

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Bacterias queratinofílicas en los vertederos clandestinos de plumas, Ayacucho del 2021

Tesis para optar el título profesional de
Bióloga, Especialidad: Microbiología

Presentado por:

Bach. Liz Annelly Coras Cisneros

Asesor:

Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez

Ayacucho - Perú

2024

A mi madre y hermanos que me han apoyado
en todos los aspectos para culminar con esta
investigación de tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por constituir el Alma Máter de mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela Profesional de Biología, a la Especialidad de Microbiología y docentes quienes contribuyeron en mi formación profesional.

A mi asesor Dr. Chuchón Martínez, Saúl Alonso, por la orientación académica en el presente trabajo de investigación, por su valioso apoyo y dedicación prestada.

Al Mg. Gastelú Quispe, Rilder Nemesio, por el apoyo académico en el presente trabajo de investigación.

Al Blgo. Delgadillo Coronado, Pedro Mauricio, por la constancia y dedicación que tuvo conmigo para realizar el presente trabajo de investigación.

A mi madre Cisneros Cárdenas, Valentina, hermanos y amistades por el apoyo incondicional, para poder finalizar el presente trabajo de tesis, gracias a ellos superé todas las dificultades que se presentaron, personas importantes para mi formación personal y académica.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.1.1. Internacional	3
2.1.2. Nacional	5
2.2. Marco conceptual	5
2.2.1. Proteína	5
2.2.2. Aminoácidos	5
2.2.3. Grupo amino libre	5
2.2.4. Queratinas	5
2.2.5. Enzimas	6
2.2.6. Proteasas	6
2.2.7. Queratinasas	6
2.2.8. Bacterias queratinofílicas	6
2.2.9. Enlace disulfuro	6
2.2.10. Vertedero clandestino	6
2.2.11. Absorbancia	7
2.3. Bases teóricos	7
2.3.1. Plumas de pollo	7
2.3.2. Composición estructural de las plumas	7
2.3.3. Composición bioquímica de las plumas	8
2.3.4. Microorganismos bacterianos frecuentes que presentan capacidad queratinofílica	8
2.3.5. Proceso degradativo de la queratina por bacterias	11
2.3.6. Uso potencial de plumas de aves	12
2.3.7. Técnica de ninhidrina	12

III.	MATERIALES Y METODOS	13
3.1.	Ubicación de la zona de estudio	13
3.1.1.	Ubicación política y geográfica del vertedero clandestino	13
3.1.2.	Ubicación política y geográfica del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga	13
3.2.	Unidad de análisis	14
3.3.	Metodología y recolección de datos	14
3.3.1.	Obtención de muestra biológica	14
3.3.2.	Acondicionamiento de las muestras recolectadas de suelo y plumas	14
3.3.3.	Proceso de adaptación de la microbiota de suelo y plumas (Primera etapa)	14
3.3.4.	Proceso de adaptación de bacterias a sustrato de plumas (Segunda etapa)	15
3.3.5.	Aislamiento de bacterias de las plumas y suelo muestreadas en el vertedero informal del CC.PP. de Condoray	16
3.3.6.	Evaluación de la degradación de la queratina de plumas de aves	16
3.3.7.	Estandarización de la curva patrón para la determinación de la biomasa microbiana	17
3.3.8.	Estandarización de la curva patrón para la determinación de aminoácidos	17
3.3.9.	Determinación de la biomasa microbiana durante la prueba de degradabilidad de queratina de plumas de ave	18
3.3.10.	Determinación de grupos aminos libres (GAL) durante la prueba de degradabilidad de la queratina de plumas de ave	19
3.3.11.	Identificación de cepas degradadoras de queratina	19
3.4.	Análisis de datos	20
IV.	RESULTADOS	21
V.	DISCUSIÓN	36
VI.	CONCLUSIONES	41
VII.	RECOMENDACIONES	42
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	ANEXOS	46

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Bacterias queratinofílicas.	10
Tabla 2. Coordenadas de ubicación del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray.	13
Tabla 3. Ubicación del Laboratorio de Microbiología Ambiental.	14
Tabla 4. Concentración de los suplementos y otros en el medio MBS para la adaptación de microorganismos provenientes de las plumas y suelo.	15
Tabla 5. Crecimiento de colonias bacterianas en medio de agar nutritivo y agar pluma ave, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	22
Tabla 6. Características culturales y test de Gram de las 4 colonias bacterianas queratinofílicas aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	23
Tabla 7. Estandarización de la curva patrón de glicina para la determinación de la concentración de aminoácidos de la degradación de queratina por las cuatro cepas queratinofílicas aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	24
Tabla 8. Estandarización de la curva patrón para la determinación de biomasa de las cuatro cepas queratinofílicas en 5 días de incubación, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	29
Tabla 9. Identificación molecular de 2 cepas (C1.S y C6.1) queratinofílicas en el laboratorio de “Umbrella Genomics Company”. Lima – 2023.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Anatomía de la pluma.	7
Figura 2. Representación esquemática de la degradación de queratina por parte de Queratinasas y Proteasas convencionales.	11
Figura 3. Curva patrón de la glicina para la determinación de la concentración de aminoácidos (mg/mL) de la degradación de la queratina por las cuatro cepas queratinofílicas aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	25
Figura 4. Valores promedios de la concentración de aminoácidos (mg/mL) en medio líquido durante 35 días de incubación por acción de cuatro cepas queratinofílicas, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	26
Figura 5. Valores promedios de las concentraciones de aminoácidos (mg/mL) en medio líquido durante 35 días de incubación por acción de cuatro cepas queratinofílicas, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	27
Figura 6. Valores promedios de las concentraciones finales de aminoácidos (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas en el día 35, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	28
Figura 7. Curva patrón de las biomasas (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas en 5 días de incubación, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	30
Figura 8. Valores promedios de los incrementos de biomasa de las cuatro cepas queratinofílicas en 35 días de incubación, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	31
Figura 9. Valores promedios de los incrementos de biomasa de las cuatro cepas queratinofílicas en 35 días de incubación, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	32
Figura 10. Valores promedios de las concentraciones finales de biomasa (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas en el día 35, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	33
Figura 11. Porcentaje promedio de los incrementos (%) de biomasa de las cuatro cepas queratinofílicas en 35 días, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	34

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Fotografía geográfica de la zona de muestreo en el CC.PP. de Condoray, tomadas con el programa Google earth. Ayacucho – 2023.	47
Anexo 2. Toma de muestras de suelo y plumas del vertedero clandestino en el CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	48
Anexo 3. Composición del medio Bushnell Hass. Ayacucho – 2023.	49
Anexo 4. Matrices con medio Bushnell Hass y muestras de suelo y pluma del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.	50
Anexo 5. Rotación de los matraces con medio Bushnell Hass y muestras de suelo y pluma a 100 rpm por 7 días. Ayacucho – 2023.	51
Anexo 6. Composición del medio salino basal (MBS). Ayacucho – 2023.	52
Anexo 7. Fotografías de la morfología de las colonias y observaciones microscópicas de <i>Galactomyces candidum</i> aisladas de la chicha de molle artesanal elaborada en la provincia de Huamanga, Ayacucho 2022.	53
Anexo 8. Crecimiento de bacterias en medio de agar nutritivo (AN) sembrado por agotamiento en superficie. Ayacucho – 2023.	54
Anexo 9. Crecimiento de cuatro cepas (C8.1, C1.1, C6.1 y C1.S) bacterianas en medio de agar pluma ave (APA). Ayacucho – 2023.	55
Anexo 10. Filtración de los tratamientos en el equipo de succión con bomba al vacío. Ayacucho – 2023.	56
Anexo 11. Datos de la medición de absorbancias (Abs) de biomásas de las cuatro cepas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.	57
Anexo 12. Datos de medición de las concentraciones de biomásas (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.	58
Anexo 13. Datos de la medición de absorbancias (Abs) de grupos aminos libres (GAL) producidas por las cuatro cepas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.	59
Anexo 14. Datos de medición de las concentraciones de aminoácidos (mg/mL) producidas por las cuatro cepas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.	60
Anexo 15. Prueba de análisis de varianza (ANOVA) de la biomasa (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas por cada tiempo de incubación. Ayacucho – 2023.	61

Anexo 16. Prueba de Tukey de la biomasa (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas por cada tiempo de incubación. Ayacucho – 2023.	62
Anexo 17. Prueba de análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de aminoácidos (mg/mL) de cuatro cepas queratinofílicas en el día 35 de incubación. Ayacucho – 2023.	63
Anexo 18. Procedimiento de la identificación molecular de las cepas C1.S y C6.1 mediante la técnica de PCR y secuenciación genómica. Lima – 2023.	64
Anexo 19. Análisis de secuenciación genómica de Oxford Nanopore Technologies de la cepa C1.S, realizada con el programa Medaka para corrección de bases. Ayacucho – 2023.	65
Anexo 20. Análisis de secuenciación genómica de Oxford Nanopore Technologies de la cepa C6.1, realizada con el programa Medaka para corrección de bases. Ayacucho – 2023.	66
Anexo 21. Flujograma del procedimiento para la determinación de la concentración de Biomasa (mg/mL) de las cepas bacterianas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.	67
Anexo 22. Flujograma del procedimiento para la determinación de la concentración de aminoácidos (mg/mL) de las cepas bacterianas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.	68
Anexo 23. Matriz de consistencia.	69

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo identificar bacterias con capacidad queratinofílica aisladas del vertedero clandestino de plumas de aves de corral de las granjas avícolas, del CC.PP. de Condoray en el distrito de Tambillo ubicado a 21 kilómetros de la provincia de Huamanga, región de Ayacucho en el año 2023. Se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. El estudio fue del tipo descriptivo por un método no probabilístico a conveniencia. Se recolectó 500 g de suelo y dos cúmulos de plumas de 155 y 200 g respectivamente, del vertedero clandestino, la muestra de suelo se tamizó con un cernidor de malla metálica con una abertura de 2 x 2 mm, los cúmulos se trituraron en un mortero. El aislamiento se realizó en los medios de cultivo de agar nutritivo y agar pluma ave, para aislar bacterias con capacidad degradadora de queratina, posteriormente, se realizó la técnica de ninhidrina para la determinación de grupos aminos libres a través de la coloración y la medición de absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm para la determinación de las concentraciones de aminoácidos, obteniendo así en la cepa C8.1 una concentración de 0,00182 mg/mL, la cepa C1.1 con 0,00186 mg/mL, la cepa C6.1 con 0,00189 mg/mL y la cepa C1.S de 0,00194 mg/mL presentando todas una coloración ligeramente de azul - púrpura, donde no se obtuvo una diferencia significativa con el análisis estadístico de ANOVA. Para la identificación del género y especie de las bacterias, se realizó por la molecular en el laboratorio de la empresa "Umbrella Genomycs Company" donde se extrajo, cuantificó, amplificó, reveló y secuenció el ADN en el genoma 16S, identificando a las cepas C6.1 y C1.S como género *Bacillus* y ambas de la especie *B. sanguini*. Se concluyó que las cepas bacterianas aisladas del vertedero clandestino presentan capacidades queratinofílicas, es decir degradan la queratina que se encuentran en las plumas de aves de corral desechadas de la ciudad de Ayacucho.

