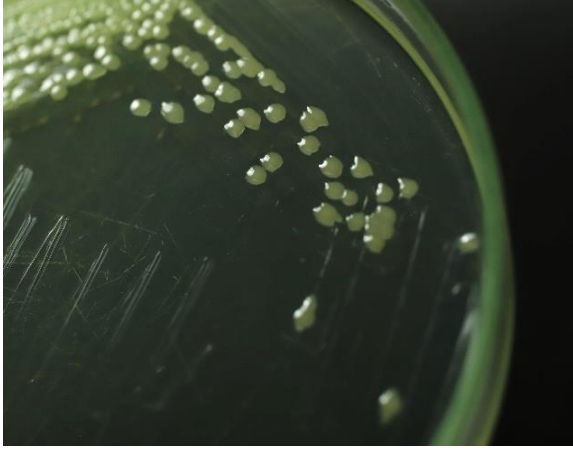


Código	Colonia	Características
LH1Ps-5		<p>Identificación bioquímica: <i>P. luteola</i>.</p> <p>Color: Verde crema</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Borde: Entero</p> <p>Elevación: Convexa</p> <p>Superficie: Lisa</p> <p>Consistencia: Cremosa</p> <p>Tamaño: 2,0 mm</p>
LH1Ps-6		<p>Identificación bioquímica: <i>P. fluorescens</i>.</p> <p>Color: Verde crema</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Borde: Entero</p> <p>Elevación: Convexa</p> <p>Superficie: Lisa</p> <p>Consistencia: Cremosa</p> <p>Tamaño: 1,5 mm</p>
LH1Ps-7		<p>Identificación bioquímica: <i>P. fluorescens</i>.</p> <p>Color: Verde crema</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Borde: Entero</p> <p>Elevación: Convexa</p> <p>Superficie: Lisa</p> <p>Consistencia: Cremosa</p> <p>Tamaño: 2,2 mm</p>
LH1Ps-8		<p>Identificación bioquímica: <i>P. fluorescens</i>.</p> <p>Color: Verde crema</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Borde: Entero</p> <p>Elevación: Convexa</p> <p>Superficie: Lisa</p> <p>Consistencia: Cremosa</p> <p>Tamaño: 2,1 mm</p>


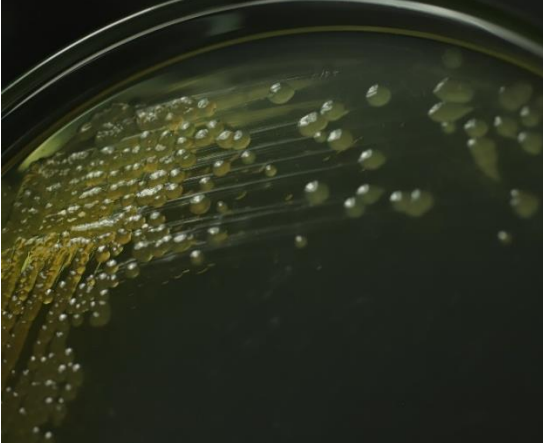
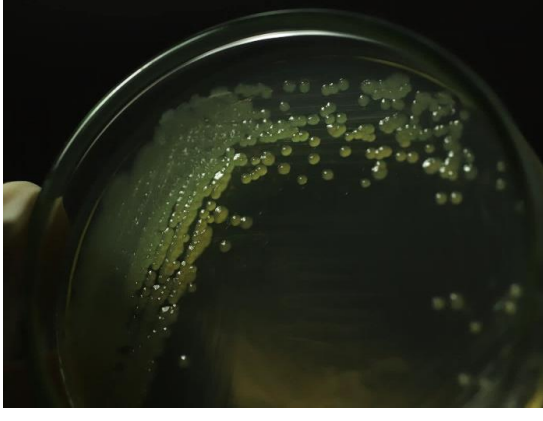

