



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

## **Caracterización de bacterias productoras de esterasas aisladas de cultivos de arroz de Rioja en San Martín**

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

### **AUTOR**

Manuel Gonzalo VILCHEZ CHÁVEZ

### **ASESORES**

Dra. Amparo Iris ZA VALETA PESANTES

MSc. Juan Carlos FLORES SANTOS (Coasesor)

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Vilchez M. Caracterización de bacterias productoras de esterases aisladas de cultivos de arroz de Rioja en San Martín [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2021.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Manuel Gonzalo Vilchez Chávez
DNI	70136378
URL de ORCID	NA
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
DNI	17880045
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0003-3844-7185">https://orcid.org/0000-0003-3844-7185</a>
<b>Datos de coasesor</b>	
Nombres y apellidos	Juan Carlos Flores Santos
DNI	43583256
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-5632-7203">https://orcid.org/0000-0001-5632-7203</a>
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	B.2.6.1. Biotecnología de enzimas
Grupo de investigación	GI Biotecnología Microbiana y Salud - BIOMIAS
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCYTEC). Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT). Convenio 169-2017 Fondecyt
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Metropolitana Distrito: Cercado de Lima Dirección: Jr. Puno N°1002, Jardín Botánico Latitud: -12.056191 Longitud: -77.023744

Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2019 – Julio 2021
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03</a> Biotecnología agrícola, Biotecnología alimentaria <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Decanato**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**Caracterización de bacterias productoras de esteroides aisladas de cultivos de arroz de Rioja en San Martín**

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

**MANUEL GONZALO VILCHEZ CHÁVEZ**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado Evaluador, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

-----**Diecinueve (19) CON MENCIÓN**-----

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

**JURADO EVALUADOR** (R.D. N.º 000493-2021-D-FFB/UNMSM)

- Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga
- Dra. María Elena Salazar Salvatierra
- Dr. Christian Solis Calero
- Mg. Nelson Bautista Cruz

Lima, 02 de setiembre de 2021.



Firmado digitalmente por JIMENEZ  
ALIAGA Karim Lizeth FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 02.09.2021 10:18:23 -05:00

**Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga**  
**Presidenta**

**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

<b>INFORMACIÓN GENERAL</b>	
Título del Proyecto	Caracterización de bacterias productoras de esterasas aisladas de cultivos de arroz de Rioja en San Martín
Área de investigación (*)	Biotecnología
Líneas de Investigación (*)	Microorganismos de interés industrial y ambiental
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación (incluir localidades y/o coordenadas geográficas)	Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú.
Institución que financia si corresponde	FONDECYT - CONCYTEC
Año o rango de años que abarcó	2019 - 2021
<b>DATOS DEL TESISISTA</b>	
Apellidos y Nombres	Vilchez Chávez, Manuel Gonzalo
Número de matrícula	15040094
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado
Código ORCID (opcional)	-
<b>DATOS DEL ASESOR I</b>	
Apellidos y nombres	Zavaleta Pesantes, Amparo Iris
Código docente: 097179	Categoría: Principal Clase: Tiempo Completo
Máximo grado alcanzado	Doctora
Código ORCID (obligatorio)	0000-0003-3844-7185
Título profesional	Químico Farmacéutica
Departamento Académico al que pertenece	Bioquímica
Instituto de Investigación al que pertenece	Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo"

Grupo de investigación al que pertenece indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Biología Microbiana y Salud / Coordinadora
<b>DATOS DEL ASESOR II</b>	
Apellidos y nombres	Flores Santos, Juan Carlos
Código docente: -	Categoría: - Clase: -
Máximo grado obtenido	Maestro en Ciencias
Título profesional	-
Código ORCID (obligatorio)	0000-0001-5632-7203
Centro laboral (si es que fuera externo a la UNMSM)	-
Departamento Académico al que pertenece	-
Instituto de Investigación al que pertenece	-
Grupo de investigación al que pertenece	Biología Microbiana y Salud
Indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Externo

(\*) Según documentos oficiales de la Facultad

***La presente tesis está dedicada a:***

***Dios, por su guía y porque en Él, todo es posible.***

***Mis padres, Gonzalo e Ylonita por su apoyo incondicional en todo momento y en cada una de mis aspiraciones. Gracias a ustedes he logrado alcanzar este objetivo.***

***Mi hermano, Marcos por su compañía y motivación a ser mejor cada día.***

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis, **Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes**, por sus valiosas enseñanzas, por su confianza depositada en mí y permitirme formar parte del Laboratorio de Biología Molecular y Grupo de Investigación BIOMIAS.

A mi co asesor de tesis, **MSc. Juan Carlos Flores Santos**, por todo su apoyo, guía y motivación a lo largo de la ejecución del presente trabajo.

A cada uno de los **miembros del Grupo de Investigación BIOMIAS e integrantes del Laboratorio de Biología Molecular**, especialmente a la Dra. Karim Jiménez, Mg. Cynthia Esquerre, Mg. Carmen Peña, Mg. Elizabeth Chávez, Susana, Lucero, Nathaly, Camila, Ysamar, Deniz, César, Cleni, Abad, Stephy, Sayuri, José Antonio, Arturo y Omar por su apoyo durante el desarrollo de la presente tesis y hacer de mi estancia en el laboratorio, una de las mejores experiencias.

A cada uno de los **miembros del jurado examinador y calificador**, Dra. Karim Jiménez, Dra. María Elena Salazar, Dr. Christian Solis y Mg. Nelson Bautista por sus aportes de mejora para el presente trabajo.

A mi *alma mater*, la **Universidad Nacional Mayor de San Marcos** y a la **Facultad de Farmacia y Bioquímica**, por todas las enseñanzas brindadas a lo largo de estos 6 años de vida universitaria

El presente trabajo fue financiado parcialmente por convenio N°: 169 - 2017- Fondecyt - CONCYTEC

## TABLA DE CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>RESUMEN</b> .....	x
<b>SUMMARY</b> .....	xi
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	2
I. HIPÓTESIS ALTERNA .....	2
II. HIPÓTESIS NULA .....	2
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	3
I. Objetivo General .....	3
II. Objetivos específicos .....	3
<b>IV. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
4.1. Bacterias aisladas de cultivos de arroz .....	4
4.2. Bacterias productoras de esterasas .....	8
4.3. Esterasas .....	11
4.3.1. Mecanismo de acción de las esterasas .....	11
4.3.2. Diferencia entre esterasas y lipasas .....	14
4.3.3. Aplicación de las esterasas .....	15
<b>V. METODOLOGÍA</b> .....	17
5.1. Aislamiento y selección de bacterias productoras de esterasas .....	17
5.1.1. Recolección de la muestra .....	17
5.1.2. Aislamiento de bacterias .....	18
5.1.3. Selección de bacterias productoras de esterasas .....	18
5.2. Caracterización fenotípica .....	19
5.2.1. Pruebas fisiológicas .....	19
5.2.2. Pruebas bioquímicas .....	19
5.2.3. Hidrólisis de macromoléculas .....	20

5.2.4. Pruebas nutricionales .....	23
5.2.5. Sensibilidad antimicrobiana .....	23
5.3. Caracterización genotípica.....	24
5.3.1. Extracción de ADN genómico .....	24
5.3.2. Amplificación de los genes ribosómicos 16S .....	24
5.3.3. Secuenciación de los genes ribosómicos 16S .....	25
VI. RESULTADOS.....	26
6.1. Aislamiento de bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja.....	26
6.2. Selección de las bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivos de arroz en Rioja.....	27
6.3. Caracterización fenotípica de las bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja. ....	29
6.3.1. Caracterización microscópica y macroscópica. ....	29
6.3.2. Características fisiológicas.....	30
6.3.3. Perfiles de actividades hidrolíticas .....	35
6.3.4. Perfiles fermentativos de azúcares .....	36
6.3.5. Perfiles de sensibilidad antimicrobiana .....	38
6.4. Caracterización genotípica de bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja.....	40
6.4.1. Distribución genotípica y porcentajes de similitud de los aislados bacterianos .....	41
VII. DISCUSIÓN .....	42
VIII. CONCLUSIONES .....	50
IX. RECOMENDACIONES .....	51
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
XI. ANEXOS.....	63

## ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
µg	Microgramo
µL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATC	Ácido tricloroacético
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulosa
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTP	Desoxirribonucleótidos-trifosfato
E.C.	<i>Enzyme Comission</i>
g/L	Gramo sobre litro
h	Hora
H <sub>2</sub> S	Sulfuro de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
M	Molaridad
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Normalidad
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
p/v	Peso sobre volumen
PBS	Tampón fosfato salino

PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
pmol	Picomol
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris/Acetato/EDTA
TE	Tris/EDTA
TSA	Agar tripticasa de soya
TSB	Caldo tripticasa de soya
TSE	Tris/Salino/EDTA
U	Unidad
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen sobre volumen

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue aislar y caracterizar fenotípica y genotípicamente bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja, San Martín (Perú). Para ello, las bacterias fueron seleccionadas sobre agar Luria-Bertani suplementado con tributirina 1% v/v a 37 °C por 48 h. Después, las bacterias productoras de esterasas se caracterizaron mediante pruebas fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y sensibilidad antimicrobiana. Así, se aislaron seis bacilos Gram negativos, tres Gram positivos y un coco Gram positivo, todas son mesófilas, crecen a pH entre 4 a 10 y presentan baja halotolerancia. Seis bacterias fermentaron fructuosa, glucosa y sacarosa; y cuatro no metabolizaron estos azúcares. Todas las cepas hidrolizaron aceite de oliva y fueron sensibles a cefoxitina, eritromicina y cloranfenicol. Del análisis de las secuencias de los genes ribosómicos 16S, estas bacterias pertenecen a los géneros *Acinetobacter* (3), *Staphylococcus* (1), *Bacillus* (3), *Comamonas* (1) y *Aeromonas* (2). Las bacterias caracterizadas presentan gran potencial como inóculos para la producción de enzimas, exopolisacáridos, estimulantes de crecimiento vegetal y tratamiento de suelos contaminados.

**Palabras claves:** cultivos de arroz, esterasas, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Comamonas*.

## SUMMARY

The aim of this study was to isolate and characterize phenotypically and genotypically esterase-producing bacteria isolated from rice paddy soil from Rioja, San Martin (Peru). For that, bacteria were selected on Luria-Bertani agar supplemented with 1% v/v tributyrin at 37 °C for 48 h. Afterwards, esterase-producing bacteria were characterized by physiological, biochemical, nutritional, and antimicrobial-sensitivity tests. Thus, six Gram negative bacilli, three Gram positive and one Gram positive cocci were isolated, all of them are mesophilic, grow at pH between 4 and 10 and, have a low halotolerance. Six bacteria fermented fructose, dextrose and sucrose; and four did not metabolize these sugars. All strains hydrolyzed olive oil and were sensitive to cefoxitin, erythromycin and chloramphenicol. From 16S ribosomal gene sequencing analysis, isolated bacteria belong to the genus *Acinetobacter* (3), *Staphylococcus* (1), *Bacillus* (3), *Comamonas* (1) and *Aeromonas* (2). These characterized bacteria have a huge potential as inoculums for enzyme production, exopolysaccharides, plant-growth promotion, and contaminated soil treatment.

**Keywords:** rice paddy, esterase, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Comamonas*

## I. INTRODUCCIÓN

*Oryza sativa* (arroz) es considerado uno de los cultivos más importantes en la costa y zonas tropicales, así como, una fuente de energía de la dieta en Perú y en diversos países. A nivel global, los campos de cultivo están en el continente asiático con más del 90% del área cultivable, siendo China e India los más representativos<sup>1,2</sup>.

Con referencia a las condiciones de cultivo del arroz y las características de sus suelos, parte de la biota de estos ambientes ha sido estudiada en el continente asiático, logrando identificar una gran diversidad de microorganismos que cumplen distintos roles como es la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de minerales, la producción de metabolitos para el control de fitopatógenos, entre otros<sup>3,4</sup>. Asimismo, los microorganismos aislados de estos ambientes han sido descritos como productores de enzimas de interés biotecnológico<sup>5,6</sup>.

En Perú, los terrenos de cultivo de arroz están ubicados principalmente en los departamentos de Lambayeque, Piura y San Martín, destacando la provincia de Rioja como uno de los mayores productores<sup>7</sup>. Gran parte de estos ambientes es sometida a plaguicidas químicos con el objetivo de mejorar su producción, destacando aquellos de tipo organofosforados y carbamatos que contienen enlaces éster en su estructura química<sup>8,9</sup>. Esta exposición ha generado la adaptación de los microorganismos a la producción de esterasas, enzimas que actúan sobre un amplio espectro de sustratos<sup>10,11</sup>. Sin embargo, en Perú, son escasos los estudios relacionados con la microbiota de estos suelos de cultivo y sus características, los cuales podrían representar un reservorio de nuevas fuentes microbianas productoras de enzimas como las esterasas que permitirían la biorremediación de estos terrenos de cultivo, impactando de manera positiva en su fertilidad. Por tanto, el objetivo del presente estudio consistió en aislar, caracterizar e identificar bacterias productoras de esterasas provenientes de suelos de cultivo de arroz en Rioja, San Martín (Perú).

## **II. HIPÓTESIS**

### **I. HIPÓTESIS ALTERNA**

Las bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja pertenecen a diferentes géneros.

### **II. HIPÓTESIS NULA**

Las bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja pertenecen al mismo género.

### **III. OBJETIVOS**

#### **I. Objetivo General**

Determinar las características fenotípicas y genotípicas de las bacterias productoras de esterazas aisladas de muestras de suelos de cultivos de arroz de Rioja.

#### **II. Objetivos específicos**

1. Aislar y seleccionar bacterias productoras de esterazas a partir de muestras de suelos de cultivos de arroz.
2. Determinar las características fenotípicas de bacterias productoras de esterazas aisladas de muestras de suelos de cultivos de arroz.
3. Determinar las características genotípicas de las bacterias productoras de esterazas aisladas de muestras de suelos de cultivos de arroz mediante técnicas moleculares.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Bacterias aisladas de cultivos de arroz

A nivel global, el arroz es considerado uno de los cultivos más importantes cuya producción y consumo se distribuye aproximadamente en un 90% en el continente asiático. Es cultivado en diversos entornos, desde tierras altamente irrigadas hasta aquellas que son de secano y, su crecimiento, se encuentra favorecido bajo condiciones húmedas y cálidas<sup>1,12,13</sup>. Estos cultivos representan el hábitat de bacterias, distribuyéndose tanto en los tejidos vegetales como en el suelo permitiendo así el desarrollo y crecimiento vegetal.

Los terrenos de cultivo de arroz pasan por periodos en los cuales son sometidos a procesos de inundaciones temporales o permanentes (anegamiento), existiendo una mayor probabilidad de encontrar microorganismos anaeróbicos como son las bacterias metanogénicas, las cuales cumplen un papel clave en la descomposición de los residuos de la planta de arroz, emitiendo metano hacia la atmósfera<sup>2,14,15</sup>.

A continuación, se describe algunas especies de bacterias anaeróbicas aisladas de suelos de cultivos de arroz:

- a) *Methanoculleus chikugoensis*, bacteria Gram negativa metanogénica, anaerobia estricta, inmóvil con morfología de cocos irregulares aislada en Japón con capacidad de usar H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 2-propanol/CO<sub>2</sub>, formiato, 2-butanol/CO<sub>2</sub> y ciclopentanol/CO<sub>2</sub> como sustratos. En cuanto a sus condiciones óptimas de crecimiento, se reporta una temperatura entre 25 y 30 °C, pH entre 6,7 y 7,2 y NaCl de 0,1 M. El estudio de este tipo de microorganismos metanógenos permite comprender las emisiones de metano provenientes de campos de cultivo de arroz<sup>16</sup>.
- b) *Propionicimonas paludicola*, bacilo Gram positivo también aislado en Japón y que pese a ser considerado como anaeróbico facultativo, se ha observado que presenta un mejor crecimiento en ausencia de oxígeno. Catalasa, oxidasa y reducción de nitratos negativo, esta especie es productora de propionato, un importante intermediario en la descomposición metanogénica de materia orgánica en los suelos de arroz sometidos a condiciones anóxicas. El crecimiento de este microorganismo se desarrolla a condiciones

óptimas de 35 °C, pH 6,5 y NaCl menor del 2% p/v. Como productos de la fermentación de glucosa en presencia de cianocobalamina genera acetato, lactato, propionato, succinato y CO<sub>2</sub> y, es capaz de utilizar arabinosa, xilosa, fructuosa, galactosa, glucosa, manosa, celobiosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, glicerol y manitol como fuentes de carbono y, en menor cantidad, ribosa y lactosa. Asimismo, puede crecer en presencia de piruvato y lactato, mientras que, con malato, fumarato y succinato, su crecimiento es débil<sup>2</sup>.

- c) Especies del género *Paludibacter*, bacilos Gram negativos, metanogénicos, anaerobios estrictos no formadores de esporas e inmóviles. Catalasa, oxidasa y reducción de nitratos negativos. Los miembros de este género utilizan diversos azúcares generando acetato, propionato y succinato como productos finales de la fermentación. Dos especies mesófilas destacan en este género: *P. jiangxiensis* y *P. propionigenes*, aisladas de suelos de arroz en China y Japón respectivamente, capaces de utilizar arabinosa, xilosa, celobiosa, fructuosa, galactosa, glucosa, manosa, maltosa y almidón como sustratos de crecimiento. Al igual que con otras especies anaerobias, el estudio de este tipo de bacterias permite comprender la biotransformación de los residuos vegetales<sup>14,17</sup>.

Como se ha mencionado, en suelos de cultivo de arroz existe una mayor probabilidad de aislar bacterias anaeróbicas; pero también existen aeróbicas debido a la liberación de oxígeno a partir de las raíces de la planta del arroz y a la formación de una capa de óxido en la superficie del suelo. Algunos de estos microorganismos, contribuyen en el crecimiento del cultivo, a la vez que influyen significativamente en la fertilidad del suelo. Tal es el caso de las bacterias diazotróficas, conocidas como fijadoras de nitrógeno que juegan un rol importante en el ciclo del nitrógeno en estos terrenos al fijar hacia el suelo este elemento, el cual se encuentra presente en la atmósfera bajo su forma molecular e insoluble N<sub>2</sub>, para posteriormente ser reducida a amoníaco (NH<sub>3</sub>), producto que será utilizado por las bacterias oxidantes de amonio en un proceso denominado nitrificación, generando de este modo óxidos de nitrógeno solubles como nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), formas que serán aprovechadas por el cultivo como nutriente<sup>3,4,15</sup>.