Palabras claves: queratinofílica, APA, degradación de queratina, GAL, vertedero clandestino de plumas.

I. INTRODUCCIÓN

En todo el mundo, las industrias procesadoras de carne de pollo desechan gran cantidad de residuos de pluma que afectan al medio ambiente, debido a que no cuenta con un valor económico utilizable. Los adelantos tecnológicos favorecen la intensificación de la producción de las aves de corral en el todo el mundo, que hoy en día se puede ver la deficiencia en la falta de regulación que permite que los residuos que contienen importantes cantidades de plumas tengan como destino final los cuerpos hídricos y botaderos informales, convirtiéndose en agentes de contaminación ambiental (Rofner, 2019).

Además, las plumas que son desechadas en algunos casos son destinadas a la elaboración de harinas para ser utilizadas como suplemento de alimentos concentrados para las aves de corral y otros animales, debido a que presentan alto contenido proteico (95% de peso seco), principalmente de queratina (85%) la cual es costoso por lo que no es conveniente utilizar la pluma de esta manera. La queratina presenta gran contenido de enlaces disulfuro lo que la convierte en una proteína muy resistente a la degradación, por ello se vio que algunos microorganismos cuentan con esta capacidad de degradar (Juárez, 2012).

El alto consumo de carne de pollo en la población de Ayacucho, produce la alta demanda de pollo, por esta misma razón también se da grandes cantidades de desechos como víseras, picos, garras y plumas siendo esta última la más abundante en vertederos informales y/o clandestinos convirtiéndose en un problema de contaminación, por ello, hoy en día se conoce la gran capacidad degradadora de plumas por bacterias conocidos como queratinofílicos que presentan enzimas como la queratinasas y enzimas proteolíticas (Mesias et al., 2019).

Los objetivos que se trazaron fueron:

Objetivo general

Identificar bacterias con capacidad queratinofílica aisladas del vertedero clandestino de plumas de aves de corral de granjas avícolas, ubicado en el CC.PP. de Condoray, Ayacucho en el año 2023.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el crecimiento de bacterias con capacidad queratinofílica en agar pluma ave (APA), aisladas del vertedero clandestino de plumas de aves de corral de granjas avícolas, ubicado en el CC.PP. de Condoray, Ayacucho en el año 2023.
2. Estimar la capacidad degradadora de las cepas bacterianas con la técnica de ninhidrina a través de la medición de absorbancia, aisladas del vertedero clandestino de plumas de aves de corral de granjas avícolas, ubicado en el CC.PP. de Condoray, Ayacucho en el año 2023.
3. Identificar hasta nivel de género y especie las cepas bacterianas con capacidad queratinofílica aisladas del vertedero clandestino de plumas de aves de corral de granjas avícolas, ubicado en el CC.PP. de Condoray, Ayacucho en el año 2023.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Internacional

Piñero et al. (2000), en el artículo publicado de “Aislamiento y caracterización de una cepa de *Bacillus spp*, degradadora de plumas de aves de corral”, realizado en Venezuela, mencionan que el aislamiento de diferentes microorganismos queratinofílicos se da a través de la recolección de medios donde se encuentran como suelo y pluma teniendo como única fuente de energía y carbono a las mismas plumas con la única finalidad de favorecer el crecimiento y desarrollo de microorganismos con la capacidad de degradar queratina en condiciones ambientales para el crecimiento y aislamiento de estos microorganismos queratinofílicos.

Riffel y Brandelli (2006), en el informe de investigación titulado “Bacterias queratinolíticas aisladas de desechos de plumas”, realizado en Sao Paulo – Brasil, las plumas de pollo al igual que el suelo, presentan microorganismos con gran actividad queratinofílica donde se logró caracterizar cuatro cepas de bacterias dentro de los cuales 3 géneros fueron Gram negativos (*Burkholderia*, *Chryseobacterium* y *Pseudomonas*) y 1 género de *Microbacterium*, utilizando un medio sólido de harina de pluma como fuente de energía y carbono, además que se utilizó plumas crudas, uña de pollo, pelo y lana. Demostrando la actividad queratinolítica parcial o complemente del sustrato.

Juárez (2012), realizó una tesis basada en la “Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”, realizado en México donde se aislaron 28 cepas a partir de los suelos de aves avícolas, el cual se identificó bacterias del género *Bacillus*, con características culturales variables como colonias circulares e irregulares, elevación plana, convexa y umbilicada; bordes regulares, irregulares, onduladas, dentados y lisos; con texturas rugosas y

cremosas; de coloración café claro, café oscuro, gris, beige y blanquecino translúcido; donde se determinó la capacidad degradadora de pluma de ave mediante la evaluación cualitativa de grupos aminos libres (GAL) presentes en el medio de fermentación a través de la medición de absorbancia (Abs) por espectrofotometría. Las cepas aisladas presentaron actividad queratinolíticas de acuerdo a la cantidad de absorbancia obtenida y además se identificó molecularmente dos cepas como *B. subtilis*, y *B. firmus*.

Espino et al. (2019), realizaron el estudio de bacterias degradadoras de queratina, titulado “Determinación de la actividad queratinolítica en la degradación de plumas de pollo” de la Universidad Tecnológica de Tecámac en México en el cual se muestra el aislamiento de *Alcaligenes faecalis* y *Bacillus subtilis* de las plumas de pollo. También, se cuantificó la actividad queratinolítica de las bacterias. El proceso de degradación se realizó con plumas enteras y trituradas. El crecimiento de las bacterias y la degradación de las plumas se determinaron a través de la medición de la absorbancia por espectrofotometría de luz visible a 620 nm y se confirmó por microscopía electrónica de barrido. Se logró mantener la actividad degradadora de las bacterias en agar con harina de pluma para todos los experimentos. Las dos bacterias degradaron totalmente las plumas enteras en 31 días en un medio líquido. Posteriormente, utilizaron como unidad de medida a la actividad enzimática (U) que se mantuvo constante en promedios de 201,33 U/mL y 182,33 U/mL para *A. faecalis* y *B. subtilis* respectivamente. La bacteria que logró una máxima actividad queratinolítica con plumas enteras fue *A. faecalis* a diferencia de *B. subtilis* con una máxima actividad de 201 U/mL.

Montes (2020), en su tesis de maestría titulado “Caracterización bioquímica de la proteasa producida por *Bacillus licheniformis* LB04”, realizado en la Universidad Autónoma de Nuevo León en México, utilizó esta bacteria con grandes capacidades queratinolíticas para determinar las características de la actividad enzimática en la degradación de la proteína de la queratina, quien usó un medio salino basal (MBS) únicamente para evitar interferencias en la lectura con el espectrofotómetro.

Loja (2015), en su trabajo titulado “Obtención de queratinas a partir de plumas de pollo, utilizando queratinasas producidas por *Bacillus ssp*”, realizado en Ecuador logró aislar a una bacteria del género *Bacillus* de las plumas de pollo sometidos a la fermentación de grupos aminos libres (GAL) en un Medio Salino Basal suplementado con plumas de pollo, logrando una degradación

hidrolítica de 9.4% de la pluma entera en 24 horas, concluyendo el uso del *Bacillus* como productor de enzimas proteolíticas.

Zorro y Catalina (2019), en el trabajo de investigación titulado “Evaluación de diferentes cepas queratinolíticas en la hidrólisis de plumas de pollo”, realizado en Colombia, identificaron tres cepas bacterianas *B. circulans*, *B. subtilis* y *Microbacterium sp.*, Gram positivas con actividad enzimática que fueron aisladas de las plumas de pollo y presentaron capacidad degradativa de la queratina de las plumas de aves de corral.

2.1.2. Nacional

Cuti y Vargas (2023), además, en el trabajo de investigación titulado “Tratamiento de residuos orgánicos (plumas) generados en centros de faenamiento avícola a partir de compostaje optimizado con bacterias queratinolíticas, Arequipa 2020”, lograron aislar bacterias queratinolíticas de muestras de suelo en granjas avícolas, e identificaron el género *Bacillus* con pruebas bioquímicas y tinción de Gram sometiéndolo a diferentes tratamientos para demostrar la capacidad de degradar queratina de esta bacteria.

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Proteína

Las proteínas son macromoléculas formados por cadenas de aminoácidos unida por enlaces peptídicos, que contienen grupos funcionales (grupos amino, nitrógeno, oxígeno, carbono, hidrógeno, alcoholes y ácidos carboxílicos) en sistemas vivos y esenciales en distintos procesos biológicos, funcionando como catalizadores, transportadoras, estructurales, reguladores, defensa y de almacenamiento para otras moléculas (Valencia, 2018).

2.2.2. Aminoácidos

Son moléculas orgánicas que contienen un grupo amino, ácido carboxílico, hidrógeno y un grupo R. unidad básica que forma a la proteína, además participan en funciones celulares (Universidad Nacional Autónoma de México, 2016).

2.2.3. Grupo amino libre

Es el radical monovalente formado por un átomo de nitrógeno y dos átomos de hidrógeno que constituyen el grupo funcional de los aminoácidos y sus derivados (Real Academia Española, 2023).

2.2.4. Queratinas

Las queratinas son proteínas estructurales, fibrosas e insolubles encontradas principalmente en vertebrados. Son los principales componentes de

la piel y sus apéndices (pelos, plumas, uñas, cuernos, pezuñas y lana) (Abril, 2020). Las características principales son su gran estabilidad y resistencia a la degradación por parte de proteasas comunes debido a su empaquetamiento compacto y a la presencia de puentes disulfuro (Cavello, 2013).

2.2.5. Enzimas

Las enzimas son sustancias de naturaleza proteíca, los cuales manipulan ciertas reacciones que ocurren dentro de las células. Estas pueden actuar dentro o fuera del organismo; sin embargo, actúan sobre determinada sustancia, es decir son específicas. Su función principal es catalizar y también transformar un tipo de energía en otra (Valencia, 2018).

2.2.6. Proteasas

Las enzimas proteolíticas son un grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos en solución acuosa través de la adición de agua entre los enlaces peptídicos. Pertenecen al grupo de las hidrolasas y son constituyentes esenciales de todas las formas de vida en la Tierra, incluyendo procariotas, hongos, plantas y animales (Montes, 2020).