Código	Colonia	Características
LH1Ps-9		<p>Identificación bioquímica: <i>P. luteola</i>.</p> <p>Color: Verde crema</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Borde: Entero</p> <p>Elevación: Convexa</p> <p>Superficie: Lisa</p> <p>Consistencia: Cremosa</p> <p>Tamaño: 1,2 mm</p>
LH1Ps-10		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp.</p> <p>Color: Crema</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Borde: Entero</p> <p>Elevación: Convexa</p> <p>Superficie: Lisa</p> <p>Consistencia: Cremosa</p> <p>Tamaño: 2,0 mm</p>
LH1Ps-11		<p>Identificación bioquímica: <i>P. stutzeri</i>.</p> <p>Color: Verde crema</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Borde: Entero</p> <p>Elevación: Convexa</p> <p>Superficie: Lisa</p> <p>Consistencia: Cremosa</p> <p>Tamaño: 1,1 mm</p>
LH1Ps-12		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp.</p> <p>Color: Crema</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Borde: Entero</p> <p>Elevación: Convexa</p> <p>Superficie: Lisa</p> <p>Consistencia: Cremosa</p> <p>Tamaño: 2,0 mm</p>


Código	Colonia	Características
LH1Ps-13		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,6 mm</p>
LH1Ps-14		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 1,6 mm</p>
LH1Ps-15		<p>Identificación molecular: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,0 mm</p>
LH1Ps-16		<p>Identificación molecular: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,0 mm</p>

Código	Colonia	Características
LH2Ps-17		<p>Identificación bioquímica: <i>P. oryzihabitans</i>. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Umbilicada Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,0 mm</p>
LH2Ps-18		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,0 mm</p>
LH2Ps-19		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 1,0 mm</p>
LH2Ps-20		<p>Identificación molecular: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 3,3 mm</p>

Código	Colonia	Características
LH2Ps-21		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,2 mm</p>
LH2Ps-22		<p>Identificación molecular: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 3,4 mm</p>
LH2Ps-23		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Plana Superficie: Rugosa Consistencia: Cremosa Tamaño: 1,2 mm</p>
LH2Ps-24		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 1,5 mm</p>

Código	Colonia	Características
LH2Ps-25		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 0,95 mm</p>
LH2Ps-27		<p>Identificación molecular: <i>Pseudomonas nitroreducens</i> Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,0 mm.</p>
LH2Ps-28		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 0,8 mm</p>
LH2Ps-29		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,5 mm</p>

Código	Colonia	Características
LH2Ps-30		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Verde crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 1,5 mm</p>
LH2Ps-31		<p>Identificación molecular: <i>Pseudomonas fluorescens</i>. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,0 mm</p>
LH2Ps-32		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 1,1 mm</p>
LH2Ps-33		<p>Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 3,2 mm</p>

Código	Colonia	Características
LH2Ps-34		Identificación bioquímica: <i>Pseudomonas</i> sp. Color: Crema Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Cremosa Tamaño: 2,2 mm

ANEXO N° 6

PRUEBAS BIOQUÍMICAS CONVENCIONALES DE *Pseudomonas* AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE *Typha domingensis*

N°	Especie y código	Fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa	Formación de gas	Ácido sulfhídrico	Descarboxilación de la lisina	Desaminación de la lisina	Citrato	Motilidad	Indol	Descarboxilación de la ornitina	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Urea
	<i>P. fluorescens</i> (ATCC 13525)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
1	<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-1)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
2	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-2)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
3	<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-3)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
4	<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-4)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	P
5	<i>P. luteola</i> (LH1Ps-5)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	P
6	<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-6)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	P
7	<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-7)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	P
8	<i>P. fluorescens</i> (LH1Ps-8)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	P
9	<i>P. luteola</i> (LH1Ps-9)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	P
10	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-10)	-	-	-	-	-	P	P	-	-	-	-	-
11	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-11)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
12	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-12)	-	-	-	-	-	P	P	-	-	-	-	-
13	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-13)	-	-	-	-	-	P	P	-	-	-	-	-
14	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-14)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
15	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH1Ps-15)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
16	<i>P. luteola</i> (LH1Ps-16)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
17	<i>P. oryzihabitans</i> (LH2Ps-17)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
18	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-18)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
19	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-19)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
20	<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-20)	-	-	-	-	-	P	P	-	-	-	-	-
21	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-21)	-	-	-	-	P	-	-	P	-	-	-	-
22	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-22)	-	-	-	-	-	P	P	-	-	-	-	-
23	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-23)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
24	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-24)	-	-	-	-	P	P	P	-	-	-	-	-
25	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-25)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
26	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-27)	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	P
27	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-28)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
28	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-29)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
29	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-30)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
30	<i>P. fluorescens</i> (LH2Ps-31)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	P
31	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-32)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	P
32	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps-33)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	P
33	<i>Pseudomonas</i> sp. (LH2Ps.34)	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	P