Entre los microorganismos aeróbicos reportados en suelos de arroz que evidenciaron actividad esterasa, se encuentran:

- a) *Arenimonas taoyuanensis*, bacilo Gram negativo flagelado y móvil aislado en China. De colonias blanco-amarillentas, circulares, convexas y opacas con márgenes regulares. Oxidasa positiva, catalasa y reducción de nitratos y nitritos negativo. Su crecimiento óptimo se lleva a cabo a 28 °C, pH 7,0 y menos de 1% p/v de NaCl. Presenta actividad hidrolítica para Tween 20 y gelatina, pero no sobre almidón ni celulosa. En cuanto a sus actividades enzimáticas, es positivo para esterasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y tripsina, pero negativo para lipasa, ureasa,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucosidasa<sup>18</sup>.
- b) *Paraburkholderia azotifigens*, bacilo Gram negativo, diazotrófico, no móvil aislado en Corea del Sur. De colonias cremas, circulares, lisas y convexas. Catalasa, oxidasa y reducción de nitratos positivo con condiciones óptimas de crecimiento entre 25 y 30 °C, pH 7,0 y NaCl menor a 2% p/v. Asimismo, es positivo para producción de fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, esterasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y ureasa, pero negativo para lipasa. Sin capacidad de hidrólisis sobre almidón, celulosa, caseína ni ADN<sup>19</sup>.
- c) *Parasegetibacter terrae*, bacteria Gram negativa, no flagelada de morfología variable aislada en Corea del Sur. Presenta colonias amarillas, redondas y convexas. Catalasa y oxidasa positiva, mientras que reducción de nitratos negativa. Sus condiciones óptimas de crecimiento son entre 28 y 30 °C, pH 7,0 y NaCl menor del 2% p/v. Hidroliza ADN y caseína, pero no almidón, celulosa, Tween 80 ni gelatina. Presenta actividades enzimáticas de tripsina, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y esterasa pero no lipasa ni ureasa<sup>20</sup>.
- d) *Bacillus praedii*, Gram positivo, móvil aislado en China. Presenta colonias circulares y lisas de color ligeramente amarillo. Catalasa y reducción de nitratos positivo y oxidasa negativa. Sus condiciones óptimas de crecimiento son 30 °C, pH 9,0 y NaCl 4% p/v. En cuanto a sus actividades enzimáticas, es positivo para fosfatasa alcalina, esterasa y  $\alpha$ -glucosidasa, pero negativo

para  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa ácida, tripsina y lipasa. Asimismo, posee capacidad hidrolítica sobre gelatina<sup>21</sup>.

Otras especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Ochrobactrum*, *Lysinibacillus*, *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Herbaspirillum*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas* y *Azorhizobium* también han sido reportadas en suelos de cultivo de arroz en Corea del Sur con capacidad de fijación de nitrógeno y con potencial aplicación como inoculantes para los sembríos de arroz permitiendo una agricultura sostenible<sup>4</sup>.

El segundo grupo de microorganismos aislados de cultivos de arroz son las bacterias endofíticas. Estas bacterias son ubicuas en la mayoría de las especies vegetales y se encuentran tanto en la superficie de los tejidos como dentro de ellas debido a su capacidad de invadir tejidos internos como los vasos del xilema permitiendo su diseminación sistémica. Algunas ejercen efectos beneficiosos como la estimulación del crecimiento, la fijación de nitrógeno y la inducción de resistencia a patógenos. Su diversidad y cantidad poblacional se ve influenciada en parte por la sección de la planta a estudiar, encontrándose generalmente las mayores poblaciones bacterianas en las raíces<sup>22-24</sup>. En la planta del arroz, se ha aislado comúnmente *Pantoea* a partir de las semillas, *Methylobacterium* de los brotes, *Azospirillum* y *Herbaspirillum* de tallos y raíces, y *Burkholderia* y *Rhizobium* de raíces<sup>24</sup>.

Algunas bacterias endofíticas pueden ser de tipo diazotróficas permitiendo un cultivo más sostenible y menos dependiente de fertilizantes químicos. A continuación, se menciona algunos estudios:

- a) Prakamhang y col (2009)<sup>22</sup> aislaron bacterias diazotróficas endofíticas en raíces, tallos y hojas de plantas de arroz desarrolladas en diferentes condiciones de suelos en Tailandia y evaluaron su capacidad de fijación de N<sub>2</sub> tanto en consorcio como individualmente evidenciando que la población bacteriana se ve afectado por el tipo de suelo, la etapa de crecimiento y la parte del arroz. Algunas de ellas se encontraron estrechamente relacionadas con *Enterobacter dissolvens*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas* sp.

- b) Ji y col (2013)<sup>3</sup> aislaron bacterias endofíticas de hojas, tallos y raíces de plantas de arroz en Corea del Sur, identificando a 12 de ellas como diazotróficas pertenecientes a los géneros *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Bacillus* y *Klebsiella*. Asimismo, observaron que las semillas de arroz tratadas con estas bacterias diazotróficas mostraban un mejor crecimiento, mayor altura y peso seco además de poseer efectos antagónicos contra fitopatógenos fúngicos, demostrando así el potencial de estos inóculos como alternativas a los fertilizantes químicos y pesticidas.

Por otro lado, estas bacterias endofíticas aisladas de los tejidos vegetales de arroz también pueden ser productoras de hidrolasas con potencial aplicación biotecnológica. Así, Elbeltagy y col (2000)<sup>23</sup> aislaron bacterias endofíticas en tallos, semillas y hojas de variedades silvestres y cultivadas de arroz en Japón, la mayoría pertenecen a los géneros *Methylobacterium* y *Curtobacterium*, observando que gran parte de estos aislados producían pectinasas y celulasas, enzimas que desempeñarían un rol en los mecanismos de ingreso intracelular y diseminación dado que las paredes celulares de esta especie vegetal están constituidas principalmente por celulosa y pectina.

#### **4.2. Bacterias productoras de esterasas**

Las bacterias son consideradas como fuente superior de esterasas en comparación con otros seres vivos. Poseen la capacidad de producir estas enzimas ya sea de forma inducible o constitutivamente y, debido a la facilidad con la cual pueden ser cultivadas y manipuladas genéticamente, son de gran interés en el campo biotecnológico. Estos microorganismos se distribuyen en todo tipo de ambiente, desde hábitats con un rango de temperatura moderada hasta aquellas consideradas como extremas, dando la posibilidad de identificar esterasas con diversas características bioquímicas y fisicoquímicas<sup>25-27</sup>.

Se sabe que una gran parte de esterasas que actualmente son usadas a nivel industrial son obtenidas de bacterias mesófilas. Sin embargo, la mayoría de las reacciones de esterificación tienen lugar bajo condiciones fisicoquímicas extremas como altas temperaturas y baja actividad de agua (en presencia de solventes orgánicos) por lo que la búsqueda de nuevas esterasas más robustas y con mejores

propiedades para aplicación industrial continúa siendo una tarea urgente con considerable atención. Por tanto, aquellas esterasas cuyas fuentes se encuentran adaptadas a ambientes extremos generan bastante atención dado que tendrían un buen desempeño bajo condiciones fisicoquímicas extremas que son necesarias para aplicaciones industriales<sup>25,28</sup>.

Las bacterias productoras de esterasas han sido aisladas de diversos ambientes y su capacidad de producción es determinada mediante la presencia de halos claros en las zonas próximas a las colonias en placas de agar suplementado con tributirina, sustancia resultante de la esterificación de glicerol y ácido butírico; mientras que, la actividad y especificidad de las esterasas microbianas obtenidas es determinada a través de la hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenol y cuantificado mediante espectrofotometría<sup>26,29</sup>. Sin embargo, se ha estimado que los microorganismos cultivables representan menos del 1% de la microbiota por lo que existen microorganismos que no pueden ser cultivados ni caracterizados en laboratorio por los métodos microbiológicos y bioquímicos tradicionales pero que representarían una enorme reserva de estas enzimas con potencial aplicación biotecnológica e industrial<sup>30,31</sup>.

En la tabla 1 se expone algunas de las bacterias identificadas como productoras de esterasas y su respectiva fuente de aislamiento. Resulta importante destacar que estos microorganismos se distribuyen en diversos ambientes pudiendo ser mesófilos o extremófilos, determinando, en la mayoría de los casos, las características bioquímicas de la esterasa producida.

**Tabla 1.** Especies bacterianas productoras de esterazas y su fuente de aislamiento.

<b>Especie bacteriana</b>	<b>Fuente</b>	<b>Referencia</b>
<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	Aguas termales	32
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Sedimentos marinos	33
<i>Roseateles depolymerans</i>	Muestras de agua	34
<i>Alicyclobacillus tengchongensis</i>	Aguas termales	11
<i>Halobacillus</i> sp.	Suelos salinos	35
<i>Bacillus subtilis</i>	Aguas termales	36
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Aguas termales marinas	37,38
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Aguas termales volcánicas ricas en azufre	39
<i>Streptomyces scabies</i>	Suelos de cultivos de tubérculos	40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteria ambiental ubicua	41
<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	Hielo marino	42
<i>Alkalibacterium</i> sp.	Sedimentos de lagos alcalinos	43
<i>Streptomyces lividans</i>	Suelos	25
<i>Pseudomonas putida</i>	Suelos	44
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	Permafrost	45
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	Aguas termales	46
<i>Thermotoga maritima</i>	Sedimento marino	47

### 4.3. Esterasas

Las esterazas (o carboxilesterasas) son un grupo de enzimas hidrolasas ubicuas distribuidas en animales, plantas y microorganismos. Clasificadas según el sistema *Enzyme Commission* como 3.1.1.1 (tabla 2), catalizan la ruptura y formación de enlaces éster de acilgliceroles de cadena corta, las cuales son definidas, generalmente, como aquellos acilgliceroles (ya sea mono, di o triacilgliceroles) que poseen una longitud de cadena menor a diez átomos de carbono<sup>25,32,48</sup>.

**Tabla 2.** Clasificación de las esterazas según el sistema de *Enzyme Commission*<sup>49</sup>

3. - . - . -	Hidrolasas
3.1. - . -	Hidrolasas que actúan sobre enlaces éster
3.1.1. -	Hidrolasas de ésteres carboxílicos
3.1.1.1	Carboxilesterasas

Son consideradas enzimas lipolíticas al igual que las lipasas (triacilglicerol lipasas E.C. 3.1.1.3) quienes, a diferencia de las esterazas, poseen como sustrato a los acilgliceroles de cadena larga (mayor o igual a diez átomos de carbono)<sup>32,48</sup>.

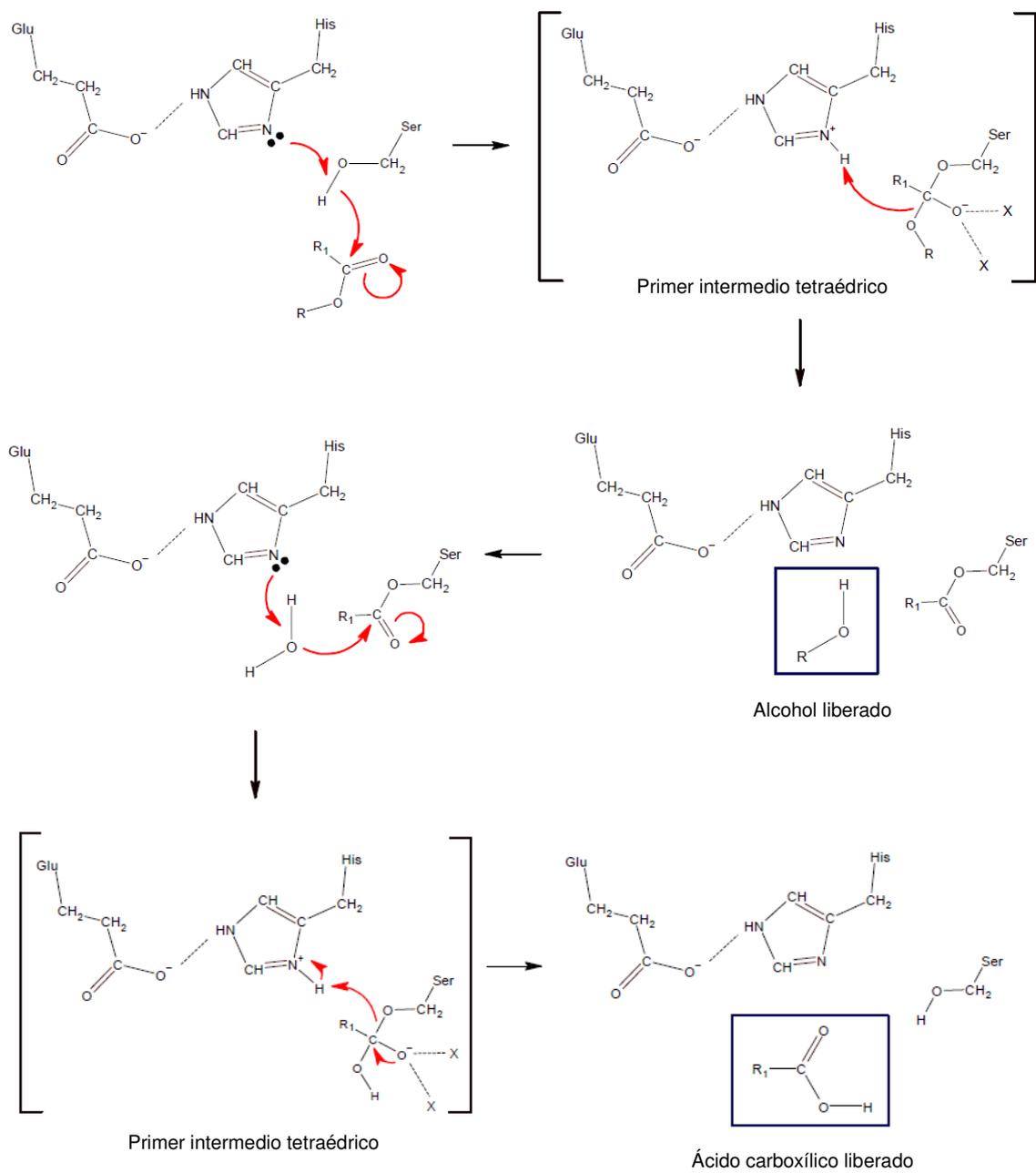
#### 4.3.1. Mecanismo de acción de las esterazas

Las esterazas catalizan diferentes tipos de reacciones. La principal reacción catalizada por estas enzimas es el clivaje del enlace éster existente entre un ácido carboxílico y un alcohol en medio acuoso. No obstante, en medios no acuosos o solventes orgánicos, esta reacción de hidrólisis se puede revertir liberando agua o dando lugar a reacciones de transesterificación e interesterificación<sup>46,50,51</sup>.

El mecanismo de hidrólisis representado en la figura 1 se resume en la formación y degradación de un intermedio acil-enzima. La hidrólisis se produce inicialmente a través de un primer ataque nucleofílico generado por el grupo hidroxilo de la serina sobre el carbono del grupo carbonilo del enlace éster. Esta reacción ocurre debido a que la histidina, quien actúa como base, toma el protón del grupo hidroxilo de la serina. Esta histidina protonada se estabiliza mediante puente de hidrógeno con el ácido glutámico (o ácido aspártico). Estos dos aminoácidos catalíticos, His-Glu (Asp), a menudo se denominan sistema de relevos de carga (*charge relay*) porque

trabajan juntos para activar la serina. El ataque nucleofílico inicial produce el primero de dos intermedios tetraédricos que se estabilizan por puentes de hidrógeno con los átomos de nitrógeno del grupo amida de dos aminoácidos que se encuentran cercanos al sitio activo formándose lo que se conoce como el centro oxianiónico (*oxyanion hole*). Este intermedio tetraédrico es rápidamente desestabilizado por la histidina protonada, que actúa como un ácido, para producir un complejo acil-enzima mientras se libera el componente alcohólico del éster. Luego, ocurre un segundo ataque nucleofílico donde una molécula de agua activada por histidina actúa sobre el complejo acil-enzima generando el segundo intermedio tetraédrico y que, tras un rápido reacomodo de este intermedio, la enzima se regenera y el componente ácido se libera<sup>52-55</sup>.

Para las reacciones de transesterificación e interesterificación el mecanismo de reacción es similar con la diferencia de que el segundo ataque nucleofílico está dado por un alcohol o un éster respectivamente, los cuales también son activados por la histidina<sup>29,31</sup>.



**Figura 1.** Mecanismo de reacción de hidrólisis catalizada por esterasa

### 4.3.2. Diferencia entre esterasas y lipasas

Si bien es cierto, los términos “esterasa” y “carboxilesterasa” connotan actividad hidrolítica sobre enlaces de tipo ésteres producto de la reacción entre un ácido carboxílico y un alcohol, sería válido considerar a las lipasas como un tipo de esterasas dado que estas también actúan sobre enlaces tipo éster, por lo que se dificultaría la discriminación entre ambas enzimas. Esto ha sido motivo de que algunos autores propongan una nueva clasificación de las enzimas lipolíticas. De este modo, basado en el hecho de que los lípidos son compuestos biológicos que por definición son insolubles en agua, algunos autores prefieren denominar a las lipasas como esterasas lipolíticas<sup>52,56</sup>. No obstante, lipasas y esterasas poseen diferentes propiedades fisicoquímicas y bioquímicas resumidas en la tabla 3.

**Tabla 3.** Diferencias entre esterasas y lipasas<sup>29,55</sup>.

Propiedad	Esterasas	Lipasas
	(carboxilesterasas) E.C. 3.1.1.1	(triacilglicerol lipasas) E.C. 3.1.1.3
Sustrato	Acilgliceroles de cadena corta. Estándar: tributirina	Acilgliceroles de cadena larga. Estándar: trioleína
Hidrofobicidad de sustrato	Baja	Alta
Activación interfacial / Presencia de estructura “lid”	No	En su mayoría
Cinética	Obedecen la cinética de Michaelis – Menten	No obedecen la cinética de Michaelis – Menten.
Estabilidad en solventes	Alto a bajo	Alto

### 4.3.3. Aplicación de las esterasas

Las esterasas son utilizadas como biocatalizadores en diversos procesos industriales debido a la versatilidad de sus características como el amplio rango de sustrato, la alta estereoespecificidad, actividad independiente de cofactores, tolerancia a solventes orgánicos, entre otras. Esto les permite resistir las exigentes condiciones de bioconversión industrial<sup>31,57</sup>.

#### A. Síntesis de compuestos ópticamente puros

La mayoría de los productos químicos se comercializan bajo la forma de mezclas racémicas y, en muchos casos, solo uno de los isómeros ópticos posee la actividad deseada, mientras que, la otra forma, puede ser inactiva o tener un efecto contrario a lo buscado<sup>55</sup>. Es así que, la alta regio- y estereoespecificidad que presentan las esterasas ha permitido que estas enzimas sean de utilidad en los procesos de síntesis orgánica dado que participan en la cinética de resolución de mezclas racémicas y en la producción de enantiómeros puros de alcoholes y ácidos carboxílicos<sup>29-31</sup>. Entre los ejemplos de esta aplicación destaca la carboxilesterasa NP (NP de naproxeno) de *Bacillus subtilis* utilizada en la industria farmacéutica. Esta enzima actúa sobre (R,S)-naproxeno metiléster permitiendo que la reacción se oriente hacia la obtención de (S)-naproxeno con una alta pureza óptica a la vez que se produce la resolución de la mezcla racémica<sup>29,58</sup>. De igual forma, se han reportado esterasas de *Pseudomonas fluorescens* y *Geobacillus stearothermophilus* con actividad sobre (R,S)-ketoprofeno metiléster<sup>55</sup>.