2.2.7. Queratinasas

Las queratinasas son una clase particular de proteasas que presentan la capacidad de degradar la queratina. Las queratinasas presentan una amplia especificidad de sustratos y son activas frente a sustratos proteicos solubles (caseína, gelatina, seroalbúmina bovina y hemoglobina) e insolubles (plumas, lana, seda, extracto corneo, pelos, uñas, colágeno y elastina) (Cavello, 2013).

2.2.8. Bacterias queratinofílicas

Son microorganismos que muestran una afinidad y tropismo hacia la queratina, que forma parte de la nutrición alterna de esta bacteria cuando su primera fuente de carbono y energía es agotada (Riffel y Brandelli, 2006).

2.2.9. Enlace disulfuro

Los enlaces disulfuro o también llamados puentes disulfuros (S-S) son enlaces covalentes, que se forman cuando un grupo sulfhidrilo (-SH), presente en el aminoácido cisteína, pierde el hidrógeno (H), gracias a la presencia de oxígeno, dejando libre los azufres (S), provocando la unión entre los mismos. La unión de este enlace S-S, junto con la cisteína, dan paso a la formación de cistina (Valencia, 2018).

2.2.10. Vertedero clandestino

Son aquellos lugares donde la basura es desechada, estos pueden ser

oficiales o clandestinos esta última es elegido por las personas sin tener en consideración los problemas ambientales que pueden generar como contaminación, enfermedades y otros problemas (Vocero, 2023).

2.2.11. Absorbancia

Conocida también como densidad óptica (D.O), a la cantidad de luz absorbida por una determinada solución. La transmitancia es la cantidad de luz que pasa a través de la misma solución, ambas unidades se leen en una longitud de onda determinada (Molecular, 2023).

2.3. Fundamento teórico

2.3.1. Plumas de pollo

Las plumas son estructuras proteicas queratinosas de la piel de las aves, fundamentales en el vuelo aviar, pues forman la superficie sustentadora del ala. El conjunto de todas las plumas de un ave recibe el nombre de plumaje, y forma una capa densa, aislante, que protege al animal frente al agua y el frío (Loja, 2015).

2.3.2. Composición estructural de las plumas

La pluma comprende de un eje central llamado raquis, la cual permite rigidez a la estructura. La fracción del raquis que se encuentra insertada a la piel del ave se le denomina cálamo, aquella, forma un hueso por la falta de vasos sanguíneos una vez que la pluma deja de crecer, a dicho hueso se lo nombra obliquo inferior (Valencia, 2018).

El raquis tiene dos márgenes donde crece el vexilo, el cual conforma la parte visible de la pluma, esta a su vez se encuentra formada por barbillas que parten en dos lados opuestos del raquis, formando una lámina (Valencia, 2018).

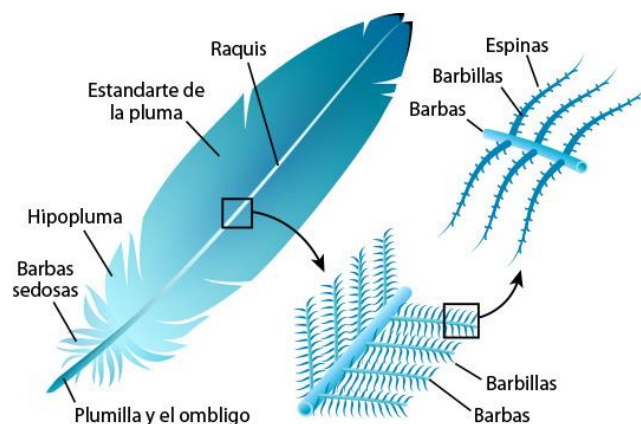


Figura 1. Anatomía de la pluma.

Fuente: (Kazilek, 2017).

2.3.3. Composición bioquímica de las plumas

Las plumas presentan 83 % de proteínas y de esta la queratina representa del 85 al 90 % del total de la proteína presente en las plumas. La queratina es una proteína estructural fibrosa e insoluble y difícil de digerir por humanos y animales, esta proteína es resistente a la degradación por enzimas proteolíticas comunes como la tripsina, la pepsina y la papaína debido a la composición y conformación molecular (Rofner, 2019).

Está compuesta por una gran variedad de aminoácidos (Cisteína, Histidina, Arginina, Asparagina, Alanina, Isoleucina, Glicina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Prolina, Treonina, Triptofano, Serina y Valina) encontrándose en mayor abundancia la Cisteína, además, la Cisteína presente forma enlaces disulfuro del dímero “cistina”, estos enlaces se entrecruzan estableciendo una red tridimensional de cadenas polipeptídicas y en conjunto con los residuos hidrofóbicos hacen que la queratina sea insoluble en agua y en solventes apolares, que otorgan una gran resistencia (Rofner, 2019).

La resistencia mecánica, dureza y flexibilidad de las plumas está muy relacionada con su composición química y su estructura molecular; en las plumas también se puede encontrar contaminantes químicos que son útiles en estudio medioambientales (Loja, 2015).

2.3.4. Microorganismos bacterianos frecuentes que presentan capacidad queratinofílica

La búsqueda de microorganismos con actividad queratinofílica se ha hecho de manera creciente en los últimos años, donde se encuentran géneros de bacterias Gram negativas, como es el caso de *Vibrio sp.* que produjo hidrolizados de plumas de ave con bajo valor biológico, pero con mejor tasa de digestibilidad, *Serratia sp.* produce altas concentraciones de proteína soluble además de grupos amino en los hidrolizados y *Chryseobacterium sp.* que es capaz de hidrolizar plumas sin ningún pretratamiento, por lo que es considerada de alta actividad queratinofílica (Zorro & Catalina, 2019). Entre los géneros de bacterias Gram positivas se encuentran *Actinomyces sp* y *Bacillus sp*, que son las más comúnmente aisladas de plumaje de ave (Ferrareze et al., 2016), y son capaces de solubilizar totalmente la queratina dura presente en uñas pelo y plumas (Huang et al., 2020) .

Entre el género *Bacillus* las especies más reportadas como queratinofílicas con frecuencia son: *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus* *B.*

megaterium y *B. thuringiensis*. Este género bacteriano es el que más se destaca por las enzimas queratinolíticas que producen, las cuales logran degradar totalmente la queratina presente en las plumas (Huang et al., 2020).

Recientemente se reportó una cepa probiótica de *Bacillus subtilis* con actividad queratinolítica, que lograba también solubilizar la queratina presente en plumas de aves de corral. La cepa *Bacillus subtilis*, la cual es comercializada para adicionar en alimentos de rumiantes (Ferrareze et al., 2016), es la primera cepa probiótica reportada con esta habilidad, lo que abre las puertas para la investigación de más cepas probióticas con esta característica, especialmente del género *Bacillus*, ya que estos microorganismos pueden soportar condiciones extremas de almacenamiento, son aisladas tanto del mismo plumaje de las aves como del ambiente (suelo), soportan diferentes condiciones de pH y temperatura, que lo hacen un microorganismo interesante y de fácil manejo en procesos biotecnológicos por la habilidad de formar endospora, además de ser uno de los microorganismos estudiados en los últimos años (Huang et al., 2020).

En la tabla 1 se pueden encontrar algunos de los microorganismos reportados en la literatura capaces de degradar queratina a partir de plumas de aves de corral. Estos microorganismos han sido aislados de plumaje de las aves, de suelo (saprofitos del ambiente) o de desechos queratinosos. Según lo reportado en estas investigaciones, se destaca la presencia de bacterias del género *Bacillus* y son descritas como muy buenas degradadoras de material queratinoso, además son las principales bacterias usadas por la industria para producir queratinasas comerciales (Zorro y Catalina, 2019).

Tabla 1. Bacterias queratinofílicas.

Cepa Bacteriana	Enzima	Autores
Bacterias Gram Negativas		
<i>Flavobacterium sp.</i>	-----	(Riffel and Brandelli 2002)
<i>Serratia sp.</i> HPC 1383	Serinproteasa Metaloproteasa	(Khardenavis, Kapley, and Purohit 2009)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R13	Serinproteasa	(Jeong et al. 2010)
<i>Vibrio sp.</i> Cepa kr2	-----	(grazziotin et al. 2006)
<i>Xanthomonas sp.</i> P5	-----	(Jeong et al. 2010)
<i>Chryseobacterium sp</i>	Metaloproteasa	(Riffel et al. 2007)
Bacterias Gram Positivas		
<i>Bacillus sp.</i> P7	-----	(Correa, Daroit, and Brandelli 2010)
<i>Bacillus sp.</i> MIG-Masc-BT	-----	(Govarthan et al. 2015)
<i>Bacillus sp.</i> P45	-----	(Correa, Daroit, and Brandelli 2010)
<i>Bacillus cereus</i> Wu2	-----	(Lo, Too, and Wu 2012)
<i>Bacillus licheniformis</i> N22	-----	(Okoroma et al, 2012)
<i>Bacillus licheniformis</i> S6O	-----	(Gang et al. 2013)
<i>Bacillus licheniformis</i> ER-15	Serinproteasa	(Tiway and Gupta 2012)
<i>Bacillus licheniformis</i>	-----	(Lin et al. 1992)
<i>Bacillus licheniformis</i>	-----	(Tiway and Gupta 2012)
<i>Bacillus megaterium</i>	-----	(Agrahari and Wadwa 2010)
<i>Bacillus megaterium</i> F7-1	-----	(Park and Son 2009)
<i>Bacillus pumilus</i>	-----	(Agrahari and Wadwa 2010)
<i>Bacillus pumilus</i> A1	-----	(Fakhfakh et al. 2011)
<i>Bacillus subtilis</i>	-----	(Zaghloul, Embaby, and Elmahdy 2011)
<i>Bacillus subtilis</i> cepa RM-01	Serinproteasa Metaloproteasa	(Rai, Konwarh, and Mukherjee 2009)
<i>Bacillus subtilis</i> cepas mutantes	-----	(Zhang et al. 2014)
<i>Bacillus subtilis</i> FTC02PR1	Serinproteasa	(Ferrareze, Correa, and Brandelli 2016)
<i>Bacillus subtilis</i> DP1	Serinproteasa	(Sanghvi et al. 2016)
<i>Bacillus subtilis</i> P13	Serinproteasa	(Pillai, Mandge, and Archana 2011)
<i>Bacillus thuringiensis</i> S2-3	Serinproteasa	(Chukeatirote et al. 2015)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Serinproteasa	(Gegekas, Gudiukaite, and Citavicius 2014)
<i>Brevibacillus sp.</i> Cepa AS-S10-II	-----	(Mukherjee, Rai, and Borboloi 2011)
<i>Streptomyces sp.</i> 2M21	-----	(Demir et al. 2015)
<i>Streptomyces sp.</i> Cepa AB1	Serinproteasa	(Jaouadi et al. 2010)
<i>Kocuria rosea</i> LPB 3	Serinproteasa	(Bertsch and Coello 2005)
<i>Microbacterium sp.</i> Kr10	Metaloproteasa	(Thys et al. 2004)

Zorro y Catalina, 2019.