Nota. P, resultado positivo; -, resultado negativo

ANEXO N° 7

SECUENCIAS OBTENIDAS DE LAS 06 CEPAS SELECCIONADAS DE *Pseudomonas*



GEN rRNA 16S DE LA CEPA LH1Ps-22

Secuencia parcial, longitud: 1472

```
GCTTACTCTTATCGAGGTTAGCCGCTGACGGGTGAGGAGGGGTGGTGTGA
ACTGGCCCAAGAATGGAATAACTCCCAGAAACCCGAGCTAATATCAGATA
CCATTTTGACCTCCATGGTTTCAATTTCAAAGGGCGCTTCAGCTGTCAC
TATGGTTGGACCCACTTCCCCTACTGGGATCTTGACGTAACGTTTCACC
CACGCTACGATCGGAGTGTTGCCAGGCCTGGGGCCATGATGACATTAT
GTCATCCCCACCACCCCGCGTTTGGACCATGCAGTTCCCCTAAAGTGTG
AACTTGGCGTGACGGAAACAAGCCACGTGGGTTATGTTTGCTTTGGGACT
TAACACTATATTTCTCGACTCGAGCTGACAACGTCATGCTGCACCGGTC
TCAGCGTTACGAAAGGCACCAATCCCTCGTTAGAAAATTCCTTGGACTCA
ATGCCCTGGTAAGGTACTTCGTGTTGCTGAAGAAAGTGGGCCATATACTGCC
```

DESCRIPCIÓN DEL ALINEAMIENTO (ID de Secuencia KR085912.1)

	Descripción	Nombre científico	Puntuación máxima	Puntuación total	Consulta de portada	Valor E	Por Identidad	Acc. Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/>	Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa IHBB 9882 de <i>Pseudomonas</i> chl...	<i>Pseudomonas</i> ...	2719	2719	100%	0.0	100,00%	1472	KR085912.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Secuencia parcial del gen ARN ribosómico 16S HC1-7 de <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> ...	2617	2617	98%	0.0	99,11%	1528	JF312919.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Secuencia parcial del gen ARN ribosómico 16S HC1-1 de <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> ...	2615	2615	98%	0.0	99,11%	1517	JF312913.1

ALINEAMIENTO DE REFERENCIA

[Descargar](#) | [Banco Genético](#) | [Gráficos](#) | [Próximo](#) | [Anterior](#)

Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa IHBB 9882 de *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *piscium*
 ID de secuencia: [KR085912.1](#) Longitud: 1472 Número de coincidencias: 1

Rango 1: 1 a 1472 [Gráficos](#) [GenBank](#) | [Próximo partido](#) | [Partido anterior](#)

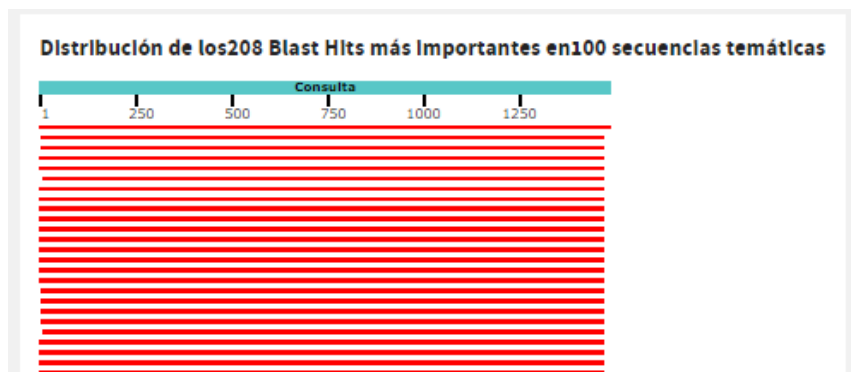
Puntaje	Esperar	Identicidades	Brechas	Hebra
2719 bits (1472)	0.0	1472/1472(100%)	0/1472(0%)	Más/Más