#### B. Biodegradación de pesticidas

Las esterasas son utilizadas en la biorremediación debido a su capacidad de biodegradar aquellos pesticidas que poseen enlaces tipo éster en su estructura como organofosforados, carbamatos y piretroides permitiendo la desintoxicación de aquellos ambientes contaminados con estos residuos. Así, las esterasas de *Alicyclobacillus tengchongensis*, *Brevibacillus* sp. y *Bacillus cereus* son capaces de degradar malatión, un pesticida organofosforado perjudicial a nivel del sistema nervioso en los

humanos. Asimismo, entre los microorganismos degradadores de piretroides destacan *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio hollisae*, *Burkholderia picketti* y *Erwinia carotovora* aisladas de suelos y ríos<sup>10,11,59</sup>. Este proceso de biorremediación basada en la ruptura de los contaminantes gracias a las esterasas microbianas es considerado un método seguro, menos dañino, limpio y económico<sup>26,59</sup>.

### **C. Industria alimentaria**

La reacción de hidrólisis catalizada por esterasas es aprovechada en la fabricación de quesos y derivados lácteos. Estas enzimas mejoran las propiedades organolépticas en la industria láctea. Por ejemplo, las esterasas de *Propionibacterium freudenreichii* y *Lactobacillus casei*, intervienen en el proceso de maduración de los quesos<sup>26,60,61</sup>. La actividad hidrolítica también es aprovechada para la liberación de compuestos acumulados como ésteres y que son necesarios como aditivos alimentarios<sup>55</sup>.

### **D. Despolimerización de plástico**

Las esterasas microbianas pueden hidrolizar varios poliésteres de manera efectiva por lo que tienen un rol importante en la despolimerización del plástico disminuyendo su impacto en la contaminación ambiental. De este modo, se han reportados esterasas de *Roseateles depolymerans* y de los géneros *Comamonas*, *Pseudomonas* y *Bacillus* capaces de realizar esta degradación<sup>26,34,62,63</sup>.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1. Aislamiento y selección de bacterias productoras de esterazas

#### 5.1.1. Recolección de la muestra

Muestras de suelos de cultivos de arroz ubicados en los márgenes de la carretera Fernando Belaunde Terry en el distrito de Rioja, provincia de Rioja, departamento de San Martín en enero del 2019 fueron recolectadas en el periodo postcosecha previo al arado de la tierra, con lo cual se inicia el nuevo cultivo (Figura 2). Las muestras fueron recolectadas bajo condiciones de esterilidad y transportadas en frío en una caja térmica al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su posterior estudio y análisis.



**Figura 2.** Terreno de cultivo de arroz en periodo de postcosecha en el distrito de Rioja, provincia de Rioja, San Martín

### **5.1.2. Aislamiento de bacterias**

A un matraz conteniendo 90 mL de caldo tripticasa de soya (TSB) se añadió aproximadamente 10 g de suelo, después se homogenizó e incubó a 30 °C por 48 h. En seguida, en tubos de ensayo se realizaron diluciones sucesivas de 1 mL del pre-enriquecimiento con 9 mL de buffer fosfato salino (PBS) estéril. Este procedimiento se realizó hasta obtener la dilución de  $10^{-8}$ . De las tres últimas diluciones, se tomaron 100  $\mu$ L de cada muestra y esparcieron con el asa de Drigalsky sobre placas de agar tripticasa de soya (TSA) por duplicado (método de extensión en placa). Después, se procedió a incubar las placas a 37 °C por 24 h. Luego de ello, se seleccionaron las colonias con características morfológicas diferentes tanto en forma, color, tamaño y consistencia. Asimismo, a colonias de cultivos frescos de menos de 18 h de incubación a 37 °C se les realizó la tinción Gram y se observó al microscopio a un aumento de 100X utilizando aceite de inmersión. Cada colonia fue sometida a tres pasajes sucesivos placa a placa en TSA a 37 °C por 24 h con el objetivo de obtener cultivos puros. Del último pasaje, una colonia se sembró en TSB a 37 °C por 12 h. Finalmente, a un microtubo se añadió el cultivo con glicerol hasta 20% v/v y conservó a -20 °C.

### **5.1.3. Selección de bacterias productoras de esterazas**

La producción de esterazas por los aislados bacterianos se determinó utilizando la tributirina como sustrato estándar. Para ello, se obtuvieron cultivos jóvenes de cada cepa mediante la reactivación de los aislados en caldo TSB a una proporción de 1/100. Posterior a ello, se siguió la metodología descrita por Mourey y Kilbertus (1976) con algunas modificaciones<sup>64</sup>. Las bacterias se sembraron en agar Luria-Bertani (LB) pH 7,0 suplementado con tributirina al 1% y fueron incubadas a 37 °C por 48 h. La presencia de halos traslúcidos alrededor de las colonias fue reportada como positivos para la producción de esterazas y se procedió con la medición del diámetro del halo con la finalidad de determinar la cepa con mayor producción de esterazas. Los experimentos se realizaron por duplicado.

## **5.2. Caracterización fenotípica**

### **5.2.1. Pruebas fisiológicas**

#### **A. Prueba de concentración de sales**

A caldos de TSB se les suplementó NaCl 0,5; 5,0; 10,0; 15,0 y 20,0% p/v e incubó a 37 °C durante 24 h. El incremento de biomasa (turbidez) fue determinado por espectrofotómetro a 600 nm. Esta prueba se realizó por duplicado.

#### **B. Prueba de temperatura**

Los aislados fueron incubados en caldos TSB a 4, 20, 37 y 45 °C durante 24 h. El incremento de biomasa (turbidez) fue determinado por espectrofotómetro a 600 nm. Esta prueba se realizó por duplicado.

#### **C. Prueba de pH**

Los aislados fueron incubados en caldos TSB a 37 °C a pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 durante 24 h. El pH de los caldos fue ajustado con HCl 1M o NaOH 1M, el incremento de biomasa (turbidez) fue determinado por espectrofotómetro a 600 nm. Esta prueba se realizó por duplicado.

### **5.2.2. Pruebas bioquímicas**

#### **A. Prueba de catalasa**

En una gota de peróxido de hidrógeno al 3% v/v se resuspendió una colonia de cada aislado. La prueba se realizó por duplicado y la producción de burbujas fue reportado como positivo para la producción de catalasa<sup>21</sup>.

#### **B. Prueba en agar *Triple Sugar Iron (TSI)***

El uso del agar TSI determinó la fermentación de los hidratos de carbono glucosa, lactosa y sacarosa; la producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y gas como resultado de la fermentación de los sustratos por las bacterias aisladas. La preparación del agar, así como el proceso de siembra e

incubación se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. La interpretación de resultados se realizó de la siguiente manera: (a) pico rojo y fondo amarillo (alcalino / ácido), la bacteria solo fermenta glucosa; (b) pico amarillo y fondo amarillo (ácido / ácido), la bacteria fermenta glucosa, sacarosa y/o lactosa; (c) pico rojo y fondo rojo (alcalino / alcalino), la bacteria no fermenta ninguno de los tres azúcares; (d) oscurecimiento del medio, la bacteria produce H<sub>2</sub>S y (e) presencia de burbujas o ruptura del agar, la bacteria produce gas como resultado de la fermentación.

### **C. Prueba en medio *Sulfide Indole Motility (SIM)***

En el medio semisólido SIM se evaluó la motilidad, la producción de indol y H<sub>2</sub>S de cada una de las bacterias aisladas. La preparación del agar, así como el proceso de siembra e incubación se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. La interpretación de resultados se realizó de la siguiente manera: (a) crecimiento más allá de la línea de siembra, positivo para motilidad; (b) oscurecimiento del medio, la bacteria produce H<sub>2</sub>S y (c) generación de un anillo color rojo al agregar 3 gotas de reactivo de Kovacs, positivo para producción de indol.

### **D. Prueba de metabolismo de citrato**

En agar citrato de Simmons se determinó si cada una de las bacterias aisladas eran capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono. La preparación del agar, así como el proceso de siembra e incubación se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. La generación de un color azul intenso en el pico del tubo fue reportada como positivo.

## **5.2.3. Hidrólisis de macromoléculas**

### **A. Aceite de oliva**

Se utilizó el medio agar LB-rodamina cuya composición fue de agar LB, aceite de oliva al 2,5% y 0,1 mg/L de rodamina B. Se sembró una colonia de cada bacteria aislada y se incubó a 37 °C por 48 h. La presencia de una

coloración rosa brillante sobre luz UV a 350 nm fue reportado como positivo para la hidrólisis de aceite de oliva<sup>65</sup>.

## **B. Almidón**

Se utilizó un medio conteniendo almidón al 2%, peptona al 0,05% y sales. Se sembró una colonia de cada bacteria aislada y se incubó a 37 °C por 48 h. Posterior a ello se procedió con el revelado mediante la incorporación de reactivo de lugol a cada placa. La presencia de halos claros alrededor de la colonia fue reportada como positivo para la hidrólisis de almidón debido a la producción de amilasas<sup>66</sup>.

## **C. Proteínas**

La capacidad de hidrolizar las proteínas se determinó utilizando tres sustratos: *Skim milk*, caseína y gelatina. Estos medios fueron preparados de acuerdo con la metodología descrita en el *Handbook of Microbiological Media*<sup>67</sup>. Para todos los casos se sembró una colonia de cada bacteria aislada y se incubó a 37 °C por 48 h.

### **a) *Skim Milk***

Este medio de cultivo contenía *Skim milk* 8 g/L y agar 15 g/L. La formación de halos claros alrededor de la colonia fue reportada como positivo para la hidrólisis de proteínas debido a la producción de proteasas.

### **b) Caseína**

Este medio de cultivo contenía caseína 10 g/L, extracto de levadura 2 g/L y agar 15 g/L. La formación de halos claros alrededor de la colonia fue reportada como positivo para la hidrólisis de proteínas debido a la producción de proteasas.

### **c) Gelatina**

Este medio de cultivo contenía gelatina porcina 15 g/L, peptona 4 g/L, extracto de levadura 1 g/L y agar 15 g/L. Pasado el tiempo de

incubación, se procedió con el revelado, para lo cual se agregó ácido tricloroacético (ATC) al 10% v/v a cada placa. La formación de halos claros alrededor de la colonia fue reportada como positivo para la hidrólisis de proteínas debido a la producción de proteasas.

#### **D. ADN**

Se procedió con la preparación del agar ADN según las especificaciones del fabricante. Se sembró una colonia de cada bacteria aislada y se incubó a 37 °C por 48 h. Posterior a ello, se procedió con el revelado mediante la incorporación de HCl 0,1 N a cada placa. La presencia de halos claros alrededor de la colonia fue reportada como positivo para la hidrólisis de ADN.

#### **E. Celulosa**

Se utilizó el medio constituido por carboximetilcelulosa 0,3%, extracto de levadura 0,1%, sales, micronutrientes y agar 2,0%. Se sembró una colonia de cada bacteria aislada y se incubó a 37 °C por 48 h para luego proceder con el revelado mediante la incorporación de una solución de indicador rojo de Congo 0,1% p/v a cada placa. La presencia de halos claros alrededor de la colonia fue reportada como positivo para la hidrólisis de celulosa debido a la producción de celulasas<sup>23</sup>.

#### **F. Pectina**

Se utilizó el medio conformado por pectina de manzana 0,5%, extracto de levadura 0,15%, sales, micronutrientes y agar 2,0%. Se sembró una colonia de cada bacteria aislada y se incubó a 37 °C por 48 h. Posteriormente, se realizó el revelado mediante la incorporación de una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 2% a cada placa. La formación de halos claros alrededor de la colonia fue reportada como positivo para la hidrólisis de pectina debido a la producción de pectinasas<sup>23</sup>.

#### **G. Lactosa**

La hidrólisis de lactosa es llevada a cabo por la  $\beta$ -galactosidasa, la cual se produce por la presencia de este azúcar. La actividad enzimática se

determinó según Smale (2010) con algunas modificaciones<sup>68</sup>. Las cepas se sembraron en caldo lactosado a 37 °C por 24 h. En seguida, la biomasa se concentró mediante centrifugación, lavada dos veces con NaCl 0,85%; luego, las células se lisaron por sonicación por 5 min (1 s de sonificado y 5 s de enfriado) a una amplitud del 30% con el propósito de liberar la enzima. Después, el homogenizado se centrifugó y trabajó con el sobrenadante (extracto crudo), al cual se adicionó el reactivo de orto-nitrofenil- $\beta$ -galactósido (sustrato análogo de la lactosa) e incubó a 37 °C por 2 h. La formación de un complejo amarillo fue reportada como positivo.

#### **5.2.4. Pruebas nutricionales**

Para la prueba nutricional de metabolismo de azúcares se utilizó el caldo base de rojo de fenol suplementado con azúcares específicos según lo descrito en el *Handbook of Microbiological Media*<sup>67</sup>. El medio de cultivo estaba constituido por peptona de caseína 10 g/L, NaCl 5 g/L, azúcar 10 g/L y rojo de fenol 18 mg/L. Los azúcares utilizados fueron arabinosa, celobiosa, fructuosa, galactosa, glicerol, glucosa, maltosa, manitol, manosa, sacarosa, sorbitol y xilosa. Se procedió con la inoculación por duplicado de cada aislado bacteriano y se incubó a 37 °C. Las lecturas se realizaron a las 24 h. El viraje del medio de cultivo a amarillo fue reportado como positivo para el metabolismo del azúcar. Asimismo, se determinó la producción de gas mediante la formación de burbujas en el tubo invertido de Durham.

#### **5.2.5. Sensibilidad antimicrobiana**

Para la prueba de sensibilidad a antimicrobianos, se utilizó la prueba de difusión en disco descrita por Bauer y col (1966) con algunas modificaciones<sup>69</sup>. Se preparó una suspensión bacteriana en solución salina al 0,85% p/v y a una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland. Posterior a ello, se sumergió un hisopo estéril dentro de la suspensión para proceder con el sembrado en superficie sobre placas de Agar Mueller-Hinton. Seguidamente, se colocaron los discos con los agentes antimicrobianos presionando firmemente cada uno de ellos para asegurar el contacto con la superficie del agar. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Los antimicrobianos utilizados fueron: ampicilina 10  $\mu$ g, cefoxitina 30  $\mu$ g, clindamicina 2

µg, cloranfenicol 30 µg, eritromicina 15 µg, estreptomicina 10 µg, gentamicina 10 µg, kanamicina 10 µg, novobiocina 5 µg, penicilina G 10U, tobramicina 10 µg y vancomicina 30 µg. Pasado el tiempo se procedió a medir los halos de inhibición generados. Los resultados fueron reportados como sensible (S) o resistente (R).

### **5.3. Caracterización genotípica**

#### **5.3.1. Extracción de ADN genómico**

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo utilizando el método descrito por Chávez (2010)<sup>70</sup>; en tres etapas: lisis, purificación y precipitación.

Para la etapa de lisis, se centrifugaron 2 mL de cultivo fresco de 18 h a 10000 rpm por 10 min. El precipitado celular fue lavado dos veces con 1 mL de solución PBS 1X para posteriormente ser centrifugado a 10000 rpm por 5 min. En seguida, se agregaron 600 µL de TSE 1X, 60 µL de SDS al 10% y 10 µL de proteinasa K y se llevó a incubación por 56 °C por 2 h homogenizando con vórtex cada 30 min.

En la etapa de purificación, se agregaron 600 µL de mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1, se homogenizó por inversión y se llevó a centrifugar a 10000 rpm por 5 min. Posterior a ello, se separó el sobrenadante y se añadió 600 µL de cloroformo. Se homogenizó y centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Finalmente, la fase acuosa que contenía el ADN fue separada.

Para la etapa de precipitación, se añadió a la fase acuosa 100 µL de acetato de sodio 3 M y 600 µL de etanol absoluto refrigerado y se dejó en reposo a -20 °C por 2 h para luego ser centrifugada a 10000 rpm por 15 min. Después, el precipitado fue lavado dos veces con 500 µL de etanol al 70% refrigerado y centrifugado a 10000 rpm por 10 min. Se secó a 37 °C durante 5 min y el ADN fue disuelto en 50 µL de tampón TE a 37 °C.

Finalmente, la extracción y pureza del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con tampón TAE 1X. El gel que contenía el ADN se tiñó con bromuro de etidio y se observó en transiluminador UV.

#### **5.3.2. Amplificación de los genes ribosómicos 16S**

Este proceso se realizó mediante el uso de cebadores universales para bacterias siguiendo la metodología descrita por Canales y col (2014)<sup>71</sup>. La reacción para PCR

tuvo un volumen final de 25  $\mu$ L. Esta mezcla contenía KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, tritón X-100 0,1% v/v, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 20 pmol de cada cebador, *Taq* ADN polimerasa 1,5 U y 50 ng de ADN.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador modelo SimpliAmp™ (*Applied Biosystems*™, USA) en donde se llevó a cabo una desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de las siguientes etapas: desnaturalización, 94 °C por 45 s; hibridación, 55 °C por 1 min y extensión, 72 °C por 45 s. Se finalizó con una extensión de 72 °C por 7 min.

La extracción y pureza de los amplificados fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con tampón TAE 1X. El gel que contenía los amplificados se tiñó con bromuro de etidio y se observó en transiluminador UV<sup>70</sup>.