2.3.5. Proceso degradativo de la queratina por bacterias

La degradación de la queratina por parte de los microorganismos queratinofílicos sigue la misma secuencia de eventos que la degradación de cualquier otro sustrato sólido: adhesión, colonización, producción de hidrolasas específicas seguido de la desintegración y degradación posterior del sustrato (Suzuki et al., 2006). Dado que el estudio diferencial de los genes o de la expresión de las proteínas en la degradación de la queratina por parte de estos microorganismos no ha sido desarrollado aún, el mecanismo de queratinolisis sigue siendo incierto. En la actualidad se postula un modelo que incluye dos eventos principales: la sulfitólisis (rotura de los puentes disulfuros presentes en la molécula de queratina) seguida del ataque proteolítico por las queratinasas, las cuales además de clivar los enlaces peptídicos de la molécula de queratina también clivan los residuos hidrofóbicos presentes en la superficie de la molécula. (Cavello, 2013)

En presencia de un ambiente reductor, las queratinasas son capaces de degradar la queratina, en tanto que proteasas convencionales como papaína, pepsina o tripsina no pueden hacerlo. Las proteasas convencionales sólo serían capaces de degradar la queratina si antes de actuar éstas, actúan las queratinasas clivando los residuos hidrofóbicos presentes en la superficie de la queratina (Pathange et al., 2010).

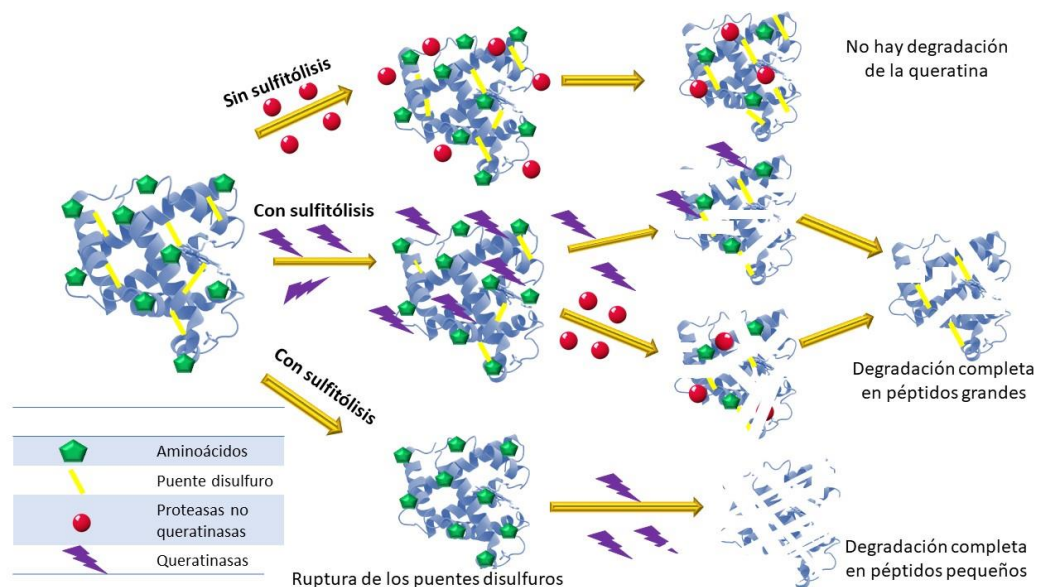


Figura 2. Representación esquemática de la degradación de queratina por parte de Queratinasas y Proteasas convencionales.

Fuente: (Pathange et al., 2010).

2.3.6. Uso potencial de plumas de aves

El alto contenido proteico de las plumas de ave, permite considerar a este residuo como fuente potencial para la obtención de aminoácidos con aplicación en la industria agroquímica (alimento proteico de aves, abono para fertilizar suelos) y biotecnológica (producción de enzimas y aminoácidos) para la producción de productos utilizados en la industria estética. También son de considerar las tendencias actuales hacia la búsqueda de un alto potencial microbiano en la naturaleza, capaz de utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos. Por estas razones, se ha dirigido al objeto de este proyecto a la búsqueda de microorganismos queratinofílicos capaces de degradar plumas de aves, mediante procesos fermentativos como alternativa para la obtención de aminoácidos de aplicación en la industria (Rofner, 2019).

2.3.7. Técnica de ninhidrina

Descubierta por Siegfried Ruhemann en 1910 a una reacción con grupos amino primario para formar una coloración azul-púrpura que ahora es llamado púrpura de Ruhemann (RP). Al reaccionar con el grupo amino libre (GAL) da lugar a la formación de amoníaco y anhídrido carbónico, con la reducción de la ninhidrina a hidrindantina. Esta hidrindantina reacciona con el amoníaco y otra molécula de ninhidrina para formar un compuesto doble que va a presentar una coloración de azul-púrpura. Las excepciones para esta coloración es la prolina que da una coloración amarillenta. La reacción con ninhidrina presenta un máximo de absorción a 540 nm, además la reacción se lleva en un pH entre 4 y 8 (Friedman, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

3.1.1. Ubicación política y geográfica del vertedero clandestino

Está ubicada en el Centro Poblado (CC.PP.) de Condoray en el distrito de Tambillo de la siguiente manera:

Región : Ayacucho
Provincia : Huamanga
Distrito : Tambillo
Centro Poblado : Condoray

La zona de toma de muestra está ubicada de acuerdo a las coordenadas geográficas y la altitud (Google, 2024) (**ver anexo 1**).

Tabla 2. Coordenadas de ubicación del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray

Distrito	CC.PP. (Vertedero clandestino)	Coordenadas		Altitud (m.s.n.m.)
		X	Y	
Tambillo	Condoray	13° 11' 32,7" S	74° 7' 51,3" W	2953

Fuente: (Google, 2024).

3.1.2. Ubicación política y geográfica del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

Está ubicada políticamente de la siguiente manera:

Región : Ayacucho
Provincia : Huamanga
Distrito : Ayacucho
Dirección : Av. Independencia N° 57

La zona de estudio está ubicada de acuerdo a las coordenadas geográficas y la altitud.

Tabla 3. Ubicación del Laboratorio de Microbiología Ambiental.

Provincia	Distrito	Coordenadas		Altitud (m.s.n.m.)
		X	Y	
Huamanga	Ayacucho	13° 08' 53" S	74° 13' 12" O	2750

Fuente: (Google, 2024).

3.2. Unidad de análisis

Está conformada por muestras de suelo y plumas del vertedero clandestino. Tomadas por un método no probabilístico, por conveniencia.

Los criterios de inclusión fueron las zonas del terreno donde los suelos presentaron mayores cantidades de plumas dispersas y plumas en descomposición.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Obtención de muestra biológica

Se localizó visualmente la zona del terreno con suelo removido, donde se encontraron las plumas dispersas y acumuladas (**ver anexo 2**).

Se recogió 500 g de suelo y dos cúmulos de plumas de 155 y 200 g respectivamente, en una bolsa de polietileno herméticamente cerrada.

Las muestras fueron trasladadas en un cooler a una temperatura ambiente al laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para su posterior procesamiento.

3.3.2. Acondicionamiento de las muestras recolectadas de suelo y plumas

- La muestra de suelo se tamizó con una malla de 2 x 2 mm de abertura para separar las piedras y partículas grandes obteniendo una cantidad homogénea de muestra.
- Posteriormente las plumas fueron molidas en un mortero con pilón para tener un mejor manejo de los microorganismos impregnados en el sustrato.
- Finalmente se pesó 1 g de cada una de las tres muestras en una balanza analítica de alta sensibilidad y codificada con los códigos de P1 (pluma 1), P2 (pluma 2) y S (suelo).

3.3.3. Proceso de adaptación de la microbiota de suelo y plumas (Primera etapa)

- Se preparó 03 matraces de pyrex de 500 mL de capacidad con 100 mL de medio mineral Bushnell Hass para cada una de ellas (**ver anexo 3**), suplementadas con 0,187 gramos de plumas molidas.
- Se rotularon con los códigos P1 (pluma 1), P2 (pluma 2) y S (suelo). Luego se

llevó a esterilizar a 121 °C, 15 lb y 15 min.

- Luego a cada matraz (P1, P2 y S) se le agregó las muestras que les correspondía (P1, P2 y S) **(ver anexo 4)**.
- Finalmente se llevó a rotación a 100 rpm por 7 días (Ibáñez et al., 2004) **(ver anexo 5)**.

3.3.4. Proceso de adaptación de bacterias a sustrato de plumas (Segunda etapa)

- Se preparó previamente una batería de 50 tubos de ensayo, en los cuales se vertieron medio salino basal (MBS), **(ver anexo 6)**, suplementado con diferentes concentraciones de glucosa, extracto de levadura y plumas de aves, según lo descrito en la tabla 4.
- Los microorganismos obtenidos en la primera etapa de adaptación fueron sometidos a una segunda etapa de adaptación, para esto se realizó lo siguiente: de cada matraz se tomó dos asadas a cada tubo del bloque A (tabla 4), con tres repeticiones en cada bloque, los cuales se incubaron a 30 °C por 24 horas, transcurrido el tiempo se repicaron de los tubos del bloque A, a los tubos del bloque B y así sucesivamente hasta los tubos del bloque E, incubados a 30 °C por diferentes tiempos por 15 días en total.

Tabla 4. Concentración de los suplementos y otros en el medio MBS para la adaptación de microorganismos provenientes de las plumas y suelo.

Bloque	Ensayo	Repeticiones	Contenido por tubo				Periodo de incubación (días)
			MBS (ml)	Glucosa (g)	Extracto de levadura (g)	Pluma (g)	
A	P1	3	10	0,1	0,1	0	1
	P2	3	10	0,1	0,1	0	
	S	3	10	0,1	0,1	0	
	B	1	10	0,1	0,1	0	
B	P1	3	10	0,05	0,05	0,06	2
	P2	3	10	0,05	0,05	0,06	
	S	3	10	0,05	0,05	0,06	
	B	1	10	0,05	0,05	0,06	
C	P1	3	10	0,025	0,025	0,12	3
	P2	3	10	0,025	0,025	0,12	
	S	3	10	0,025	0,025	0,12	
	B	1	10	0,025	0,025	0,12	
D	P1	3	10	0,01	0,01	0,25	4
	P2	3	10	0,01	0,01	0,25	
	S	3	10	0,01	0,01	0,25	
	B	1	10	0,01	0,01	0,25	
E	P1	3	10	0	0	0,3	5
	P2	3	10	0	0	0,3	
	S	3	10	0	0	0,3	
	B	1	10	0	0	0,3	

Finalmente, transcurrido los 15 días, se tomó dos asadas de los 10 tubos de ensayo del bloque E; los cultivos obtenidos fueron sometidos a coloración de Gram y observadas al microscopio (**ver anexo 7**).