Consulta 1 CAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGAGGCCAACACATGCAAGTCGAG 68
 Objeto 1 CAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGAGGCCAACACATGCAAGTCGAG 68

Consulta 61 CGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAA 128
 Objeto 61 CGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAA 128

Consulta 121 TCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGAGCCTAATACCGCATACTCCTACG 188
 Objeto 121 TCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGAGCCTAATACCGCATACTCCTACG 188

ALGORITMO BLAST



GEN rRNA 16S DE LA CEPA LH1Ps-27

Secuencia parcial, longitud: 1392

TTCAGCGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGAC
AACGTTTCGAAAGAACGCTAATACCGCATACTGCCTACGGGAGAAAGCAGGG
GACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT
GGGGTAAAGGCCACCAAGCGCGGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCA
GTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGCTGTGTGAAGA
AGGTCCTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATA
CCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAAGTTCGTCAGC
AGCCCGGTAATACGAAGGGTCAAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCGCGTAGGTGGTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCTCCATAACTGCCTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC
CACCTGGACTGACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGCTCCT
TGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATATAAGTACGACCGCCTGGGAGTACG
GCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTTAATCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCC
GGAATCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATTGGAACACAGGTGCTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGC
GCAACCCTGTCCTTAGTACCAGCACGTTATGGTGGGACTCTAAGGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTA
CGGCCAGGGCTACACACGCTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG
CGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAA
CTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGCTCACACCATGGGAGT

DESCRIPCIÓN DE ALINEAMIENTO (ID de Secuencia MT386129.1)

	Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por Identidad	Acc. Len	Adhesión
✓	Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S Atecer2S de la cepa Pseudomonas nitroreducens	Pseudomonas nitroreducens	2571	2571	100%	0.0	100.00%	1392	MT386129.1
✓	Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S Atecer2L de la cepa Pseudomonas nitroreducens	Pseudomonas nitroreducens	2571	2571	100%	0.0	100.00%	1400	MT386123.1
✓	Cromosoma SCB32 de Pseudomonas sp., genoma completo	Pseudomonas sp. SCB32	2571	15418	100%	0.0	100.00%	6311241	CP045118.1
✓	Pseudomonas denitrificans (nom. rej.), cepa BG1 cromosoma, genoma completo	Pseudomonas denitrificans	2571	10281	100%	0.0	100.00%	6880508	CP043828.1
✓	Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa MB41 de Pseudomonas nitroreducens	Pseudomonas nitroreducens	2571	2571	100%	0.0	100.00%	1472	MH875504.1

ALINEAMIENTO DE REFERENCIA

Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S Atecer2S de la cepa Pseudomonas nitroreducens

ID de secuencia: [MT386129.1](#) Longitud: 1392 Número de coincidencias: 1

Rango 1: 1 a 1392 [Gráficos](#) [GenBank](#)

[▼ Próximo partido](#) [▲ Partido anterior](#)

Puntaje	Esperar	Identicidades	Brechas	Hebra
2571 bits (1392)	0.0	1392/1392(100%)	0/1392(0%)	Más/Más

Consulta 1 AGTCGAGCGGATGATGGAGCTGCTCCCGATTGAGCGGGACGGGTGAGTAATGCCT 60

Objeto 1 AGTCGAGCGGATGATGGAGCTGCTCCCGATTGAGCGGGACGGGTGAGTAATGCCT 60

Consulta 61 AGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGC 120

Objeto 61 AGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGC 120

ALGORITMO DE BLAST