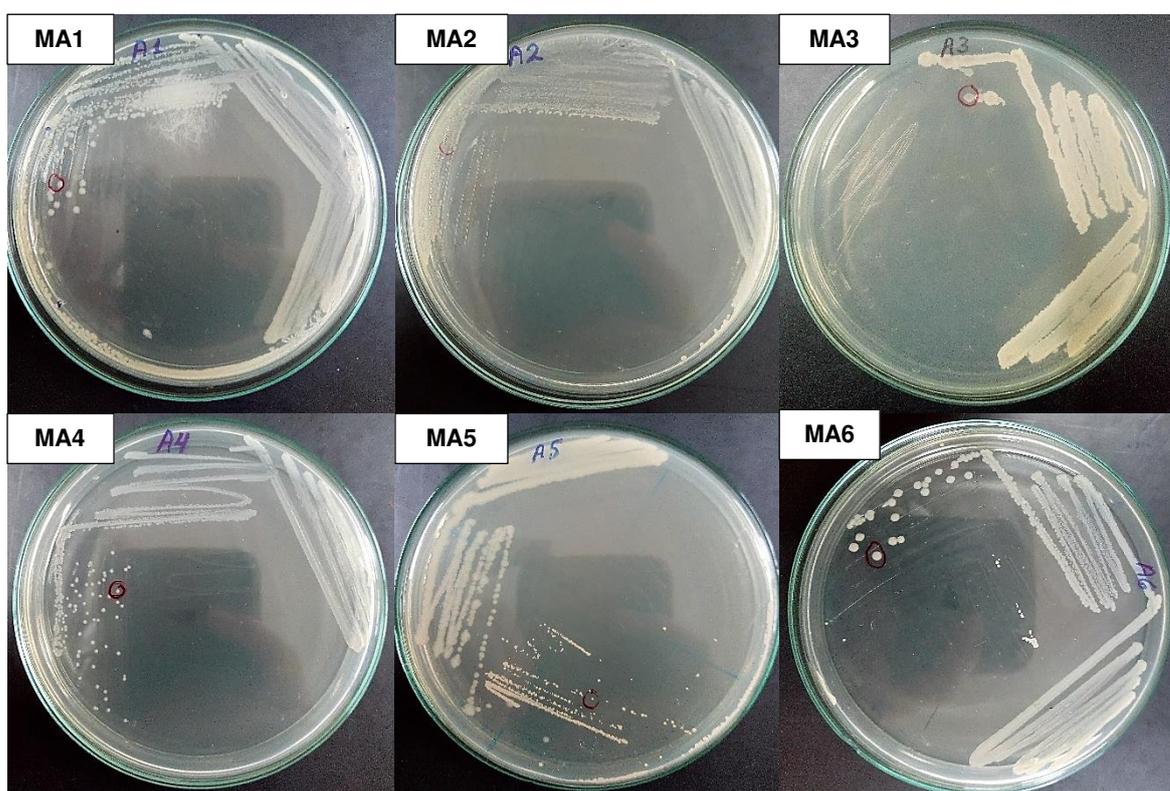
### **5.3.3. Secuenciación de los genes ribosómicos 16S**

La secuenciación fue realizada por electroforesis capilar por la empresa GenScript (USA). Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas y comparadas con aquellas que se encuentran depositadas en el *GenBank* del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando el algoritmo bioinformático BLASTn.

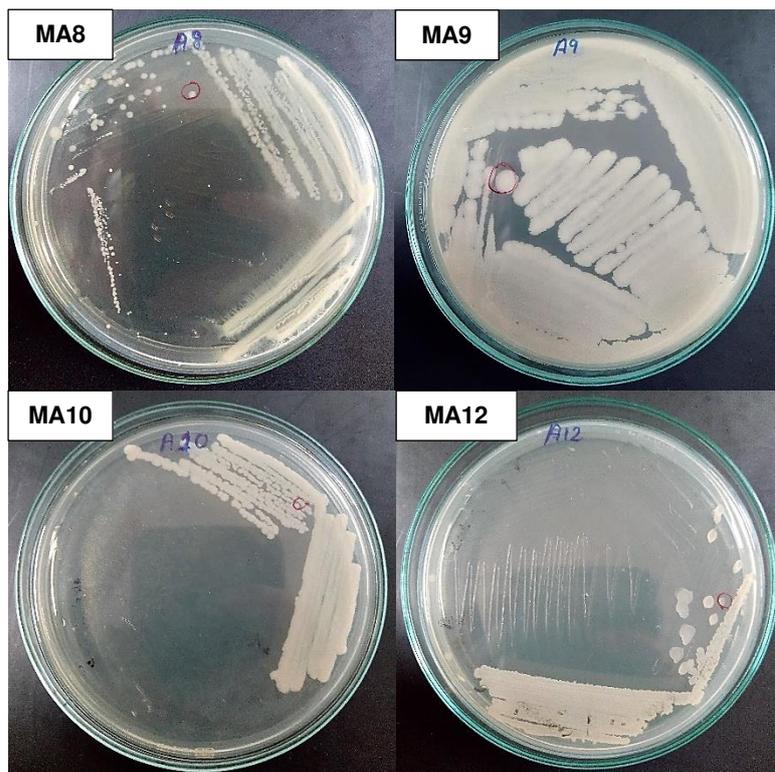
## VI. RESULTADOS

### 6.1. Aislamiento de bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja

A partir de muestras de suelos de cultivos de arroz de Rioja se aislaron 10 bacterias productoras de esterasas en agar LB conteniendo tributirina. Las colonias presentaron características diferentes en forma, tamaño y consistencia (Figura 3). Estas bacterias fueron designadas como MA1, MA2, MA3, MA4, MA5, MA6, MA8, MA9, MA10, MA12 y se criopreservaron en medio de cultivo TSB suplementado con glicerol al 20% v/v a -20 °C.



**Figura 3.** Bacterias aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja en agar TSA (Primera parte).

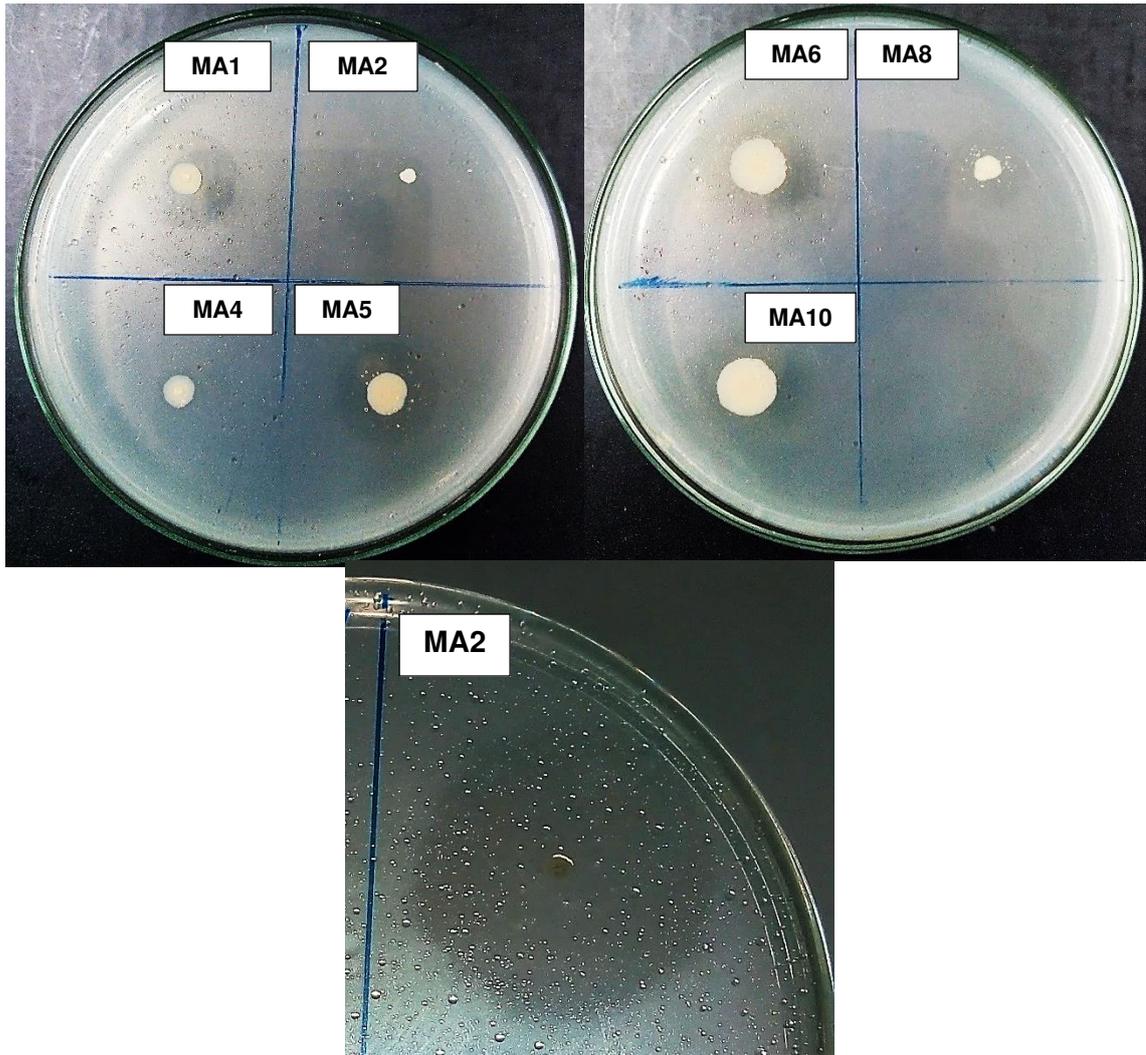


**Figura 3.** Bacterias aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja en agar TSA (Segunda parte).

### **6.2. Selección de las bacterias productoras de esterases aisladas de suelos de cultivos de arroz en Rioja**

De las 10 bacterias, los aislados MA9 y MA12 presentaron halos de hidrólisis mayor a 5 cm, y MA2 y MA3 exhibieron halos entre 2 y 4 cm. Por otro lado, los aislados MA1, MA5, MA6, MA8 y MA10 evidenciaron halos menores de 2 cm, mientras que MA4 mostró halo menor a 1 cm (Figura 4 y Tabla 4).

Asimismo, se determinó el radio de hidrólisis de cada aislado bacteriano definida como la relación entre el halo de hidrólisis y el tamaño de la colonia. El aislado bacteriano MA2 presentó el mayor radio con un valor de 10,25; los aislados MA1, MA5 y MA8 evidenciaron un radio entre 2,00 y 3,00; mientras que los aislados MA3, MA4, MA6, MA9, MA10 y MA12 exhibieron un radio menor a 2,00 (Tabla 4).



**Figura 4.** Halos de hidrólisis en agar tributirina de bacterias aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja

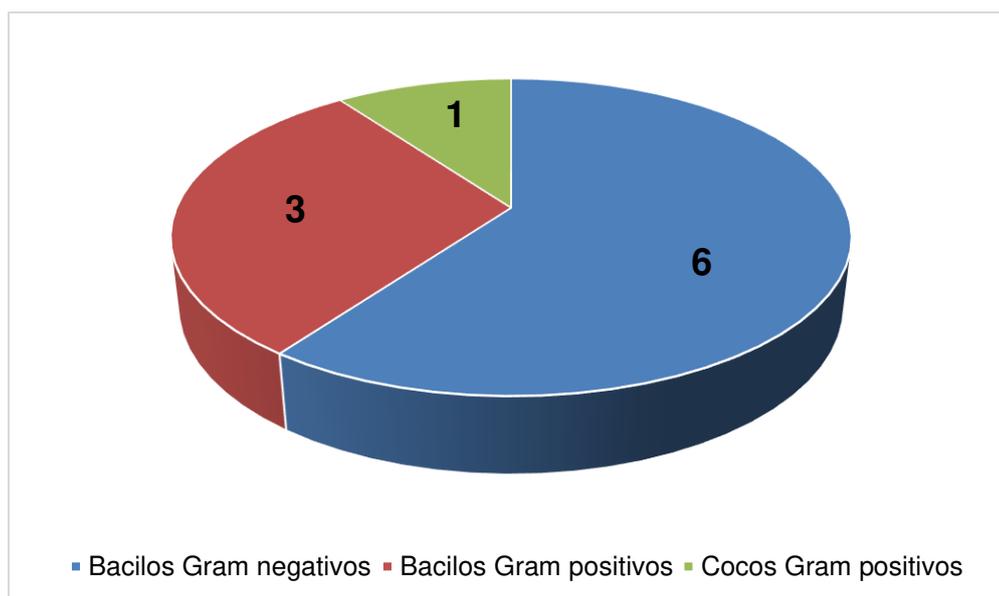
**Tabla 4.** Halos y radio de hidrólisis de las cepas productoras de esterasas de suelos de cultivos de arroz de Rioja a las 48 h de incubación en placas de agar tributirina.

<b>Cepa</b>	<b>Tamaño de halo de hidrólisis (mm)</b>	<b>Radio de hidrólisis</b>
MA1	12,0	3,00
MA2	21,5	10,75
MA3	37,5	1,42
MA4	6,0	1,20
MA5	13,5	2,70
MA6	14,0	1,87
MA8	14,0	2,15
MA9	63,0	1,43
MA10	14,0	1,75
MA12	53,0	1,39

### **6.3. Caracterización fenotípica de las bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja.**

#### **6.3.1. Caracterización microscópica y macroscópica.**

De los 10 aislados bacterianos productores de esterasas, seis fueron bacilos Gram negativos, tres bacilos Gram positivos y un coco Gram positivo (Figura 5). La caracterización macroscópica de los aislados se describe en la tabla 7.

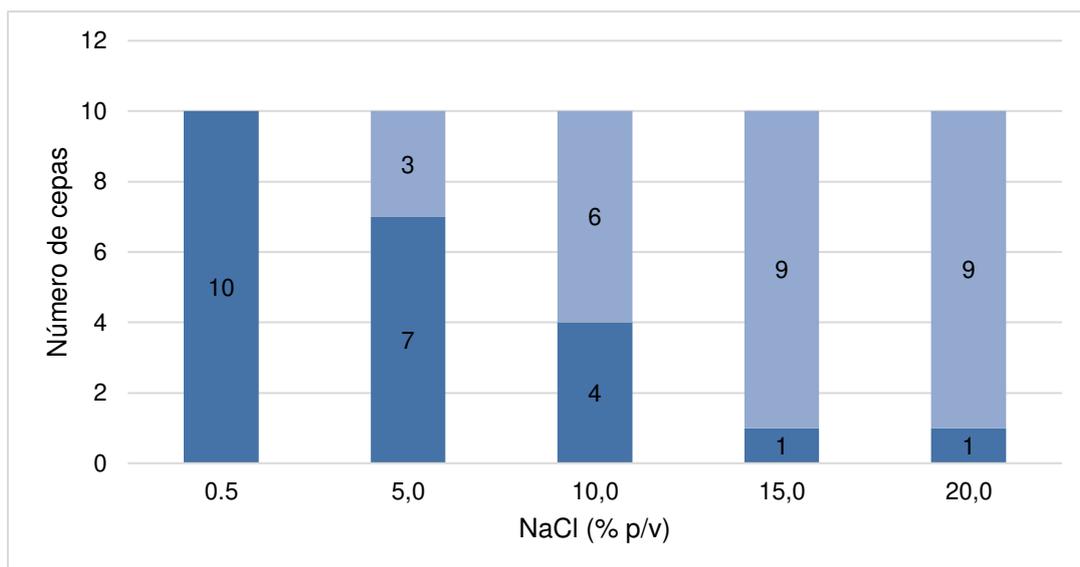


**Figura 5.** Distribución de las bacterias productoras de estererasas aisladas de cultivos de arroz de Rioja en función a sus características microscópicas.

### 6.3.2. Características fisiológicas

#### A. Tolerancia salina

Todos los aislados crecieron en NaCl 0,5% p/v; mientras que siete cepas crecieron en 5,0%. Cuatro exhibieron crecimiento en 10,0% de salinidad y solo la cepa MA2 presentó crecimiento en 15,0 y 20,0% de NaCl (Figura 6). En la tabla 5, se evidencia que la cepa MA2 presentó mejor crecimiento en 5,0% p/v de NaCl mientras que las cepas MA1, MA5 y MA8 mostraron menor crecimiento bajo esta misma condición. Por otro lado, en la tabla 6, la cepa MA2 evidenció mejor crecimiento en comparación con las cepas MA3, MA9 y MA12 bajo una concentración de 10,0% p/v de NaCl.



**Figura 6.** Bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja cultivadas a diferentes concentraciones de NaCl. Crecimiento: Positivo (■), negativo (□).

**Tabla 5.** Crecimiento de las bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja en NaCl 5,0% p/v.

Cepas	Densidad Óptica (DO)
MA1	0,139 ± 0,059 <sup>d</sup>
MA2	1,508 ± 0,033 <sup>a</sup>
MA3	0,739 ± 0,113 <sup>b</sup>
MA5	0,097 ± 0,016 <sup>d</sup>
MA8	0,093 ± 0,009 <sup>d</sup>
MA9	0,575 ± 0,207 <sup>bc</sup>
MA12	0,189 ± 0,079 <sup>cd</sup>
Valor-P	0,0000

Media ± DS de densidad óptica. Las diferentes letras en superíndice representan las diferencias significativas de los crecimientos a un nivel de confianza del 95%.

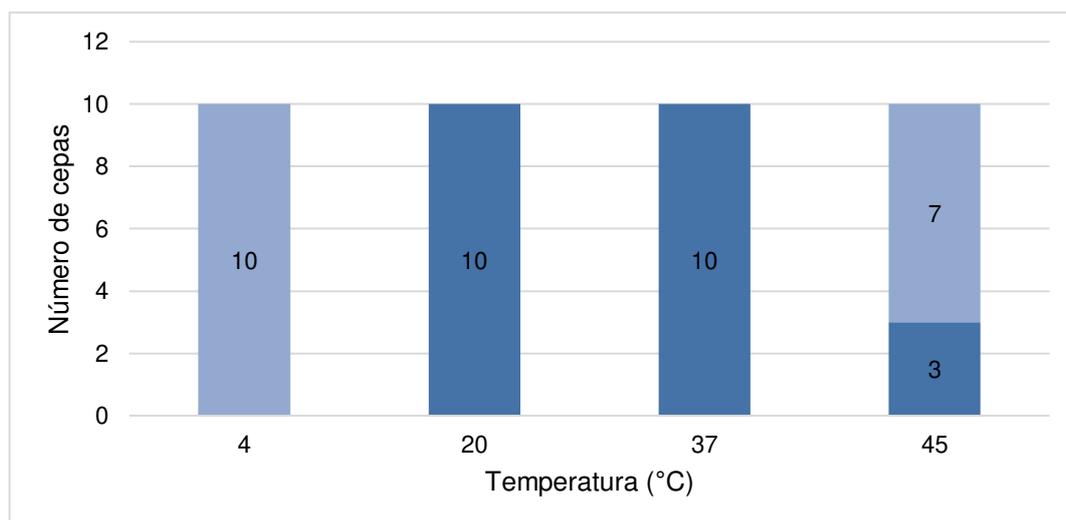
**Tabla 6.** Crecimiento de las bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja en NaCl 10,0% p/v.

Cepas	Densidad Óptica (DO)
MA2	1,498 ± 0,074 <sup>a</sup>
MA3	0,351 ± 0,015 <sup>b</sup>
MA9	0,253 ± 0,194 <sup>b</sup>
MA12	0,215 ± 0,036 <sup>b</sup>
Valor-P	0,0007

Media ± DS de densidad óptica. Las diferentes letras en superíndice representan las diferencias significativas de los crecimientos a un nivel de confianza del 95%.

### B. Prueba de temperatura

El 100% de las cepas bacterianas tuvieron la capacidad de crecer entre 20 y 37 °C. Adicionalmente, ninguna de las cepas creció a 4 °C y solo las cepas MA3, MA9 y MA12 crecieron a 45 °C (Figura 7).