3.3.5. Aislamiento de bacterias de las plumas y suelo muestreadas en el vertedero informal del CC.PP. de Condoray

- Para el aislamiento se utilizaron dos tipos de medios sólidos, uno el agar nutritivo (AN) y el otro agar pluma ave (APA).
- Se tomó dos asadas de cada uno de los 10 tubos de ensayo del bloque E y se sembró en 10 placas de Petri conteniendo un medio de AN, utilizando la técnica de sembrado de agotamiento en superficie.
- Se llevaron a incubación a 30° C por 24 a 48 horas.
- Se observaron crecimiento de colonias microbianas (**ver anexo 8**)
- Posteriormente con un marcador indeleble se seleccionaron cepas bacterianas de acuerdo a sus características culturales.
- Las colonias seleccionadas crecidas en AN, fueron repicadas en 10 placas de Petri conteniendo medio APA, utilizando la técnica de sembrado por estrías y fueron llevados a incubación a 30°C por 72 horas.
- Las colonias microbianas que crecieron fueron repicadas en viales con medio de AN y llevadas a incubación a 30° C por 24 a 48 horas, codificadas y preservadas en refrigeración como cepario (Juárez, 2012).

3.3.6. Evaluación de la degradación de la queratina de plumas de aves

a. Preparación de inóculo

- Se tomaron dos asadas de cada cepa bacteriana e inoculadas en matraces con 90 mL de caldo nutritivo; incubados a 30°C por un tiempo que permitió alcanzar una turbidez equivalente al tubo N°5 de la escala McFarland (15×10^8 células/mL).
- De este modo, se logró obtener cuatro matraces de inóculos microbianos, uno con la cepa aisladas de la muestra de suelo y otros tres con cepas aisladas de las muestras de plumas.

b. Sembrado de inóculo

- Cada inóculo bacteriano fue sembrado, por tres repeticiones, a razón de 30 mL en matraces conteniendo 300 mL de MBS y suplementado con 0,525 g de plumas picadas de aves; por tratarse de cuatro cepas, en total se usaron 15 matraces considerando además tres frascos del blanco, estos últimos no fueron inoculados con bacterias.
- Se llevaron a incubación a temperatura ambiente, en rotación constante a 100

rpm durante 35 días, las evaluaciones de liberación de grupos de aminos libres (GAL) y biomasa fueron realizados a los 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días.

3.3.7. Estandarización de la curva patrón para la determinación de la biomasa microbiana

- Se cogió dos asadas de cada una de las 04 cepas y se inocularon en 04 matraces con 150 mL de MBS suplementadas con plumas.
- Se llevaron a rotación a 100 rpm a temperatura ambiente por 48 horas.
- Se realizaron la comparación de la turbidez con la escala N° 5 de Mc Farland
- Para la separación de las partículas mayores (plumas) presentes en el cultivo, éstos fueron filtrados a través filtro Whatman grado 40 con apoyo de una bomba de vacío.
- El cultivo filtrado, fue transferido a seis tubos de ensayo a razón de 30, 25, 20, 15, 10 y 5 mL, a cada tubo se le agregó agua destilada a razón de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mL, respectivamente, así se obtuvieron seis tubos con diferentes concentraciones de número de células bacterianas. Este procedimiento fue repicado para cada cepa bacteriana.
- La turbidez resultante de cada tubo fue sometida a lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Scientific a 600 nm, los datos obtenidos fueron sometidos a cálculos de prueba de regresión lineal.
- Paralelamente, el cultivo filtrado a través del papel Whatman y contenidos en los seis tubos descritos en el ítem anterior, fueron sometidos a una segunda filtración, a través de un filtro de membrana, previamente tarada, de 0,45 µm de porosidad, cada filtro de membrana fue retirada del equipo de filtración y colocada en placas de Petri y secadas en estufa a 95°C por 48 horas, transcurrido el tiempo fueron pesados en una balanza analítica. Para el cálculo de biomasa se utilizó la siguiente fórmula.

$$\text{Peso seco biomasa (mg/mL)} = \frac{\text{Peso de la membrana con biomasa (mg)} - \text{Peso de membrana sin biomasa (mg)}}{\text{Contenido del tubo (mL)}}$$

- Los datos obtenidos fueron llevados a un plano cartesiano del programa de Excel para el cálculo R², relacionando la densidad óptica (D.O.) con la biomasa (mg/ml) (Arnaiz et al., 2000).

3.3.8. Estandarización de la curva patrón para la determinación de aminoácidos

- En un vaso de precipitado de 250 ml, se pesó un gramo de glicina y se disolvió

con 100 mL de agua destilada, de este modo se obtuvo una solución de glicina con una concentración de 10 mg/mL.

- La primera solución de glicina (10 mg/ml) fue transferido a 11 tubos de ensayo a razón de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 y 0 mL, a cada tubo se le agregó agua destilada a razón de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mL, respectivamente; el tubo 11, que no contiene ninguna concentración de glicina, representó el blanco y el resto de los 10 tubos con 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 y 1 mg/mL de glicina, respectivamente.
- A cada uno de los 11 tubos se agregaron 10 gotas de la solución de ninhidrina e incubadas en baño maría a 60 °C por 30 minutos, en seguida se transfirieron a un vaso de precipitado de 1000 mL conteniendo hielo, se dejaron en reposo por 5 minutos hasta el viraje del color de las soluciones contenidas en los tubos a una coloración azul – púrpura, excepto en el blanco.
- Las soluciones de los 11 tubos fueron sometidas a la lectura de su absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Scientific a 540 nm, los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba de regresión lineal y cálculo del valor de R^2 .
- Los datos generados mediante la prueba de regresión lineal fueron llevados a un plano cartesiano, relacionando la densidad óptica (D.O.) con la concentración de aminoácidos (mg/ml) (OCBEC, 2022).

3.3.9. Determinación de la biomasa microbiana durante la prueba de degradabilidad de queratina de plumas de ave

- Después de la incubación a temperatura ambiente de los 15 matraces de evaluación de la degradación de la queratina de las plumas de ave por 35 días; en el transcurso se separaron 20 ml de cultivo de cada matraz a los 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días.
- Los 20 mL de cultivos separados fueron sometidos a filtración, con el uso del equipo con bomba al vacío, a través de filtros Whatman, y el filtrado fue transferido a tubos de ensayos.
- Para la determinación de la turbidez, la solución filtrada fue sometida a lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Scientific a 600 nm, los datos obtenidos fueron comparados con los valores de la curva patrón correspondiente, obteniéndose de este modo los valores de biomasa microbiana en distintos tiempos de incubación.
- Con la ecuación de regresión lineal, los datos obtenidos con la curva patrón, fueron corregidos. (Bonilla, 2010).

- Finalmente, para determinar el porcentaje de incremento (%) de biomasa se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Incremento (\%)} = \frac{\text{Biomasa en el tiempo final} - \text{Biomasa en el tiempo inicial}}{\text{Biomasa en el tiempo inicial}} \times 100$$

3.3.10. Determinación de grupos aminos libres (GAL) durante la prueba de degradabilidad de la queratina de plumas de ave

- Después de la incubación a temperatura ambiente de los 15 matraces de evaluación de la degradación de la queratina de las plumas de ave por 35 días; en el transcurso se separaron 20 ml de cultivo de cada frasco a los 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días.
- Los 20 mL de cultivos separados fueron sometidos a filtración, con el uso del equipo con bomba al vacío, a través de filtros de membrana, y el filtrado fue transferido a tubos de ensayos.
- A cada uno los tubos de ensayo se agregaron 10 gotas de ninhidrina al 10% e incubadas en baño maría a 60 °C por 30 minutos, en seguida se transfirieron a un vaso de precipitado de 1000 mL conteniendo hielo, se dejaron en reposo por 5 minutos hasta el viraje del color de las soluciones contenidas en los tubos a una coloración azul – púrpura, excepto en el blanco.
- Para la determinación de la solución fue sometida a lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Scientific a 540 nm, los datos obtenidos fueron comparados con los valores de la curva patrón correspondiente, obteniéndose de este modo los valores de aminoácidos en distintos tiempos de incubación.
- Con la ecuación de regresión lineal, los datos obtenidos con la curva patrón, fueron corregidos (Bonilla, 2010).

3.3.11. Identificación de cepas degradadoras de queratina

- a. Caracterización cultural.** A las bacterias queratinofílicas aisladas, se caracterizaron y diferenciaron según sus características culturales de cada una de las cepas.
- b. Caracterización microscópica.** La caracterización microscópica se realizó conjuntamente con la descripción macroscópica o cultural de las cepas aisladas. Finalmente se hizo la tinción de Gram para cada una de las cepas.
- c. Caracterización molecular.** La caracterización molecular se realizó con las cepas que tuvieron mejor concentración de biomasa.

Para lo cual se realizó la identificación molecular de las cepas mediante la empresa “Umbrella Genomics Company” utilizando el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y determinando la secuencia genómica.

3.4. Análisis de datos

Con los datos obtenidos en la presente investigación se realizó un análisis de estadística descriptiva y se presentó en forma de tablas, curvas e histogramas. Luego se procedió a realizar un análisis de estadística inferencial como en análisis de varianza (ANVA) a un 95% de confianza y la prueba estadística de comparación de medias individuales de Tukey, utilizando el software SPSS Statistics 20 y Excel 2020.

IV. RESULTADOS

Tabla 5. Crecimiento de colonias bacterianas en medio de agar nutritivo y agar pluma ave, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.

Muestra	Código	N° de colonias en agar nutritivo	N° de colonias en agar pluma ave
Muestra de pluma 1	P ₁	9	3
Muestra de pluma 2	P ₂	6	0
Muestra de suelo	S	5	1
TOTAL		20	4

Tabla 6. Características culturales y test de Gram de las 4 colonias bacterianas queratinofílicas aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.