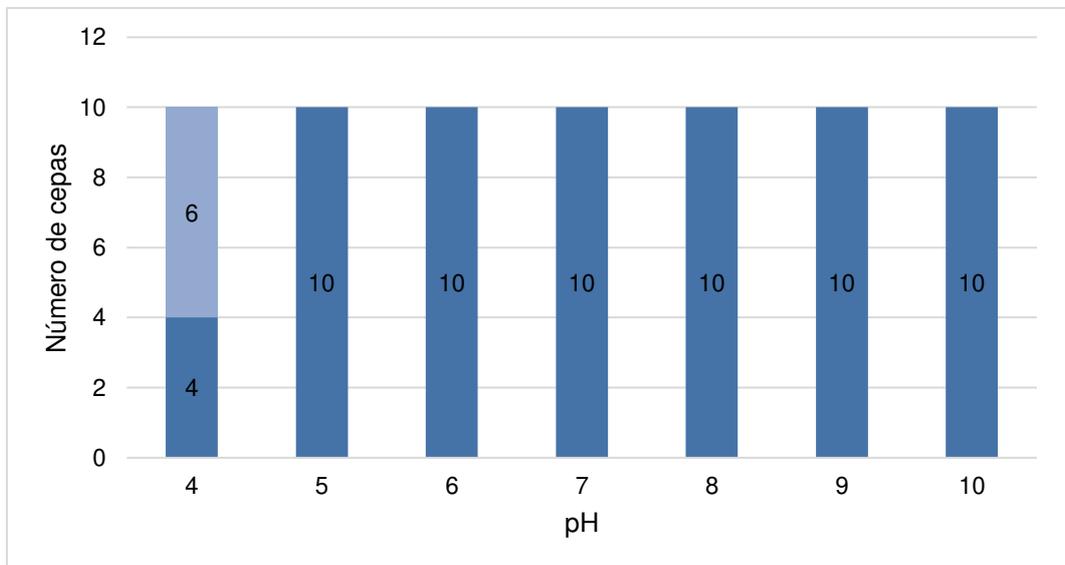


**Figura 7.** Bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja cultivadas a diferentes temperaturas.

Crecimiento: Positivo (■), negativo (□)

### C. Prueba de pH

Las cepas bacterianas presentaron un vasto rango de pH de crecimiento, predominantemente entre 5 y 10. Las cepas MA2, MA3, MA9 y MA12 también crecieron a pH de 4 (Figura 8).



**Figura 8.** Bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja cultivadas a diferentes valores de pH.

Crecimiento: Positivo (■), negativo (□).

**Tabla 7.** Características fenotípicas de las bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja.

Característica	Aislados bacterianos									
	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5	MA6	MA8	MA9	MA10	MA12
<b>Morfología celular</b>	Bacilo	Coco	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
<b>Tinción Gram</b>	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
<b>Forma de la colonia</b>	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda
<b>Aspecto de la colonia</b>	Mediana de bordes regulares	Pequeña de bordes regulares	Mediana, seca y de bordes regulares	Mediana de bordes regulares	Mediana de bordes regulares	Mediana, mucosa y de bordes regulares	Mediana de bordes regulares	Grande de bordes irregulares	Mediana, mucosa y de bordes regulares	Mediana, traslúcida mucosa y de bordes regulares
<b>Catalasa</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Citrato</b>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
<b>Indol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Motilidad</b>	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Metabolismo de glucosa</b>	-	+	+	-	-	+/G	-	+	+/G	+
<b>Producción de β-galactosidasa</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-

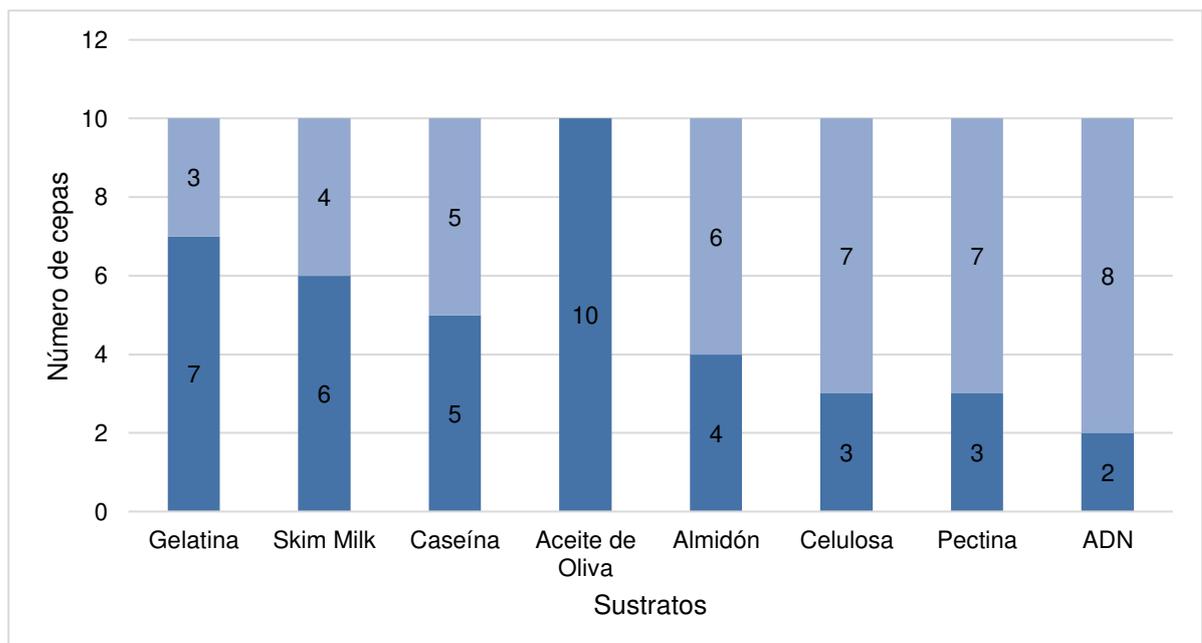
(+) Positivo (-) Negativo (+/G) Positivo con producción de gas

### 6.3.3. Perfiles de actividades hidrolíticas

Se identificaron cinco perfiles hidrolíticos en las cepas bacterianas (tabla 8). Así, las cepas MA3, MA9 y MA12 hidrolizaron gelatina, *skim milk*, caseína, aceite de oliva, almidón, celulosa y pectina; las cuales se agruparon en el perfil III. Además, las actividades lipolíticas y proteolíticas fueron prevalentes en la mayoría de cepas (Figura 9).

**Tabla 8.** Perfiles hidrolíticos de las bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja.

Perfil	Macromoléculas hidrolizadas	Cepa
I	Aceite de oliva	MA1, MA5, MA8
II	Gelatina, <i>Skim Milk</i> , Aceite de oliva	MA2
III	Gelatina, <i>Skim Milk</i> , Caseína, Aceite de oliva, Almidón, Celulosa, Pectina	MA3, MA9, MA12
IV	Gelatina, Aceite de oliva, Almidón	MA4
V	Gelatina, <i>Skim Milk</i> , Caseína, Aceite de oliva, ADN	MA6, MA10



**Figura 9.** Actividades hidrolíticas de las bacterias aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja. Hidrólisis: Positivo (■), negativo (□).

### 6.3.4. Perfiles fermentativos de azúcares

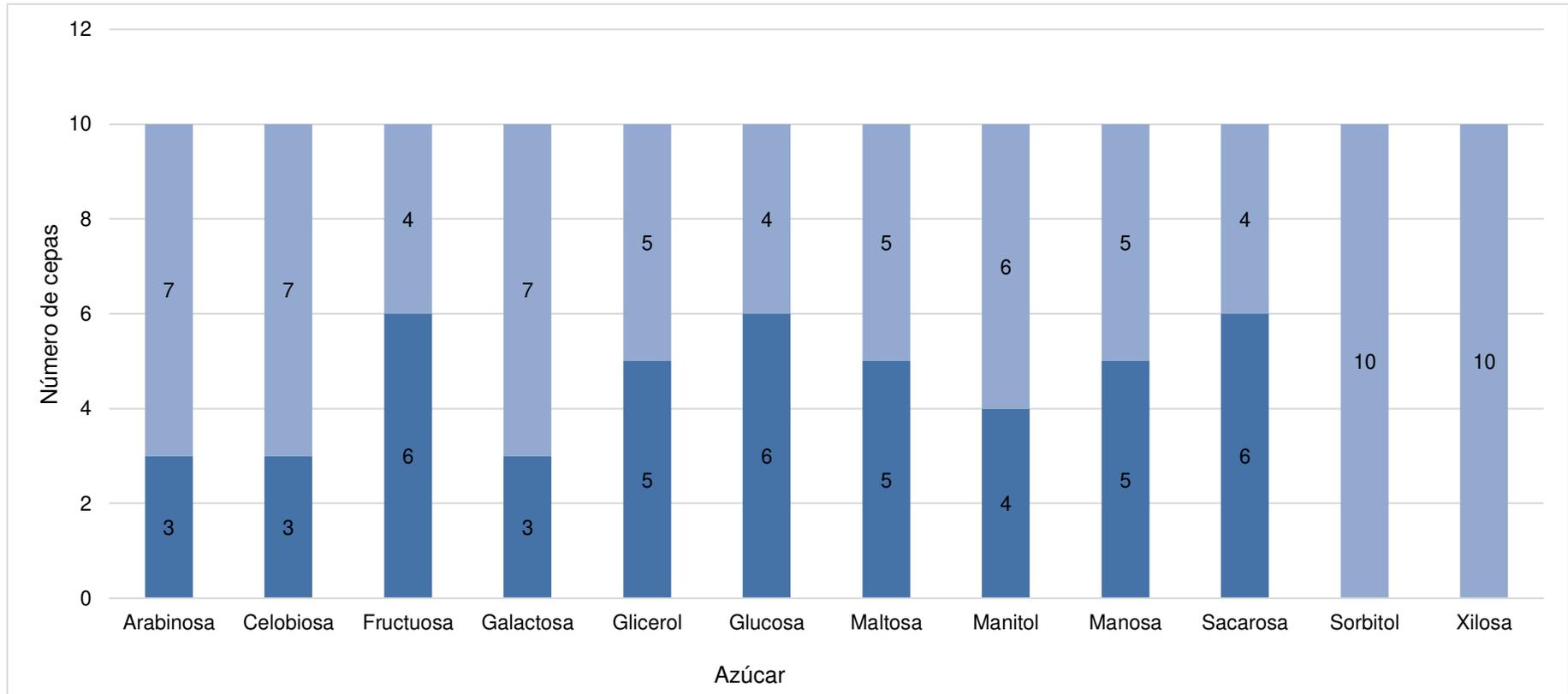
Con base en las capacidades fermentativas de los azúcares, se obtuvieron seis perfiles (tabla 9). Ningún aislado fermentó sorbitol ni xilosa. Por otro lado, las cepas MA1, MA4, MA5 y MA8 no metabolizaron ninguno de los azúcares evaluados (perfil VI).

**Tabla 9.** Perfiles del metabolismo de azúcares de las bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja.

Perfil	Azúcares metabolizados	Cepa
I	Fructuosa, Galactosa, Glucosa, Maltosa, Sacarosa	MA2
II	Celobiosa, Fructuosa, Glicerol, Glucosa, Manitol, Manosa, Sacarosa	MA3
III	Arabinosa, Fructuosa <sup>(a)</sup> , Galactosa, Glicerol, Glucosa <sup>(a)</sup> , Maltosa <sup>(a)</sup> , Manitol <sup>(a)</sup> , Manosa <sup>(a)</sup> , Sacarosa <sup>(a)</sup>	MA6, MA10
IV	Arabinosa, Celobiosa, Fructuosa, Glicerol, Glucosa, Maltosa, Manosa, Sacarosa	MA9
V	Celobiosa, Fructuosa, Glicerol, Glucosa, Maltosa, Manitol, Manosa, Sacarosa	MA12
VI	No fermentan ningún azúcar evaluado	MA1, MA4, MA5, MA8

<sup>(a)</sup> produjeron gas

En la figura 10 se presenta el número de aislados bacterianos con capacidad fermentativa sobre arabinosa, celobiosa, fructuosa, galactosa, glicerol, glucosa, maltosa, manitol, manosa, sacarosa, sorbitol y xilosa. Cabe destacar que las cepas MA1, MA4, MA5, MA8 no fermentaron ningún azúcar.



**Figura 10.** Metabolismo de azúcares de las bacterias aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja.

Hidrólisis: Positivo (■), negativo (□).

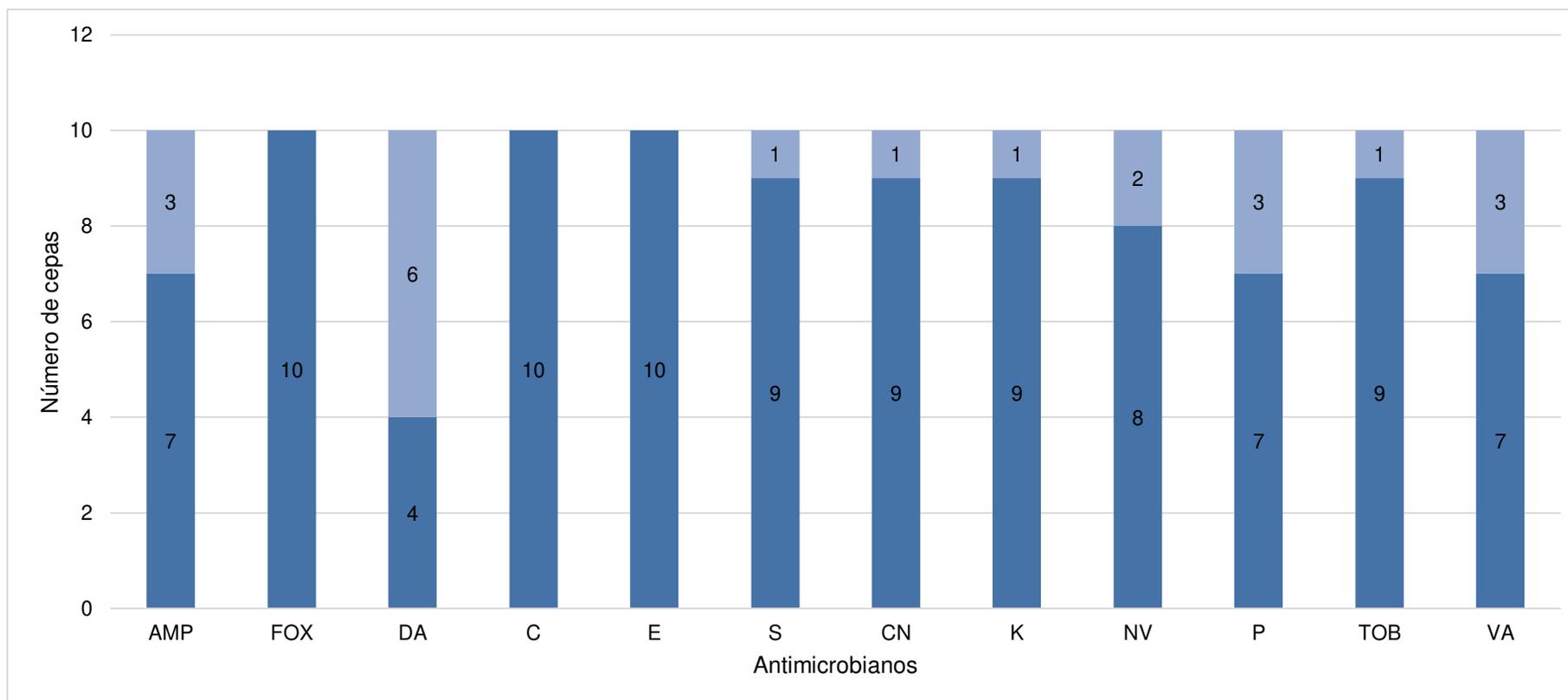
### 6.3.5. Perfiles de sensibilidad antimicrobiana

Las cepas bacterianas fueron clasificados en función a su sensibilidad antimicrobiana, así se obtuvieron cinco perfiles (Tabla 10). Por otro lado, las cepas fueron distribuidas por su sensibilidad a cada antimicrobiano (Figura 11). Todas las cepas presentaron sensibilidad a cefoxitina, eritromicina y cloranfenicol. Los aislados MA3, MA9 y MA12 presentaron sensibilidad a todos los antimicrobianos, mientras que, el aislado MA4, fue el que tuvo mayor perfil de resistencia.

**Tabla 10.** Perfiles de sensibilidad antimicrobiana de las bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja.

Perfil	Antimicrobiano	Cepa
I	AMP, FOX, C, E, S, CN, K, NV, P, TOB, VA	MA1, MA5, MA8
II	AMP, FOX, DA, C, E, S, CN, NV, P, TOB, VA	MA2
III	AMP, FOX, DA, C, E, S, CN, K, NV, P, TOB, VA	MA3, MA9, MA12
IV	FOX, C, E, K, NV	MA4
V	FOX, C, E, S, CN, K, TOB	MA6, MA10

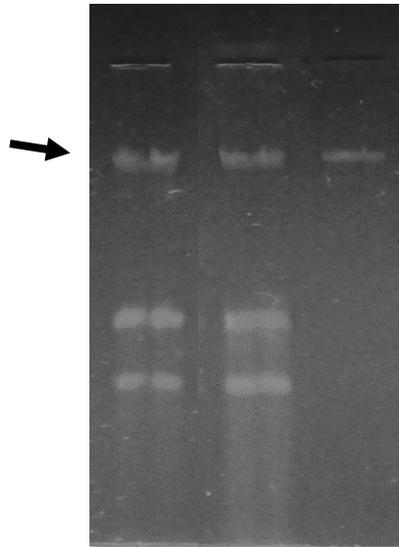
**Antimicrobiano:** AMP, ampicilina; FOX, cefoxitina; DA, clindamicina; C, cloranfenicol; E, eritromicina; S, estreptomicina; CN, gentamicina; K, kanamicina; NV, novobiocina; P, penicilina; TOB, tobramicina; VA, vancomicina.



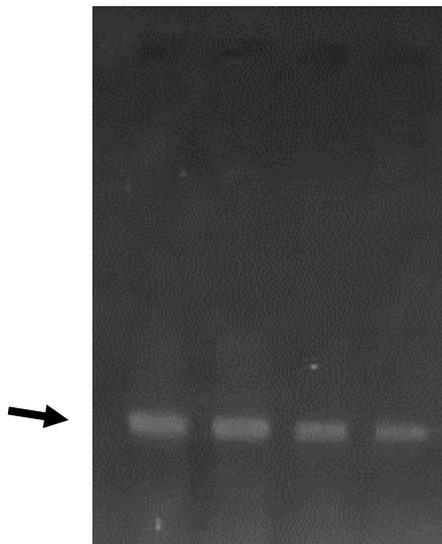
**Figura 11.** Sensibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja. Sensible (■), resistente (■). Antimicrobiano: AMP, ampicilina; FOX, cefoxitina; DA, clindamicina; C, cloranfenicol; E, eritromicina; S, estreptomicina; CN, gentamicina; K, kanamicina; NV, novobiocina; P, penicilina; TOB, tobramicina; VA, vancomicina.

#### 6.4. Caracterización genotípica de bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja

En la figura 12 se muestra los ADN genómicos extraídos de las cepas bacterianas. A su vez, en la figura 13, se evidencia la amplificación de los genes ribosómicos 16S.



**Figura 12.** Gel de agarosa conteniendo ADN genómico de bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja



**Figura 13.** Gel de agarosa conteniendo los genes ribosómicos 16S amplificados de bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja

#### 6.4.1. Distribución genotípica y porcentajes de similitud de los aislados bacterianos

El análisis bioinformático a través del algoritmo BLASTn de las secuencias parciales de los genes ribosómicos 16S de las cepas bacterianas con actividad esterasa aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja agrupa a estos aislados en cinco géneros, siendo *Acinetobacter* y *Bacillus* las de mayor prevalencia (Tabla 11).

**Tabla 11.** Porcentaje de similitud de las secuencias parciales de los genes ribosómicos 16S de las bacterias productoras de esterases aisladas de suelos de cultivo de arroz de Rioja.

Aislado bacteriano	Género	Similitud (%)
MA1	<i>Acinetobacter</i>	100,00
MA2	<i>Staphylococcus</i>	100,00
MA3	<i>Bacillus</i>	100,00
MA4	<i>Comamonas</i>	100,00
MA5	<i>Acinetobacter</i>	99,86
MA6	<i>Aeromonas</i>	99,86
MA8	<i>Acinetobacter</i>	99,72
MA9	<i>Bacillus</i>	99,29
MA10	<i>Aeromonas</i>	99,86
MA12	<i>Bacillus</i>	99,86

## VII. DISCUSIÓN

San Martín es uno de los departamentos con mayor producción de arroz a nivel nacional según el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego; presenta una extensión de siembra de cultivo de más de 100 000 ha, siendo Rioja la segunda provincia con mayor participación con un 24,3%<sup>7,72</sup>. Estos suelos de cultivo están ubicados en la Selva Alta a 820 m de altitud aproximadamente, donde existe gran diversidad biológica, en especial la microbiana.

En esta investigación se aislaron y caracterizaron microorganismos aeróbicos o anaeróbicos facultativos debido a la producción de catalasa (Tabla 7), enzima responsable de la descomposición de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ausente en bacterias anaeróbicas estrictas. En este aspecto, los terrenos destinados al cultivo de arroz son sometidos a periodos de inundaciones temporales (anegamiento), lo cual contribuye a la generación de condiciones anóxicas que permiten el crecimiento de microorganismos anaeróbicos, los cuales poseen un rol en la descomposición de residuos vegetales generados por el arado de la tierra. Sin embargo, también es posible el desarrollo de bacterias aeróbicas o anaeróbicas facultativas gracias a la difusión del oxígeno a través del agua de inundación y la liberación de este gas de las raíces vegetales, las cuales contribuyen con la fertilidad del suelo<sup>4,14,15</sup>.

De los 10 aislados productores de esterasas, seis fueron identificados como bacilos Gram negativos y tres bacilos Gram positivos; y un coco Gram positivo (Figura 5). Todos presentan crecimiento óptimo a concentraciones salinas de 0,5% p/v. Sin embargo, el crecimiento disminuye cuando las sales se incrementan (Figura 6). Asimismo, estas bacterias crecieron entre 20 y 37 °C; y solo tres toleran los 45 °C (Figura 7). Cabe resaltar, que todas las bacterias crecieron en el rango de pH entre 5 y 10 (Figura 8); estas condiciones de crecimiento están relacionadas con las características de los suelos de cultivo de arroz, las cuales son de baja salinidad dado que su exceso perjudica el crecimiento de la planta, con un pH entre 5,5 y 7,2 dependiendo de la forma de cultivo (secano o bajo riego) siendo el pH óptimo 6,6 para el desarrollo del arroz; además las temperaturas oscilan entre los 18 y 35 °C<sup>73,74</sup>.

Estudios sobre bacterias aisladas de los suelos de cultivos de arroz se han realizado en el continente asiático. Así Zhang y col (2015) identificaron por primera vez a *Arenimonas taoyuanensis* a partir de suelos de cultivo de arroz en la ciudad de Taoyuan, China, bacilo aeróbico Gram negativo no fermentador de glucosa, productor de esterasa y con capacidad de hidrolizar gelatina, sus condiciones óptimas de crecimiento son 28 °C, pH 7,0 y NaCl menor a 1%<sup>18</sup>. Por otro lado, Choi e Im (2018) identificaron a *Paraburkholderia azotifigens* en Anseong, Corea del Sur; bacilo aeróbico Gram negativo, fermentador de glucosa, productor de esterasa y  $\beta$ -galactosidasa, cuyas condiciones óptimas de crecimiento son de 25 a 30 °C, pH 7,0 y concentración de NaCl menor de 2% p/v<sup>19</sup>. Asimismo, Liu y col (2017) aislaron un bacilo Gram positivo aeróbico proveniente de suelos de cultivo de arroz en Linshan, China; las condiciones óptimas de crecimiento son 30 °C, pH 9,0 y salinidad menor de 4% p/v. Esta bacteria fue *Bacillus praedii*, fermentadora de glucosa con capacidad de hidrolizar gelatina y de producir esterases y lipasas<sup>21</sup>. Además, Ding y col (2019) identificaron por primera vez a *Bacillus aciditolerans* en suelos de cultivo de arroz en Jietou, China; bacilo móvil, Gram positivo con condiciones óptimas de crecimiento a 37 °C, pH 7,0 y NaCl 1,0% p/v. Esta especie es catalasa positiva, productora de indol, pero H<sub>2</sub>S negativa; hidroliza gelatina, pero no almidón ni caseína, a la vez presenta actividad  $\beta$ -galactosidasa, pero no lipolítica. En cuanto al metabolismo de azúcares, es positivo para galactosa y manosa, y negativo para glucosa, arabinosa, celobiosa, fructuosa, maltosa, sacarosa, xilosa, glicerol, sorbitol y citrato<sup>75</sup>.

Los aislados bacterianos a partir de suelos de cultivo de arroz de Rioja presentaron actividad hidrolítica sobre tributirina, sustrato estándar para la determinación de actividad esterasa<sup>26</sup>. En la tabla 4, se describe el tamaño de los halos y radios de hidrólisis, definido como la proporción que existe entre el tamaño del halo de hidrólisis y el tamaño de crecimiento de la colonia<sup>76</sup>. Así, las cepas MA3, MA9 y MA12 pertenecientes al género *Bacillus* presentan un halo de hidrólisis grande. Sin embargo, su radio es cercano a 1; por el contrario, la cepa MA2 identificada como *Staphylococcus* sp. presenta un radio de hidrólisis de 10,75, y *per se* una mayor actividad esterasa. En este aspecto, Punitha y Rose (2018) aislaron e identificaron una cepa de *Staphylococcus* sp., productora de esterases intracelulares, capaz de

degradar plaguicidas organofosforados, a partir de campos agrícolas contaminados en Karnataka, India<sup>77</sup>.

En Perú, los sembríos de arroz son sometidos a plaguicidas organofosforados y carbamatos para mejorar su producción<sup>8,9,78</sup>. Estos compuestos contienen enlaces ésteres en su estructura química, razón por la cual, los microorganismos aislados de estos ambientes estarían adaptados a los compuestos e inclusive los utilizarían como fuente de carbono. Por tanto, dada la capacidad de producción de esterasas, las bacterias aisladas se podrían utilizar para la biorremediación de suelos y aguas de cultivos de arroz y otros cultivares<sup>10,11</sup>. En este contexto, Pailan y col (2015) aislaron un bacilo aeróbico Gram positivo no móvil proveniente de la rizosfera de terrenos de cultivo de arroz en Narigram, India; identificado como *Bacillus aryabhatai* capaz de degradar paratión y clorpirifos<sup>79</sup>.

En la tabla 11 se presenta los 10 aislados agrupados en los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Comamonas* y *Staphylococcus* según el análisis bioinformático de las secuencias parciales de los genes ribosómicos 16S (Figura 13). En este aspecto, Onwona-Kwakye y col (2020) estudiaron la diversidad bacteriana en suelos de cultivos de arroz en Akuse, Ghana después del uso de pesticidas; ellos describen que los géneros *Aeromonas*, *Comamonas*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas* y *Bordetella* disminuyen en áreas expuestas a pesticidas; por el contrario, los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Domibacillus* y *Pseudomonas* se incrementan<sup>78</sup>.

Las bacterias cumplen un rol importante en la nutrición de los suelos, contribuyen a una agricultura sostenible<sup>78,80</sup>. Así, las bacterias promotoras de crecimiento vegetal producen fitohormonas, solubilizan minerales, fijan nitrógeno, producen metabolitos contra fitopatógenos, entre otros. Una de las funciones más importantes de este grupo de bacterias, es la de promover la solubilización del fosfato inorgánico, de esta forma, el fósforo liberado favorece el crecimiento vegetal<sup>81-83</sup>.

Las cepas del género *Aeromonas* disuelven fosfato inorgánico, cumplen un rol importante en el equilibrio microbiano de los suelos<sup>78,81</sup>. Son bacterias anaeróbicas facultativas, catalasa positiva y utilizan la glucosa como fuente de carbono con o sin producción de gas y también de otros carbohidratos. En ese sentido, los aislados MA6 y MA10 generaron gas como resultado del metabolismo de algunos

azúcares como glucosa, fructuosa y sacarosa (Tabla 9). Asimismo, son reductoras de nitratos a nitritos y producen diversas enzimas extracelulares como lipasas y proteasas<sup>84</sup>. Por ejemplo, Aarab y col (2015) aislaron nueve bacterias con capacidad de solubilizar diversas formas minerales de fosfato a partir de la rizosfera de cultivos de arroz en Marruecos; las cuales pertenecen a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*<sup>82</sup>. En un estudio posterior, estos mismos investigadores utilizaron a tres cepas de *Aeromonas* como biofertilizantes con el fin de solubilizar el fosfato inorgánico para el cultivo de arroz, además estas bacterias presentaron actividad antagónica frente a fitopatógenos<sup>81</sup>. Por su parte, Mehnaz y col (2001) aislaron cuatro bacterias promotoras de crecimiento vegetal provenientes de campos de arroz en Gujranwala, Pakistán, las cuales evidenciaron efectos positivos como inóculos sobre el crecimiento de estos cultivos. Uno de estos aislados fue identificado como *Aeromonas veronii*, bacilo móvil Gram negativo, fermentadora de glucosa con producción de gas y positivo para la producción de ácidos a partir de sacarosa, manitol, maltosa y sorbitol. Este microorganismo, al igual que las cepas MA6 y MA10, fue negativo para la producción de H<sub>2</sub>S e indol, positivo para la producción de β-galactosidasa, resistente frente a la ampicilina y sensible a gentamicina, kanamicina y estreptomycin<sup>85</sup>.

En esta investigación, los aislados MA3, MA9 y MA12 pertenecen al género *Bacillus*, cuyas especies son descritas como bacilos aeróbicos o anaeróbicos facultativos Gram positivos formadores de endosporas<sup>86</sup>. En este contexto, Xie y col (2003) identificaron cepas de *B. azotoformans*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. brevis* y *B. subtilis* a partir de suelos de cultivo de arroz en la llanura del río Yangtze en China, las cuales presentaron capacidad de fijación de N<sub>2</sub><sup>87</sup>. Por su parte, Chawngthu y col (2020) aislaron bacterias solubilizantes de fosfato pertenecientes a los géneros *Paenibacillus*, *Burkholderia* y *Bacillus* a partir de la rizosfera de cultivos de arroz en North Vanlaphai, India; siendo este último género el que presentó mayor número de especies, tales como *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. wiedmannii* y *B. siamensis*<sup>88</sup>.

El género *Bacillus* es considerado el más abundante en la rizosfera como promotores de crecimiento vegetal al liberar metabolitos que influyen de manera positiva en los cultivos ya sea al permitir el incremento de la disponibilidad de nutrientes o por evidenciar un efecto antagónico sobre fitopatógenos<sup>89,90</sup>. Así, se ha

descrito a *B. subtilis* y *B. cereus* en los suelos de cultivo de arroz con efecto promotor de crecimiento vegetal<sup>83,91</sup>. Además, Chung y col (2015) aislaron dos bacterias del género *Bacillus* a partir de raíces de plantas de arroz de Jinju, Corea del Sur con capacidad promotora de crecimiento vegetal y efecto antagónico sobre *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* y *Burkholderia glumae*. Las cepas pertenecen a *B. oryzicola*, bacilo Gram positivo, móvil y catalasa positivo con crecimiento óptimo entre 28 y 30 °C, pH 7,0 y tolerancia a NaCl entre 1 y 13% p/v. Sus características fisiológicas son similares a los aislados MA3, MA9 y MA12, los cuales presentaron crecimiento a 45 °C, pH entre 4 y 10 y concentración salina de hasta 10%. En cuanto al metabolismo de azúcares, la cepa MA12 presentó un perfil similar a *B. oryzicola* al utilizar glucosa, fructuosa, manosa, manitol, celobiosa, maltosa, sacarosa y citrato como fuente de carbono. Sin embargo, el perfil hidrolítico y de sensibilidad antimicrobiana de *B. oryzicola* fue diferente. Esta cepa fue positiva para la hidrólisis de caseína, gelatina y almidón y negativo para CMC, asimismo, presentó actividad esterasa, pero no lipasa ni  $\beta$ -galactosidasa, en contraposición a la cepa MA12 que hidrolizó CMC y presentó actividad lipasa. En cuanto a su perfil de sensibilidad antimicrobiana, *B. oryzicola* fue sensible a ampicilina, penicilina, gentamicina, kanamicina y vancomicina y, en contraposición a la cepa MA12, presentó resistencia a cloranfenicol y estreptomina<sup>92</sup>.

Por otro lado, Bao y col (2016) aislaron e identificaron a *B. oryzae* en suelos de cultivo de arroz en Dehong, China, capaz de reducir nitratos, lo que permite que las plantas logren asimilar nitrógeno para su nutrición. Asimismo, *B. oryzae* redujo los selenitos, incrementando la biodisponibilidad de selenio en los suelos para la posterior fortificación del arroz. El aislado fue caracterizado como bacilo móvil Gram positivo y anaeróbico facultativo formador de endosporas con crecimiento óptimo entre 30 y 40 °C, pH 7,0 y NaCl menor a 1,1% p/v. No presentó capacidad hidrolítica sobre caseína, almidón ni gelatina. En cuanto a su metabolismo de azúcares, fue positivo para glucosa y maltosa, pero no para manosa, manitol ni xilosa<sup>93</sup>.

Con base a lo descrito anteriormente, las cepas MA3, MA9 y MA12 pertenecientes al género *Bacillus*, tendrían gran potencial como biofertilizantes para los cultivos de arroz. Además, estos aislados muestran el mayor rango de hidrólisis de macromoléculas (Tabla 8), en consecuencia, estas bacterias se podrían utilizar en la producción de diversos metabolitos de interés industrial. En este aspecto,

Sriariyanun y col (2016) aislaron una cepa de *Bacillus* con alta actividad celulósica a partir de suelos de cultivos arroz en Ayutthaya, Tailandia con potencial aplicación en la biorrefinería<sup>5</sup>. Asimismo, Roy y col (2020) aislaron a *Bacillus flexus* a partir de la rizosfera de cultivos de arroz en Purba Bardhaman, India, catalasa positiva e indol negativo capaz de producir gelatinasa y lipasa además de amilasa. En cuanto a su metabolismo de azúcares, esta bacteria utiliza glucosa, fructuosa, xilosa, celobiosa y manosa como fuentes de carbono, pero no maltosa, sacarosa, galactosa, sorbitol, manitol ni arabinosa. Asimismo, *B. flexus* evidenció sensibilidad a gentamicina, kanamicina, eritromicina y cloranfenicol, mientras que, a diferencia de los aislados MA3, MA9 y MA12, fue resistente a penicilina y ampicilina<sup>6</sup>.

Con respecto al género *Staphylococcus*, agrupa a especies que promueven el crecimiento vegetal. Así, Susilowati y col (2015) estudiaron la diversidad funcional de bacterias aisladas de suelos costeros de áreas de producción de arroz en Indonesia. Dos cepas bacterianas (Ptb I B3.10 y Er II B3.8) identificadas como *S. gallinarum* fijaron N<sub>2</sub>, pero no solubilizaron fosfato. Solo la cepa Ptb I B3.10 presentó actividad celulósica, en contraposición a la cepa Er II B3.8 que, al igual que MA2, no presentó esta actividad<sup>94</sup>. Por otro lado, Dutta y col (2017) aislaron e identificaron a *S. sciuri* a partir de campos de arroz contaminados con cromo en Sundarbans, India<sup>95</sup>. De este modo, la cepa MA2 perteneciente al género *Staphylococcus*, con actividad esterasa, se podría aplicar en la biorremediación de suelos.

Con referencia al género *Acinetobacter*, cocobacilos aeróbicos estrictos Gram negativos, no fermentadores, no móviles, catalasa positivas siendo *A. baumannii*, patógeno oportunista responsable de diversas infecciones intrahospitalarias<sup>96</sup>. Los principales hábitats de *Acinetobacter* spp. son los suelos de cultivo, áreas contaminadas por hidrocarburos, lodos, aguas residuales, vertederos, entre otros; así como vegetales, animales y humanos, razón por la cual, son microorganismos ubicuos capaces de ocupar varios nichos ecológicos bajo un amplio rango de condiciones ambientales por periodos extendidos de tiempo<sup>97,98</sup>. Así, Carr y col (2003) describen siete especies del género *Acinetobacter* aisladas de lodos activados en Victoria, Australia; identificadas como *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. tjernbergiae*, *A. grimontii*, *A. townneri*, *A. tandoii* y *A. gernerii*. Todas las cepas fueron caracterizadas como cocobacilos Gram negativos, aeróbicos estrictos, crecen

hasta 44 °C. Al igual que los aislados MA1, MA5 y MA8, no hidrolizaron gelatina ni produjeron ácidos a partir de sacarosa, manitol y maltosa. Sin embargo, las características de *A. bouvetii*, *A. towneri*, *A. tandoii* y *A. tjernbergiae* se asemejaron a las de los aislados MA1, MA5 y MA8 dado que no produjeron ácidos a partir de glucosa, arabinosa, xilosa, celobiosa y manosa; ni tuvieron la capacidad de asimilar el citrato<sup>99</sup>.

Por otro lado, Choi y col (2012) identificaron *Acinetobacter* a partir de muestras ambientales de diferentes localidades de Corea del Sur, las cuales fueron identificadas como *Acinetobacter* sp., *A. parvus*, *A. calcoaceticus* y *A. tandoii*<sup>100</sup>. En un estudio posterior (2013), se describe a *A. kookii*, cuyas características se asemejan a las cepas MA1, MA5 y MA8, al presentar un rango de crecimiento entre 24 y 41 °C, sin capacidad de utilizar arabinosa, glucosa ni citrato; así como, no producen gelatinasa<sup>98</sup>. Asimismo, Kim y col (2008) aislaron *A. soli* a partir de suelos forestales en Mt. Baekwoon, Corea del Sur, cuyas condiciones óptimas de crecimiento son 30 °C, pH de 6,0 a 8,0 y NaCl entre 0,5 y 1%. Esta bacteria no hidrolizó caseína ni almidón, sin embargo, mostró actividad lipolítica<sup>101</sup>. Al respecto, Snellman y Colwell (2004) describen a *Acinetobacter* como fuente de lipasas, lo cual explicaría la presencia de esta actividad en las cepas MA1, MA5 y MA8<sup>102</sup>.