Muestra	Código de colonia	Características culturales de las colonias en agar pluma ave en 72 horas	Forma celular	Gram
P ₁	C8-1	Forma circular, borde entero, elevación plana con superficie cremosa, color crema, transparencia opaca, textura lisa.	Bacilos	+
P ₁	C1-1	Forma circular, borde entero, elevación plana con superficie cremosa, color blanquecino, transparencia translúcida, textura lisa.	Bacilos	+
P ₁	C6-1	Forma circular, borde entero, elevación convexa con superficie cremosa, color blanquecino, transparencia traslúcida, textura rugosa.	Bacilos	+
S	C1-S	Forma circular, borde entero, elevación convexa con superficie cremosa, color blanquecino, transparencia traslúcida, textura rugosa.	Bacilos	+

Leyenda

- : Gram Negativo

+ : Gram Positivo

P₁ : muestra de pluma 1

P₂ : muestra de pluma 2

S : muestra de suelo

Tabla 7. Estandarización de la curva patrón de glicina para la determinación de la concentración de aminoácidos de la degradación de queratina por las cuatro cepas queratinofílicas aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray, Ayacucho – 2023.

N°	Concentración de a.a. (mg/mL)	Absorbancia	Ecuación de la recta
1	10	1.72	$Y = 0.2114x - 0.4292$ $R^2 = 0.9557$
2	9	1.532	
3	8	1.46	
4	7	0.998	
5	6	0.683	
6	5	0.494	
7	4	0.271	
8	3	0.121	
9	2	0.046	
10	1	0.008	

Figura 3. Curva patrón de la glicina para la determinación de la concentración de aminoácidos (mg/mL) de la degradación de la queratina por las cuatro cepas queratinofílicas aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray, Ayacucho – 2023.

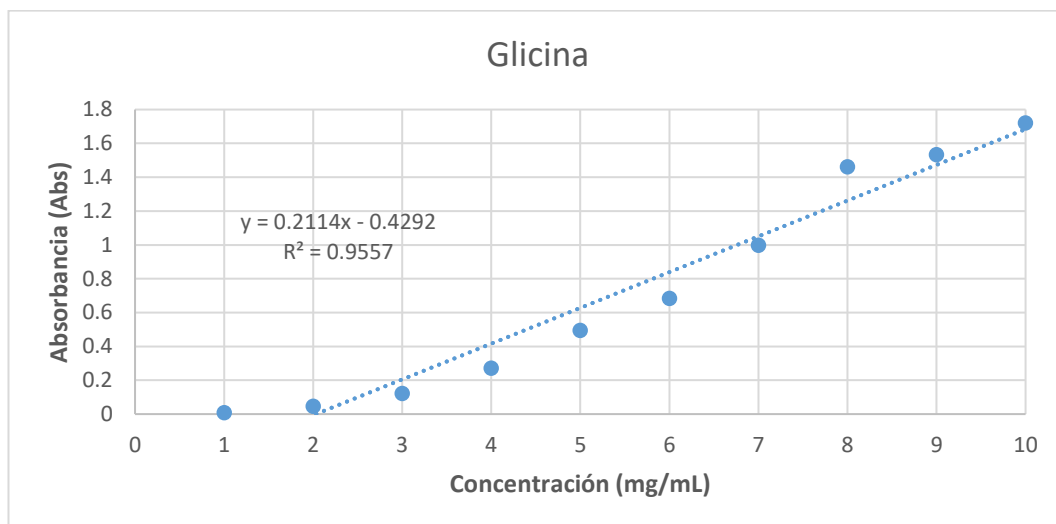


Figura 4. Valores promedios de la concentración de aminoácidos (mg/mL) en medio líquido durante 35 días de incubación por acción de cuatro cepas queratinofílicas, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray, Ayacucho – 2023.

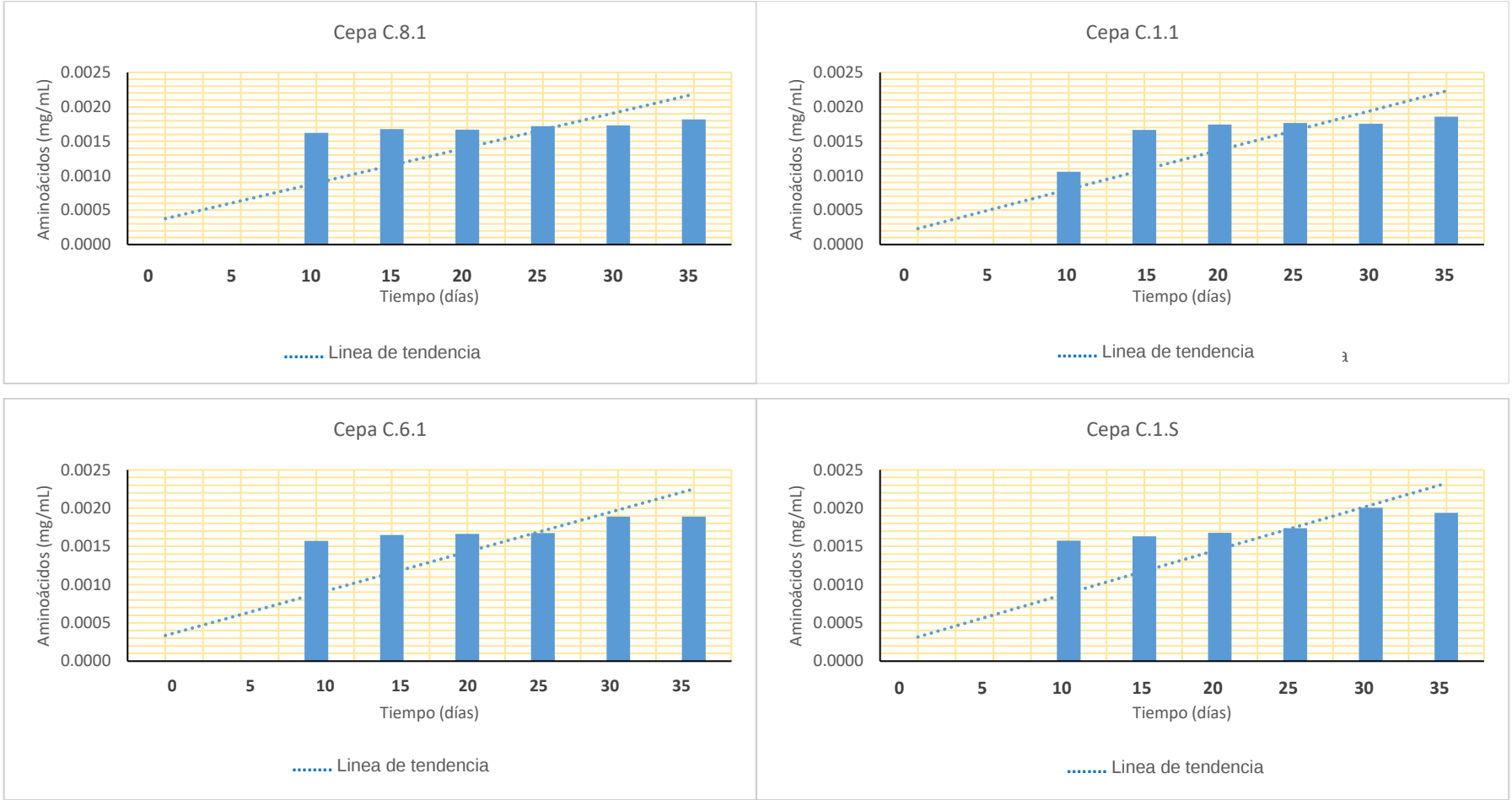


Figura 5. Valores promedios de las concentraciones de aminoácidos (mg/mL) en medio líquido durante 35 días de incubación por acción de cuatro cepas queratinofílicas, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray, Ayacucho – 2023.

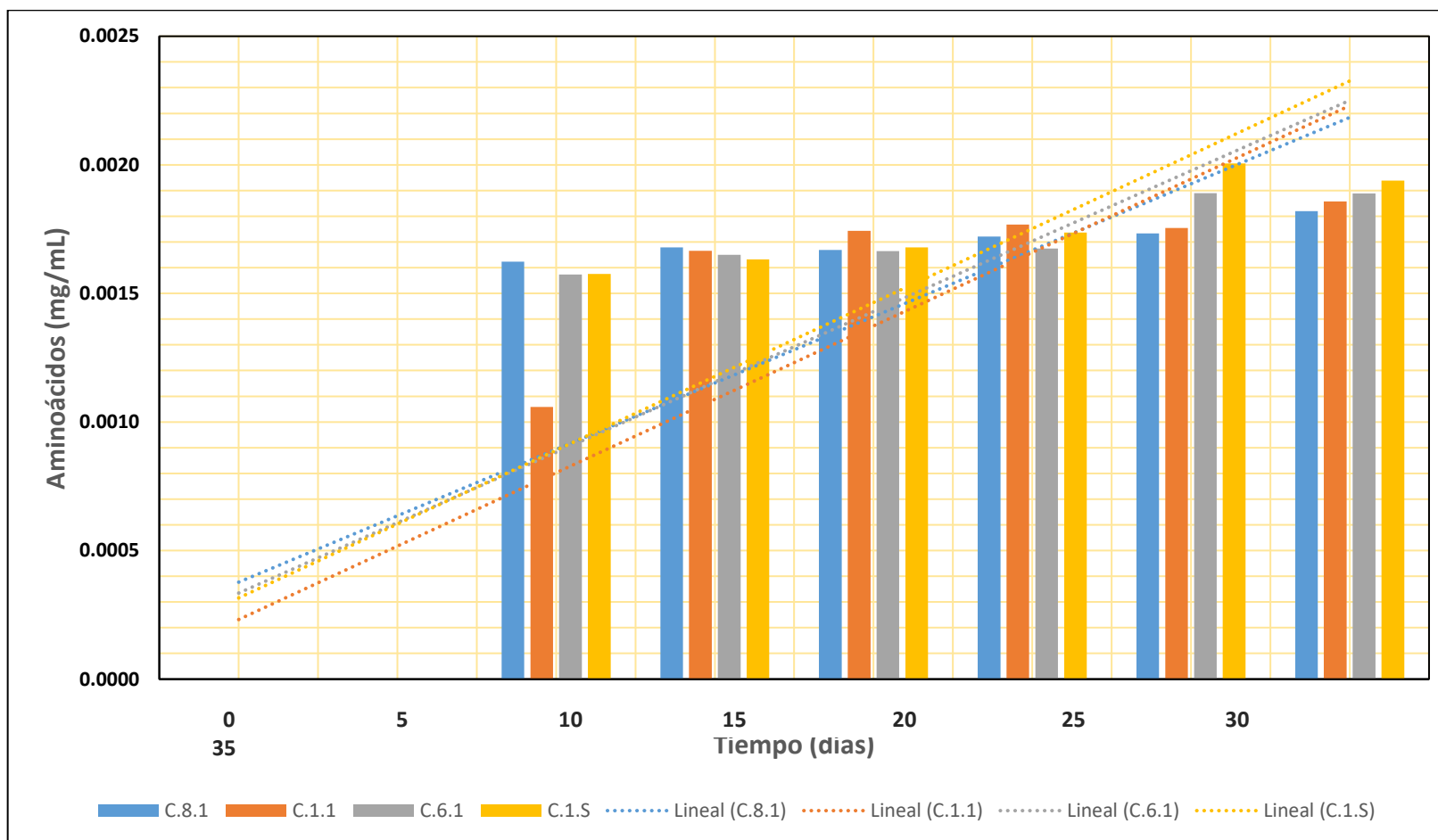


Figura 6. Valores promedios de las concentraciones finales de aminoácidos (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas en el día 35, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.