Asimismo, cepas del género *Acinetobacter* degradan compuestos orgánicos ambientales<sup>97</sup>. Tal es el caso de *A. oleivorans*, designada como DR1<sup>T</sup> aislada de suelos de cultivo de arroz en Deok-So, Corea del Sur. Esta bacteria se caracteriza por ser un cocobacilo aeróbico Gram negativo con motilidad a diferencia de otras especies del mismo género debido a la presencia de fimbrias alrededor de su superficie celular. En cuanto a sus características fisiológicas, presenta crecimiento óptimo a 30 °C, pH entre 6,0 y 8,0 y NaCl menor a 1% p/v. Asimismo, los aislados MA1, MA5 y MA8 producen lipasas; pero no gelatinasas ni amilasas. Sin embargo, *A. oleivorans*, a diferencia de los aislados MA1, MA5 y MA8, produjo ácidos a partir de celobiosa, glucosa, manosa y citrato<sup>103,104</sup>. Asimismo, cepas del género *Acinetobacter* aisladas de la rizosfera de cultivos de arroz, tales como *A. tandoii*, promotora de crecimiento vegetal con capacidad antagónica sobre *Macrophomina phaseolina*<sup>105</sup>. Asimismo, Gandhi y col (2016) aislaron especies de *Acinetobacter* de la rizosfera de cultivos de arroz en Cuddalore, India; capaces de solubilizar el zinc, micronutriente vital en procesos metabólicos de las plantas<sup>106</sup>.

Con referencia a cepas del género *Comamonas* bacilos aeróbicos o anaeróbicos facultativos Gram negativos; algunas presentan flagelos en su estructura. Sin embargo, *C. koreensis* y *C. zonglianii* son inmóviles<sup>107</sup>. Cepas de este género han sido aisladas de una gran variedad de hábitats tales como lodo, aguas residuales, suelos, humedales, minas, sedimentos marinos, entre otros<sup>108</sup>. En este aspecto, Sun y col (2013) aislaron e identificaron a *C. jiangduensis* de suelos agrícolas en Jiangdu, China; bacilo aeróbico Gram negativo, móvil, productora de biosurfactantes y crece óptimamente a 37 °C, pH entre 7,0 y 7,5; y NaCl al 1% p/v. El aislado MA4, al igual que *C. jiangduensis*, no produce H<sub>2</sub>S, indol ni β-galactosidasa; pero produce esterasas. Asimismo, ambas bacterias son negativas para la asimilación de glucosa, arabinosa, manosa, manitol y maltosa. Sin embargo, difieren tanto en la producción de lipasa y gelatinasa como en la asimilación de citrato, las cuales son positivas para MA4. Con respecto a su perfil de resistencia a antimicrobianos, *C. jiangduensis* es resistente a ampicilina, penicilina G, gentamicina y estreptomycin, al igual que MA4, el cual presentó el mayor perfil de resistencia (Tabla 10)<sup>109</sup>

Por su parte, Huang y col (2020) aislaron a *C. testosteroni* a partir de suelos de cultivos de arroz en Jiangtang, China. Esta bacteria incrementa la biodisponibilidad de Se en los suelos y, por tanto, incrementa su concentración en las plantas de arroz mediante la reducción de este elemento, permitiendo así la fortificación del arroz, el cual es un micronutriente importante para la salud humana. Esta bacteria es un bacilo anaeróbico facultativo Gram negativo, con un crecimiento óptimo entre 25 y 30 °C y a pH 7,0; negativo para la producción de β-galactosidasa y H<sub>2</sub>S, con capacidad de asimilar citrato, pero no sacarosa ni xilosa, características similares al aislado MA4; sin embargo, *C. testosteroni* asimila maltosa<sup>110</sup>. De igual forma, MA4 presenta características similares a *C. zonglianii* aislada de suelos contaminados con fenol en Nanjing, China, es bacilo aeróbico Gram negativos no móvil, con crecimiento óptimo de 25 a 37 °C, pH de 7 a 8 y NaCl menor a 1% p/v. Esta bacteria hidroliza gelatina y produce lipasas y esterasas, asimila citrato, pero no glucosa, arabinosa, manosa, manitol ni maltosa. Además, no produce indol ni β-galactosidasa. En cuanto a sus perfiles de resistencia a antimicrobianos, presenta resistencia frente a ampicilina, penicilina G, gentamicina y estreptomycin<sup>111</sup>.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Se aislaron 10 bacterias productoras de esterasas a partir de suelos de cultivo de arroz de Rioja en el departamento de San Martín, la cepa MA2 presentó la mayor actividad hidrolítica sobre tributirina.
2. De los aislados, seis fueron bacilos Gram negativos, tres Gram positivos y un coco Gram positivo, todos son mesófilos y crecen en amplio rango de pH.
3. La caracterización nutricional y la sensibilidad antimicrobiana indican que las cepas MA1, MA5 y MA8 pertenecen a un grupo diferente al de las cepas MA6 y MA10. Además, se identificaron cinco perfiles hidrolíticos, siendo las cepas MA3, MA9 y MA12, las que presentaron amplio rango de sustratos.
4. Los aislados bacterianos fueron identificados mediante secuenciación de los genes ribosómicos 16S como *Acinetobacter* (MA1, MA5, MA8), *Staphylococcus* (MA2), *Bacillus* (MA3, MA9, MA12), *Comamonas* (MA4) y *Aeromonas* (MA6 y MA10).

## IX. RECOMENDACIONES

- Identificar la especie bacteriana de los aislados mediante pruebas confirmatorias como perfil lipídico de membrana, cálculo de contenido de G + C e hibridación de ADN-ADN, así como uso de otros cronómetros moleculares.
- Producir y caracterizar las esterases de *Staphylococcus* sp MA2.
- Evaluar la producción de otras enzimas por las cepas bacterianas para su uso en diversos sectores productivos.
- Determinar la capacidad promotora de crecimiento vegetal de las cepas bacterianas con el propósito de ser utilizadas como bioestimulantes de los cultivos de arroz.
- Evaluar la utilización de pesticidas como fuente de carbono de las cepas bacterianas para una posterior aplicación en la biorremediación de suelos.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gnanamanickam S. Rice and Its Importance to Human Life. En: Gnanamanickam S, editor. Biological Control of Rice Diseases. 1.<sup>a</sup> ed. Dallas: Springer; 2009. p. 1-11.
2. Akasaka H, Ueki A, Hanada S, Kamagata Y, Ueki K. *Propionicimonas paludicola* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, Gram-positive, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(6):1991-8.
3. Ji S, Gururani M, Chun S. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiol Res*. 2013;169(1):83-98.
4. Islam R, Trivedi P, Madhaiyan M, Seshadri S, Lee G, Yang J, et al. Isolation, enumeration, and characterization of diazotrophic bacteria from paddy soil sample under long-term fertilizer management experiment. *Biol Fertil Soils*. 2010;46(3):261-9.
5. Sriariyanun M, Tantayotai P, Yasurin P, Pornwongthong P, Cheenkachorn K. Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus* sp. isolated from rice paddy field soil. *Electron J Biotechnol*. 2016;19(1):23-8.
6. Roy P, Chatterjee S, Saha NC, Gantait VV. Characterization of a Starch Hydrolysing *Bacillus flexus* U8 Isolated from Rhizospheric Soil of the Paddy Plants. *Proc Natl Acad Sci India Sect B - Biol Sci*. 2020;90(5):1075-81.
7. Dirección General de Seguimiento y Evaluación de Política del Ministerio de Agricultura y Riego del Perú. Arroz 2001 - 2017 [Internet]. Lima; 2017. Disponible en: [http://siea.minagri.gob.pe/siea/sites/default/files/Informe-coyuntura-arroz-280818\\_0.pdf](http://siea.minagri.gob.pe/siea/sites/default/files/Informe-coyuntura-arroz-280818_0.pdf)
8. Trama FA. Efectos de plaguicidas sobre macroinvertebrados bentónicos y calidad del agua, en cultivos de arroz del Bajo Piura [tesis para optar al grado de Doctoris Philosophiae en Recursos Hídricos]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2014. 8, 10, 51 p.
9. Gutierrez JS. Manejo de plaguicidas químicos en el cultivo de *Oryzae sativa* «arroz» y su impacto en la calidad del agua y suelo en el fundo «Carlos

- Colchado» Guadalupe - Valle Jequetepeque-2005 [tesis para optar al grado de Maestro en Ciencias en Gestión Ambiental]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2005. 32 p.
10. Singh B, Kaur J, Singh K. Biodegradation of malathion by *Brevibacillus* sp. strain KB2 and *Bacillus cereus* strain PU. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012;28(3):1133-41.
  11. Xie Z, Xu B, Ding J, Liu L, Zhang X, Li J, et al. Heterologous expression and characterization of a malathion-hydrolyzing carboxylesterase from a thermophilic bacterium, *Alicyclobacillus tengchongensis*. *Biotechnol Lett.* 2013;35(8):1283-9.
  12. Dass A, Shekhawat K, Choudhary AK, Sepat S, Rathore SS, Mahajan G, et al. Weed management in rice using crop competition-a review. *Crop Prot.* 2017;95(1):45-52.
  13. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Notas Técnicas de la FAO sobre políticas comerciales No. 12. Arroz: ¿qué nos dicen los resultados del modelo analítico? [Internet]. Roma; 2005. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-j5931s.pdf>
  14. Ueki A, Akasaka H, Suzuki D, Ueki K. *Paludibacter propionicigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(1):39-44.
  15. Chen X, Zhang LM, Shen JP, Wei WX, He JZ. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy soil. *Biol Fertil Soils.* 2011;47(3):323-31.
  16. Dianou D, Miyaki T, Asakawa S, Morii H, Nagaoka K, Oyaizu H, et al. *Methanoculleus chikugoensis* sp. nov., a novel methanogenic archaeon isolated from paddy field soil in Japan, and DNA-DNA hybridization among *Methanoculleus* species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(5):1663-9.
  17. Qiu YL, Kuang XZ, Shi XS, Yuan XZ, Guo RB. *Paludibacter jiangxiensis* sp. nov., a strictly anaerobic, propionate-producing bacterium isolated from rice paddy field. *Arch Microbiol.* 2014;196(3):149-55.
  18. Zhang SY, Xiao W, Xia YS, Wang YX, Cui XL, Zhang NM. *Arenimonas taoyuanensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from rice-field soil in China.

- Antonie Van Leeuwenhoek. 2015;107(5):1181-7.
19. Choi GM, Im WT. *Paraburkholderia azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018;68(1):310-6.
  20. Kim SJ, Ahn JH, Weon HY, Hong SB, Seok SJ, Kwon SW. *Parasegetibacter terrae* sp. nov., isolated from paddy soil and emended description of the genus *Parasegetibacter*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(1):113-6.
  21. Liu B, Liu GH, Sengonca C, Schumann P, Wang JP, Zhu YJ, et al. *Bacillus praedii* sp. nov., isolated from purplish paddy soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(8):2823-8.
  22. Prakamhang J, Minamisawa K, Teamtai song K, Boonkerd N, Teaumroong N. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Appl Soil Ecol.* 2009;42(2):141-9.
  23. Elbeltagy A, Nishioka K, Suzuki H, Sato T, Sato YI, Morisaki H, et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci Plant Nutr.* 2000;46(3):617-29.
  24. Mano H, Morisaki H. Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environ.* 2008;23(2):109-17.
  25. Wang B, Wang A, Cao Z, Zhu G. Characterization of a novel highly thermostable esterase from the Gram-positive soil bacterium *Streptomyces lividans* TK64. *Biotechnol Appl Biochem.* 2016;63(3):334-43.
  26. Sood S, Sharma A, Sharma N, Kanwar S. Carboxylesterases: Sources, Characterization and Broader Applications. *Insights Enzym Res.* 2016;1(1):1-11.
  27. Sayali K, Sadichha P, Surekha S. Microbial Esterases: An overview. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2013;2(7):135-46.
  28. Fuciños P, González R, Atanes E, Fernández AB, Pérez-Guerra N, Pastrana L, et al. Lipases and Esterases from Extremophiles: Overview and Case Example of the Production and Purification of an Esterase from *Thermus thermophilus* HB27. En: Sandoval G, editor. *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 1.<sup>a</sup> ed. Guadalajara: Human Press; 2012. p. 239-66.
  29. Bornscheuer U. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and

- application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev.* 2002;26(1):73-81.
30. Tchigvintsev A, Tran H, Popovic A, Kovacic F, Brown G, Flick R, et al. The environment shapes microbial enzymes: five cold-active and salt-resistant carboxylesterases from marine metagenomes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(5):2165-78.
  31. López-López O, Cerdán ME, González Siso MI. New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics. *Curr Protein Pept Sci.* 2014;15(5):445-55.
  32. Hotta Y, Ezaki S, Atomi H, Imanaka T. Extremely Stable and Versatile Carboxylesterase from a Hyperthermophilic Archaeon. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(8):3925-31.
  33. Ikeda M, Clark DS. Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 1998;57(5):624-9.
  34. Ahmad A, Tsutsui A, Iijima S, Suzuki T, Shah A, Nakajima-Kambe T. Gene structure and comparative study of two different plastic-degrading esterases from *Roseateles depolymerans* strain TB-87. *Polym Degrad Stab.* 2019;164(1):109-17.
  35. Li X, Yu HY, Lin YF. Purification and characterization of an extracellular esterase from a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus* sp. strain LY5. *African J Biotechnol.* 2012;11(23):6327-34.
  36. Asoodeh A, Ghanbari T. Characterization of an extracellular thermophilic alkaline esterase produced by *Bacillus subtilis* DR8806. *J Mol Catal B Enzym.* 2013;85(86):49-55.
  37. Stetter KO. *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a New Taxon of Extremely Thermophilic Archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol.* 1988;10(2):172-3.
  38. Kim S, Lee W, Ryu Y. Cloning and characterization of thermostable esterase from *Archaeoglobus fulgidus*. *J Microbiol.* 2008;46(1):100-7.
  39. Park Y, Choi S, Lee H. A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1; purification, characterization, and expression. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760(5):820-8.
  40. Schottel JL, Hale V, Babcock MJ. Regulation and secretion of an extracellular

- esterase from *Streptomyces scabies*. *Gene*. 1992;115(2):27-31.
41. Pesaresi A, Devescovi G, Lamba D, Venturi V, Degrassi G. Isolation, characterization, and heterologous expression of a carboxylesterase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Curr Microbiol*. 2005;50(2):102-9.
  42. Khudary R Al, Venkatachalam R, Katzer M, Elleuche S, Antranikian G. A cold-adapted esterase of a novel marine isolate, *Pseudoalteromonas arctica*: Gene cloning, enzyme purification and characterization. *Extremophiles*. 2010;14(3):273-85.
  43. Wang G, Wang Q, Lin X, Ng TB, Yan R, Lin J, et al. A novel cold-adapted and highly salt-tolerant esterase from *Alkalibacterium* sp. SL3 from the sediment of a soda lake. *Sci Rep*. 2016;6(1):1-10.
  44. Ma B Di, Yu HL, Pan J, Liu JY, Ju X, Xu JH. A thermostable and organic-solvent tolerant esterase from *Pseudomonas putida* ECU1011: Catalytic properties and performance in kinetic resolution of  $\alpha$ -hydroxy acids. *Bioresour Technol*. 2013;133(1):354-60.
  45. Novototskaya K, Petrovskaya L, Yakimov S, Gilichinsky D. Cloning, purification, and characterization of a cold-adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5T from Siberian cryopeg. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012;82(2):367-75.
  46. Curci N, Strazzulli A, De Lise F, Iacono R, Maurelli L, Dal Piaz F, et al. Identification of a novel esterase from the thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Extremophiles*. 2019;23(4):407-19.
  47. Hitch T, Clavel T. A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes. *PeerJ*. 2019;7(7249):1-19.
  48. Jaeger K, Dijkstra B, Reetz M. Bacterial Biocatalyst: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu Rev Microbiol*. 1999;53(1):315-51.
  49. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Enzyme Nomenclature Database [Internet]. [citado 8 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://enzyme.expasy.org/>
  50. Kumar D, Kumar L, Nagar S, Raina C, Parshad R, Gupta V. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Arch Appl*

- Sci Res. 2012;4(4):1763-70.
51. Littlechild J. Enzymes from extreme environments and their industrial applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3(161):1-9.
  52. Romano D, Bonomi F, de Mattos MC, de Sousa Fonseca T, Ferreira de Oliveira M da C, Molinari F. Esterases as stereoselective biocatalysts. *Biotechnol Adv.* 2015;33(5):547-65.
  53. Liu P, Wang YF, Ewis HE, Abdelal AT, Lu CD, Harrison RW, et al. Covalent reaction intermediate revealed in crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est30. *J Mol Biol.* 2004;342(2):551-61.
  54. Stok JE, Goloshchapov A, Song C, Wheelock CE, Derbel MBH, Morisseau C, et al. Investigation of the role of a second conserved serine in carboxylesterases via site-directed mutagenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2004;430(2):247-55.
  55. Navarro-González I, Periago MJ. Enzimas Lipolíticas Bacterianas: Propiedades, Clasificación, Estructura, Aplicaciones Tecnológicas y Aspectos Legales. *An Vet Murcia.* 2012;28(1):45-65.
  56. Ben Ali Y, Verger R, Abousalham A. Lipases or Esterases: Does it really matter? Toward a New Bio-Physico-Chemical Classification. En: Sandoval G, editor. *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 1.<sup>a</sup> ed. Guadalajara: Human Press; 2012. p. 31-51.
  57. Yang Y, Ghatge S, Hur H-G. Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from thermoalkaliphilic bacterium *Bacillus thermocloaceae*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019;83(5):882-91.
  58. Quax WJ, Broekhuizen CP. Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1994;41(4):425-31.
  59. Li G, Wang K, Liu Y. Molecular cloning and characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase originating from the Metagenome. *Microb Cell Fact.* 2008;7(38):1-10.
  60. Chaudhary S, Sagar S, Kumar M, Sengar RS, Tomar A. The use of enzymes in food processing: A review. *South Asian J Food Technol Environ.* 2015;1(1):190-210.
  61. Abeijón Mukdsi MC, Falentin H, Maillard MB, Chuat V, Medina RB, Parayre