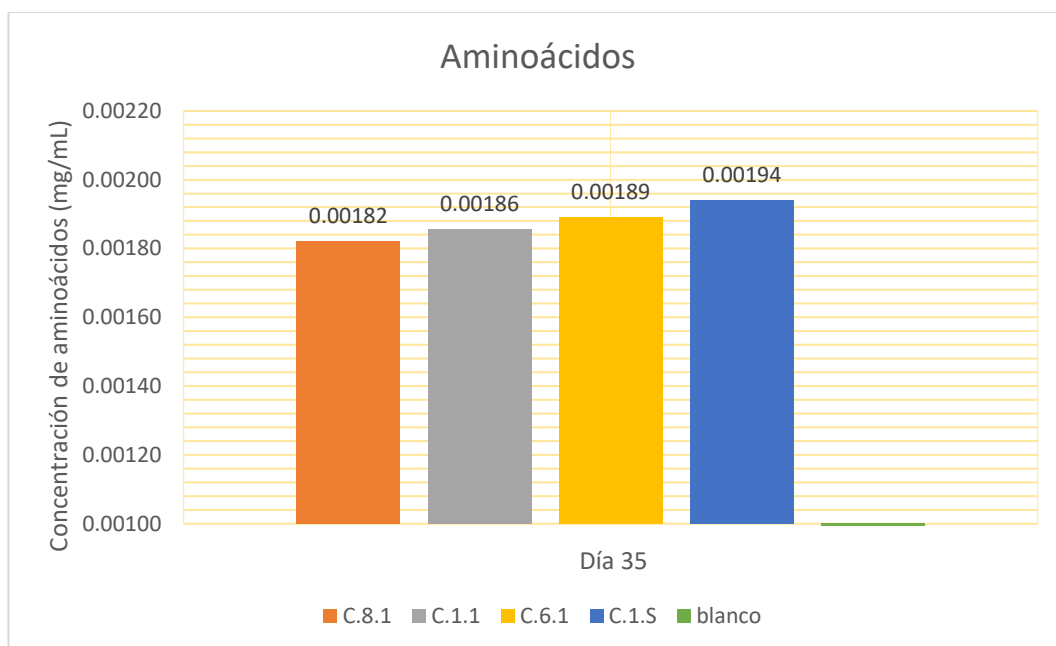


Tabla 8. Estandarización de la curva patrón para la determinación de biomasa de las cuatro cepas queratinofílicas en 5 días de incubación, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.

Código de cepa	Biomasa (mg/mL)	Absorbancia (Abs)	Ecuación de la recta (y=bx-a)
C8.1	0.036	0.07	Y = 89.867x – 0.01 R² = 0.9366
	0.028	0.053	
	0.02	0.034	
	0.004	0.012	
	0	-0.006	
	0	-0.025	
C1.1	0.036	0.052	Y = 80.998x – 0.0191 R² = 0.9517
	0.028	0.042	
	0.02	0.022	
	0.016	0.009	
	0	-0.009	
	0	-0.028	
C6.1	0.064	0.041	Y = 32.399x – 0.0064 R² = 0.7176
	0.016	0.024	
	0.012	0.004	
	0.008	-0.0001	
	0	-0.0002	
	0	-0.026	
C1.S	0.044	0.048	Y = 57.069x – 0.0157 R² = 0.924
	0.04	0.039	
	0.024	0.019	
	0.012	0.005	
	0	-0.005	
	0	-0.029	
Blanco	0.0005	0	

Figura 7. Curva patrón de las biomazas (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas en 5 días de incubación, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray, Ayacucho – 2023.

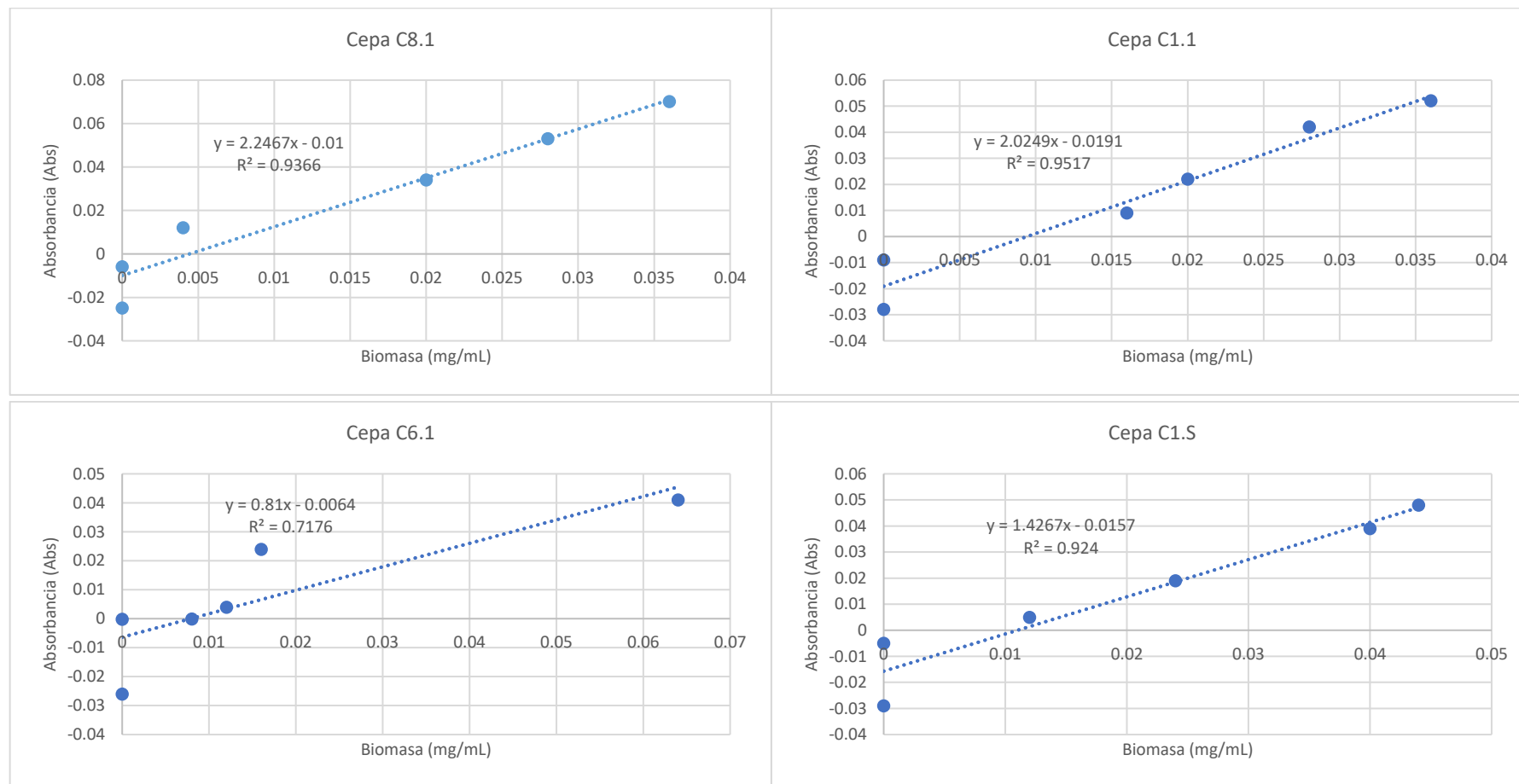


Figura 8. Valores promedios de los incrementos de biomasa de las cuatro cepas queratinofílicas en 35 días de incubación, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.

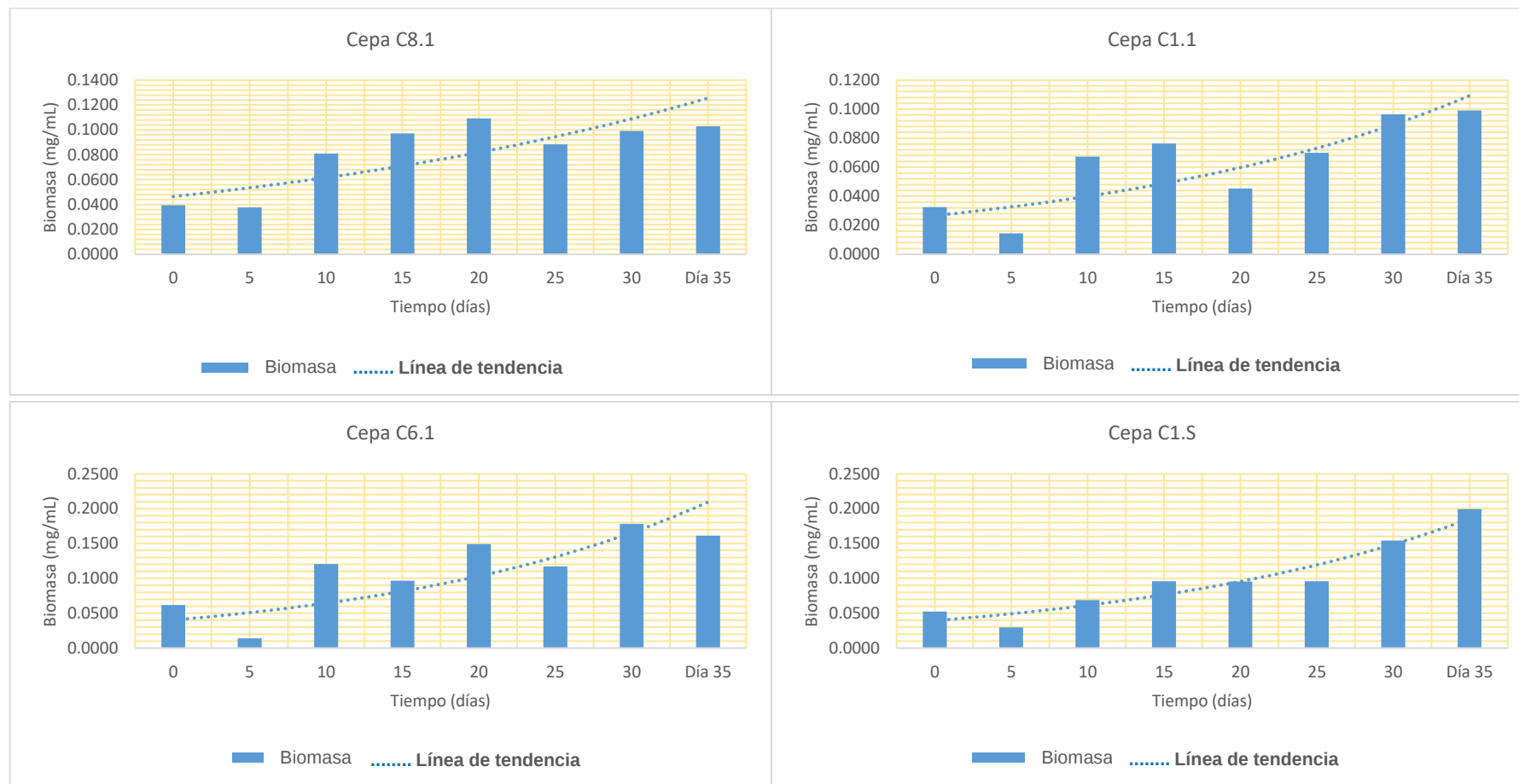


Figura 9. Valores promedios de los incrementos de biomasa de las cuatro cepas queratinofílicas en 35 días de incubación, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.