- S, et al. The Secreted Esterase of *Propionibacterium freudenreichii* Has a Major Role in Cheese Lipolysis. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(2):751-6.
62. Sharma T, Sharma A, Sharma S, Kanwar S. An overview on esterases: structure, classification, sources and their application. En: Rai V, editor. *Recent Advances in Biotechnology*. 2017.<sup>a</sup> ed. New Dehli: Shree Publishers & Distributors; 2017. p. 216-28.
  63. Bhardwaj H, Gupta R, Tiwari A. Microbial Population Associated With Plastic Degradation. *Open Access Sci Reports*. 2012;1(5):10-3.
  64. Mourey A, Kilbertus G. Simple Media Containing Stabilized Tributyrin for Demonstrating Lipolytic Bacteria in Foods and Soils. *J Appl Bacteriol*. 1976;40(1):47-51.
  65. Becerra Gutiérrez LK, Horna Acevedo MV. Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Sci Agropecu*. 2016;7(1):23-31.
  66. Mishra S, Behera N. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. *African J Biotechnol*. 2008;7(18):3326-31.
  67. Atlas R. *Handbook of Microbiological Media*. 4.<sup>a</sup> ed. Washington D.C.: CRC Press; 2010. 321, 731, 1386, 1575 p.
  68. Smale ST. B-Galactosidase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010;5(5):1-3.
  69. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45(4):493-6.
  70. Chávez E. Bacterias halófilas moderadas con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana - San Martín [tesis para optar al grado de magíster en Biotecnología]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
  71. Canales PE, Chávez-Hidalgo EL, Zavaleta AI. Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín. *Rev Colomb Biotecnol*. 2014;16(2):150-7.
  72. Ministerio de Agricultura y Riego del Perú. Calendario de Siembras y Cosechas [Internet]. 2020 [citado 16 de marzo de 2021]. Disponible en: <http://siea.minagri.gob.pe/portal/calendario/>
  73. Rodríguez DP. Potencial de rendimiento de líneas mutantes de Arroz (*Oryza sativa* L.) desarrolladas mediante aplicación de rayos gamma en condiciones

- del valle de Jequetepeque [tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2017. 8, 9 p.
74. Sanjinez F. Sustentabilidad del agroecosistema del cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) en Tumbes, Perú [tesis para optar al grado de Doctoris Philosophiae en Agricultura Sustentable]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2019. 17-23 p.
  75. Ding MJ, Shang NJ, Xiao ZX, Shao F, Liu L, Huang Y, et al. *Bacillus aciditolerans* sp. Nov., isolated from paddy soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019;69(4):1155-61.
  76. Sánchez Castelblanco EM, Heredia Martín JP, Buitrago Morales SM, Medina Rodríguez JP. Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Rev Colomb Biotecnol.* 2020;22(1):36-44.
  77. Punitha M, Rose JC. Biodegradation of Organophosphorous pesticide using immobilized esterase and toxicity assessment. *J Glob Biosci.* 2018;7(1):5331-41.
  78. Onwona-Kwakye M, Plants-Paris K, Keita K, Lee J, Van den Brink PJ, Hogarh JN, et al. Pesticides decrease bacterial diversity and abundance of irrigated rice fields. *Microorganisms.* 2020;8(3):318-31.
  79. Pailan S, Gupta D, Apte S, Krishnamurthi S, Saha P. Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhatai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2015;103(1):191-5.
  80. Zhang X, Zhang R, Gao J, Wang X, Fan F, Ma X, et al. Thirty-one years of rice-rice-green manure rotations shape the rhizosphere microbial community and enrich beneficial bacteria. *Soil Biol Biochem.* 2017;104(1):208-17.
  81. Aarab S, Ollero FJ, Megías M, Laglaoui A, Bakkali M, Arakrak A. Simultaneous P-Solubilizing and Biocontrol Activity of Rhizobacteria Isolated from Rice Rhizosphere Soil. En: Kumar V, Kumar M, Sharma S, Prasad R, editores. *Probiotics in Agroecosystem.* 1.<sup>a</sup> ed. Singapore: Springer; 2017. p. 207-205.
  82. Aarab S, Ollero F, Megías M, Laglaoui A, Bakkali M, Arakrak A. Isolation and screening of bacteria from rhizospheric soils of rice fields in Northwestern

- Morocco for different plant growth promotion (PGP) activities: An in vitro study. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2015;4(1):260-9.
83. Rekha K, Baskar B, Srinath S, Usha B. Plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus subtilis* RR4 isolated from rice rhizosphere induces malic acid biosynthesis in rice roots. *Can J Microbiol*. 2018;64(1):20-7.
  84. Gonçalves Pessoa RB, de Oliveira WF, Marques DSC, dos Santos Correia MT, de Carvalho EVMM, Barroso Coelho LCB. The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microb Pathog*. 2019;130(1):81-94.
  85. Mehnaz S, Mirza MS, Haurat J, Bally R, Normand P, Bano A, et al. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol*. 2001;47(2):110-7.
  86. Zhou GW, Yang XR, Su JQ, Zheng BX, Zhu YG. *Bacillus ferrooxidans* sp. nov., an iron(II)-oxidizing bacterium isolated from paddy soil. *J Microbiol*. 2018;56(7):472-7.
  87. Xie G, Cai M, Tao G, Steinberger Y. Cultivable heterotrophic N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze River Plain. *Biol Fertil Soils*. 2003;37(1):29-38.
  88. Chawngthu L, Hnamte R, Lalfakzuala R. Isolation and Characterization of Rhizospheric Phosphate Solubilizing Bacteria from Wetland Paddy Field of Mizoram, India. *Geomicrobiol J*. 2020;37(4):366-75.
  89. Sivasakthi S, Usharani G, Saranraj P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African J Agric Res*. 2014;9(16):1265-77.
  90. Kanjanamaneesathian M. *Bacillus* for Rice Cultivation in Thailand. En: Liong M-T, editor. *Beneficial Microorganisms in Agriculture, Aquaculture and Other Areas*. 1.<sup>a</sup> ed. Penang: Springer; 2015. p. 81-100.
  91. Wang C, Liu Z, Huang Y, Zhang Y, Wang X, Hu Z. Cadmium-resistant rhizobacterium *Bacillus cereus* M4 promotes the growth and reduces cadmium accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ Toxicol Pharmacol*. 2019;72(1):1-11.
  92. Chung E, Hossain M, Khan A, Kim K, Jeon C, Chung Y. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing

- activities in rice. *Plant Pathol J*. 2015;31(2):152-64.
93. Bao P, Xiao KQ, Wang HJ, Xu H, Xu PP, Jia Y, et al. Characterization and potential applications of a selenium nanoparticle producing and nitrate reducing bacterium *Bacillus oryzae* sp. nov. *Sci Rep*. 2016;6(5):1-10.
  94. Susilowati D, Sudiana I, Mubarik N, Suwanto A. Species and Functional Diversity of Rhizobacteria of Rice Plant in the Coastal Soils of Indonesia. *Indones J Agric Sci*. 2015;16(1):39-50.
  95. Dutta A, Ghosh S, Choudhury JD, Mahansaria R, Roy M, Ghosh AK, et al. Isolation of indigenous *Staphylococcus sciuri* from chromium-contaminated paddy field and its application for reduction of Cr(VI) in rice plants cultivated in pots. *Bioremediat J*. 2017;21(1):30-7.
  96. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(55):1-35.
  97. Atrouni A, Joly-Guillou M, Hamze M, Kempf M. Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* species. *Front Microbiol*. 2016;7(49):1-12.
  98. Choi J, Ko G, Jheong W, Huys G, Seifert H, Dijkshoorn L, et al. *Acinetobacter kookii* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(12):4402-6.
  99. Carr EL, Kämpfer P, Patel BKC, Gürtler V, Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(4):953-63.
  100. Choi JY, Kim Y, Ko EA, Park YK, Jheong WH, Ko GP, et al. *Acinetobacter* species isolates from a range of environments: Species survey and observations of antimicrobial resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74(2):177-80.
  101. Kim D, Baik KS, Kim MS, Park SC, Kim SS, Rhee MS, et al. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *J Microbiol*. 2008;46(4):396-401.
  102. Snellman EA, Colwell RR. *Acinetobacter* lipases: Molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2004;31(9):391-400.
  103. Jung J, Baek JH, Park W. Complete genome sequence of the diesel-

- degrading *Acinetobacter* sp. strain DR1. *J Bacteriol.* 2010;192(18):4794-5.
104. Kang YS, Jung J, Jeon CO, Park W. *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *J Microbiol.* 2011;49(1):29-34.
  105. Gopalakrishnan S, Humayun P, Kiran BK, Kannan IGK, Vidya MS, Deepthi K, et al. Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *World J Microbiol Biotechnol.* 2011;27(6):1313-21.
  106. Gandhi A, Muralidharan G. Assessment of zinc solubilizing potentiality of *Acinetobacter* sp. isolated from rice rhizosphere. *Eur J Soil Biol.* 2016;76(1):1-8.
  107. Hatayama K. *Comamonas humi* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(12):3976-82.
  108. Kämpfer P, Busse HJ, Baars S, Wilharm G, Glaeser SP. *Comamonas aquatilis* sp. nov., isolated from a garden pond. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018;68(4):1210-4.
  109. Sun LN, Zhang J, Chen Q, He J, Li QF, Li SP. *Comamonas jiangduensis* sp. nov., a biosurfactant-producing bacterium isolated from agricultural soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63(6):2168-73.
  110. Huang C, Wang H, Shi X, Wang Y, Li P, Yin H, et al. Two new selenite reducing bacterial isolates from paddy soil and the potential Se biofortification of paddy rice. *Ecotoxicology.* 2020;1(1):1-11.
  111. Yu XY, Li YF, Zheng JW, Li Y, Li L, He J, et al. *Comamonas zonglianii* sp. nov., isolated from phenol-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011;61(2):255-8.

## XI. ANEXOS

**Anexo 1.** Características fisiológicas de las bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja.

		Condiciones de crecimiento															
		Temperatura (°C)				pH								Salinidad (% p/v)			
		4	20	37	45	4	5	6	7	8	9	10	0.5	5	10	15	20
<b>Aislados bacterianos</b>	<b>MA1</b>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-
	<b>MA2</b>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>MA3</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	<b>MA4</b>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<b>MA5</b>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-
	<b>MA6</b>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<b>MA8</b>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-
	<b>MA9</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	<b>MA10</b>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<b>MA12</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(+) Presencia de crecimiento microbiano (+/-) Débil crecimiento microbiano (-) Ausencia de crecimiento microbiano

**Anexo 2.** Capacidad hidrolítica de las bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja.

Cepas bacterianas	Macromoléculas							
	Gelatina	Skim Milk	Caseína	Aceite de oliva	Almidón	CMC	Pectina	ADN
MA1	-	-	-	+	-	-	-	-
MA2	+	+	-	+	-	-	-	-
MA3	+	+	+	+	+	+	+	-
MA4	+	-	-	+	+	-	-	-
MA5	-	-	-	+	-	-	-	-
MA6	+	+	+	+	-	-	-	+
MA8	-	-	-	+	-	-	-	-
MA9	+	+	+	+	+	+	+	-
MA10	+	+	+	+	-	-	-	+
MA12	+	+	+	+	+	+	+	-

(+) Positivo para hidrólisis de la macromolécula (-) Negativo para la hidrólisis de la macromolécula

**Anexo 3.** Metabolismo de azúcares de las bacterias productoras de esterasas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja.

Azúcares	Cepas bacterianas									
	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5	MA6	MA8	MA9	MA10	MA12
<b>Arabinosa</b>	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	F / NG	NF / NG	F / NG	F / NG	NF / NG
<b>Celobiosa</b>	NF / NG	NF / NG	F / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	F / NG	NF / NG	F / NG
<b>Fructuosa</b>	NF / NG	F / NG	F / NG	NF / NG	NF / NG	F / G	NF / NG	F / NG	F / G	F / NG
<b>Galactosa</b>	NF / NG	F / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	F / NG	NF / NG	NF / NG	F / NG	NF / NG
<b>Glicerol</b>	NF / NG	NF / NG	F / NG	NF / NG	NF / NG	F / NG	NF / NG	F / NG	F / NG	F / NG
<b>Glucosa</b>	NF / NG	F / NG	F / NG	NF / NG	NF / NG	F / G	NF / NG	F / NG	F / G	F / NG
<b>Maltosa</b>	NF / NG	F / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	F / G	NF / NG	F / NG	F / G	F / NG
<b>Manitol</b>	NF / NG	NF / NG	F / NG	NF / NG	NF / NG	F / G	NF / NG	NF / NG	F / G	F / NG
<b>Manosa</b>	NF / NG	NF / NG	F / NG	NF / NG	NF / NG	F / G	NF / NG	F / NG	F / G	F / NG
<b>Sacarosa</b>	NF / NG	F / NG	F / NG	NF / NG	NF / NG	F / G	NF / NG	F / NG	F / G	F / NG
<b>Sorbitol</b>	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG
<b>Xilosa</b>	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG	NF / NG

(NF) Negativo para la fermentación del azúcar (NG) Negativo para la producción de gas (F) Positivo para la fermentación del azúcar (G) Positivo para la producción de gas

**Anexo 4.** Sensibilidad antimicrobiana de las bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja.

Antimicrobiano	Cepas bacterianas									
	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5	MA6	MA8	MA9	MA10	MA12
<b>Ampicilina AMP10</b>	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S
<b>Cefoxitina FOX30</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Clindamicina DA2</b>	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S
<b>Cloranfenicol C30</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Eritromicina E15</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Estreptomina S10</b>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<b>Gentamicina CN10</b>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<b>Kanamicina K30</b>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Novobiocina NV5</b>	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
<b>Penicilina G P10</b>	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S
<b>Tobramicina TOB10</b>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<b>Vancomicina VA30</b>	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S

(R) Resistente (S) Sensible

**Anexo 5.** Secuencias parciales de los genes ribosómicos 16S de las bacterias productoras de esterazas aisladas de suelos de cultivos de arroz de Rioja.

**MA1:**

ATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC  
CCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTTCGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGC  
GCCACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTA  
ATCCTGTTTGTCCCCATGCTTTTCGTACCTCAGCGTCAGTATTAGGCCAGATGGCTGCCTTCGCCATCGG  
TATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACACCTGGAATTCTACCATCCTCTCCCATACTCTAGCTG  
ACCAGTATCGAATGCAATTCCTAAGTTAAGCTCAGGGATTTACATCCGACTTAATCAGCCGCCTACGCA  
CGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTAACGCTCGCACCCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTA  
GCCGGTGCTTATTCTGCGAGTAACGTCCACTCATCAAGGGTATTAACCTAAGAGCCTCCTCCTCGTTA  
AAGTGCTTTACAACCAAAAGGCCCTTCTCACACACGCGCATGGCTGGATCAGGCTTCGCCATTGTCC  
AATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCGGATCATCCT  
CTCA

**MA2:**

ATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTC  
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTTCGCGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC  
AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
AATCCTGTTTGATCCCCACGCTTTTCGCACATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTG  
GTGTTCTCCATATCTCTGCGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCACCTTCTCTTCTGCACTCAAGTT  
TTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTACGC  
GCGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT  
AGCCGTGGCTTTCTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCATAGTTACTTACACATTTGTTCTTCCCTAATAAC  
AGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTACAGGCTTTCGCCATTGCGGA  
AGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCCCTC  
TCA

**MA3:**

ATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC  
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTTCGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC  
AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
AATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTG  
GTGTTCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTTCTGCACTCAAGTT  
CCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAAGAAACCGCCTGGG  
AGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT  
TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTCTTCCCTAAC  
AACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTACAGCTTTCGTCCATTGC  
GGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCC  
CTCTCA

**MA4:**

ATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTC  
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCCGTA CCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTC  
GTTACTGAGTCAGTTAAGACCCAACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT  
CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTGCAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGT  
GTTCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCCATCCCCCTCTGCCGCACTCTAGCCT  
TGCAGTCACAATGGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACCACTGTCTTACAAAACCGCCTGCGC  
ACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT  
AGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATGACCCGGGGATATTAGCCCCAGGCTTTTCGTTCCGTACAA  
AAGCAGTTTACAACCCGAGGGCCTTCATCCTGCACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTC  
CAAAATTCCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCGTCC  
TCTCA

**MA5:**

ATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC  
CCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTGCGACCGTA CCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGC  
GCCACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTA  
ATCCTGTTTGCTCCCCATGCTTTCGTACCTCAGCGTCAGTATTAGGCCAGATGGCTGCCTTCGCCATCGG  
TATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCATCCTCTCCATACTCTAGCTG  
ACCAGTATCGAATGCAATTCCTAAGTTAAGCTCAGGGATTTACATCCGACTTAATCAGCCGCCTACGCA  
CGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTAACGCTCGCACCCCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTA  
GCCGGTGCTTATTCTGCGAGTAACGTCCACTCATCAAGGGTATTAACCTTAAGAGCCTCCTCCTCGCTTA  
AAGTGCTTTACAACCAAAAGGCCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTCCGCCATTGTCC  
AATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAAGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCGGATCATCCT  
CTCA

**MA6:**

ATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC  
CCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA CCCCAGGCGGTGATTTAACGCGTTAGCTC  
CGGAAGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACC  
GGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTTACAAGACTCTAGC  
TGGACAGTTTTAAATGCAATTCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTAATTATCCAACCGCCTGCG  
TGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAG  
TTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTACAGTTGATACGTATTAGGCATCAACCTTTCCTCCTCGCT  
GAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTTCCCCATTGT  
GCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCTGTGTGGCTGATCATCC  
TCTCA

**MA8:**

ATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC  
CCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGC  
GCCACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTA  
ATCCTGTTTGCTCCCCATGCTTTCGTACCTCAGCGTCAGTATTAGGCCAGATGGCTGCCTTCGCCATCGG  
TATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCATCCTCTCCATACTCTAGCTG  
ACCAGTATCGAATGCAATTCCTAAGTTAAGCTCAGGGATTTACATCCGACTTAATCAGCCGCCTACGCA  
CGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTAACGCTCGCACCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTA  
GCCGGTGCTTATTCTGCGAGTAACGTCCACTCATCAAGGGTATTAACCTAAGAGCCTCCTCCTCGTTA  
AAGTGCTTTACAACCAAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTCCGCCATTGTCC  
AATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAAGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCAGATCATCCTC  
TCA

**MA9:**

ATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC  
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC  
AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
AATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCCTTCGCCACTG  
GTGTTCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTT  
CCCCAGTTTTCCAATGACCCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCG  
AGCCCTTTACGCCAATAATTCCAGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT  
TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTGAAACGGTACTTGTCTTCCCTAAC  
AACACAGCTTTACGATCCAAAGACCTTCATCACTCAAGCGCGTTGCTCCGTCAGACTTTTCGTCCATTGC  
GGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCCATCACC  
CTCTCA

**MA10:**

ATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC  
CCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGATTTAACGCGTTAGCTC  
CGGAAGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTGTCCAGGGGGCCGCCCTTCGCCACC  
GGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGC  
TGGACAGTTTTAAATGCAATTCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTAATTATCCAACCGCCTGCG  
TGCGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAG  
TTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTACAGTTGATACGTATTAGGCATCAACCTTTCTCCTCGCT  
GAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTTCCCCATTGT  
GCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCTGTGTGGCTGATCATCC  
TCTCA

**MA12:**

ATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC  
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC  
AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
AATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTG  
GTGTTCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTTCTGCACTCAAGTT  
CCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCG  
AGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT  
TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTTGAACGGTACTTGTTCTTCCCTAAC  
AACAGAGCTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGC  
GGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACC  
CTCTCA