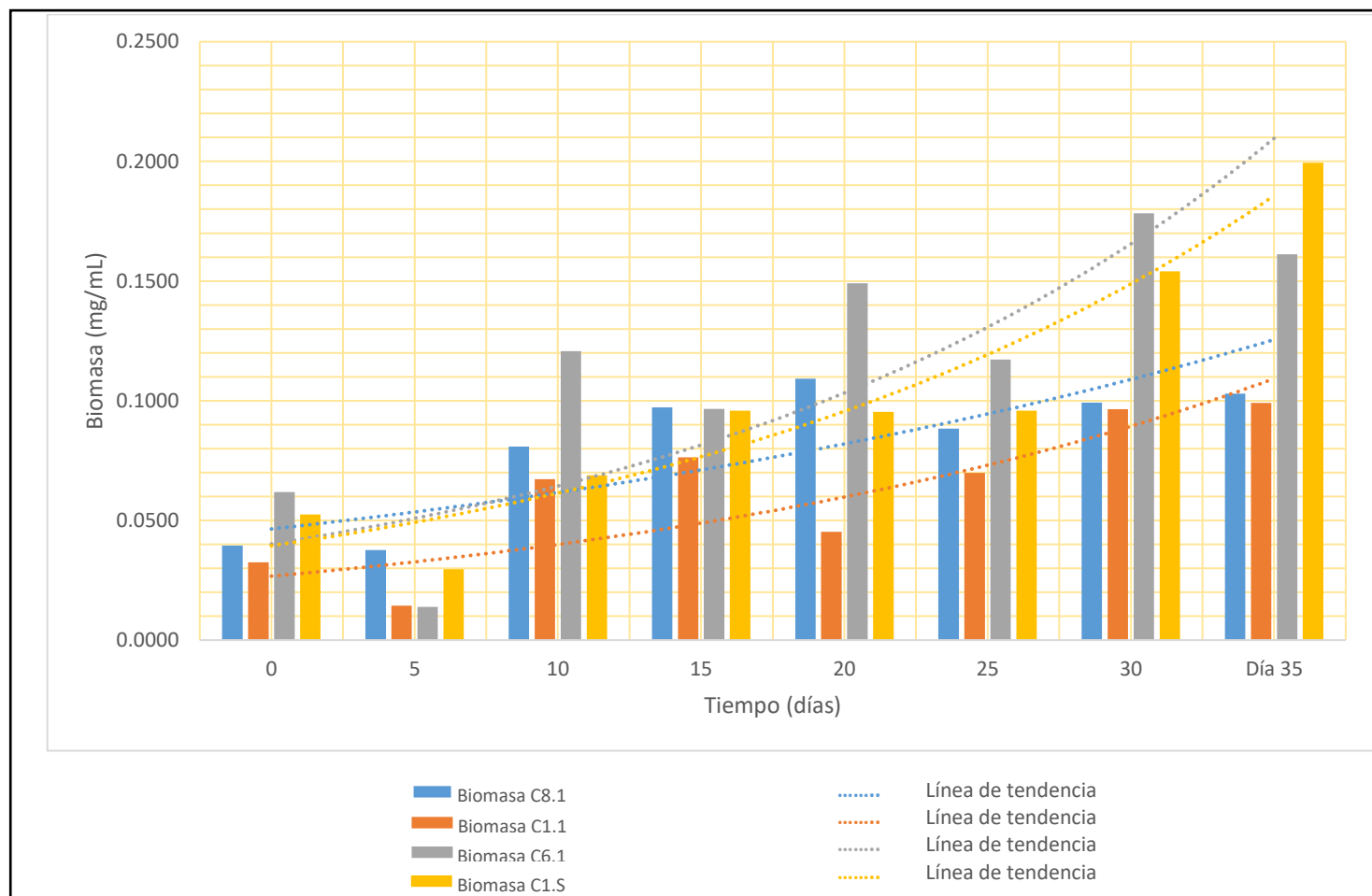


Figura 10. Valores promedios de las concentraciones finales de biomasa (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas en el día 35, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.

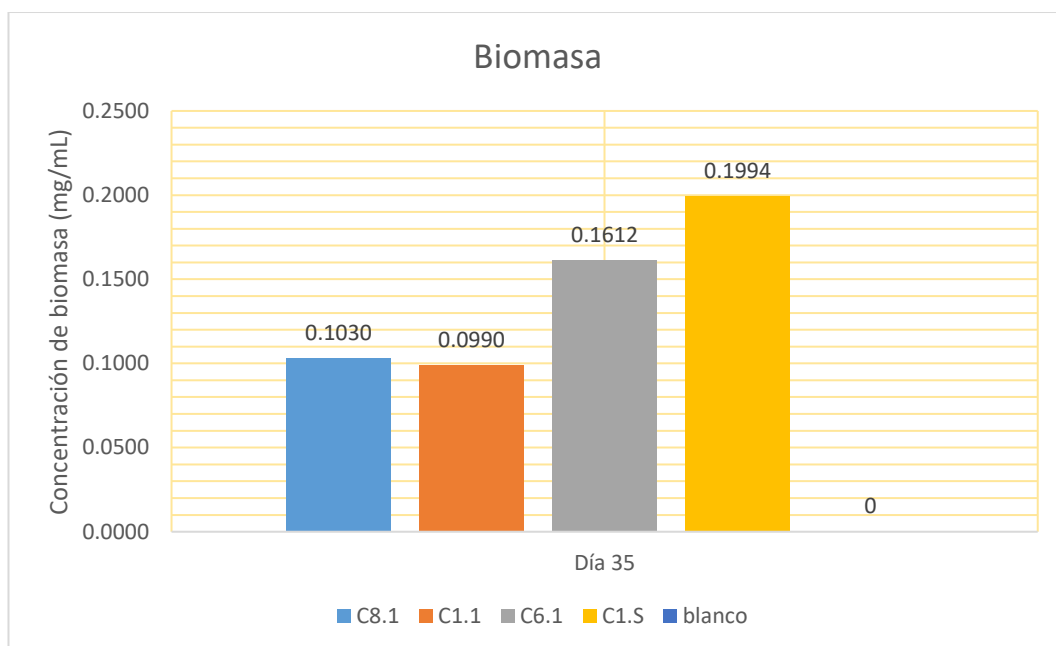


Figura 11. Porcentaje promedio de los incrementos (%) de biomasa de las cuatro cepas queratinofílicas en 35 días, aisladas del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.

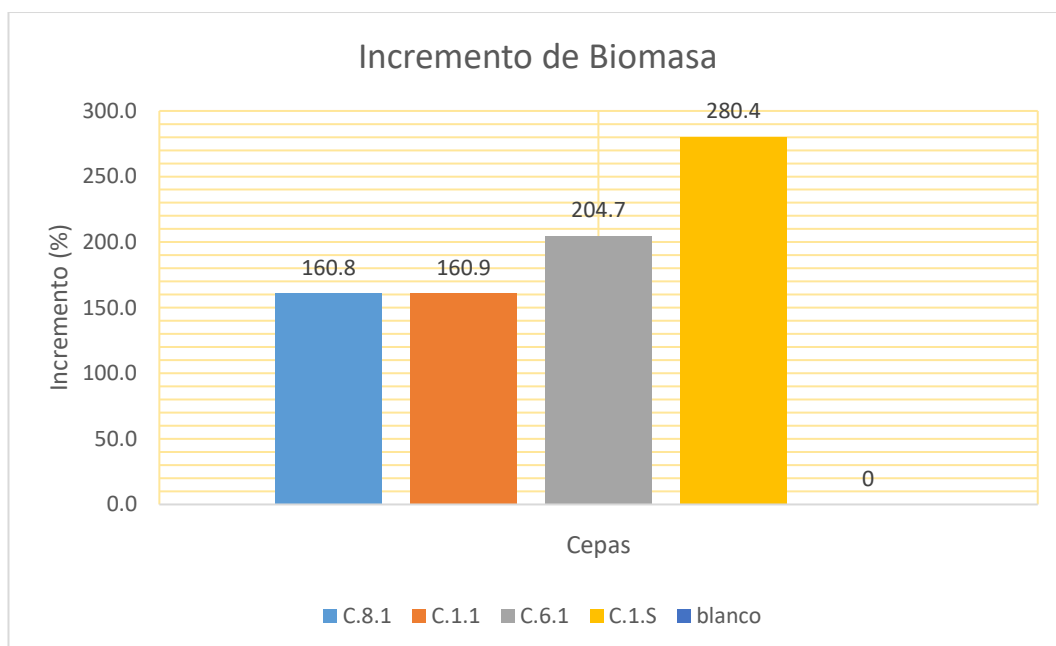


Tabla 9. Identificación molecular de 2 cepas (C1.S y C6.1) queratinofílicas en el laboratorio de “Umbrella Genomics Company”. Lima – 2023.

Muestra (cepa)	ADN extraído (ng/μL)	Género	Especie
C1.S	29,5	Bacillus	<i>B. sanguinis</i>
C6.1	30,8	Bacillus	<i>B. sanguinis</i>

V. DISCUSIÓN

En la Tabla 6, se muestran las características culturales y el resultado de la coloración de Gram de las cuatro colonias (C8.1, C1.1, C6.1 y C1.S) bacterianas queratinofílicas codificadas, aisladas de muestras de suelo y plumas de ave del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray en Ayacucho, crecidas en el medio agar pluma ave donde presentaron algunas diferencias entre colonias, así como la cepa con el código C8.1 de forma circular con borde entero con una elevación plana de superficie cremosa, color crema, transparencia opaca y con una textura lisa; C1.1 de forma circular con borde entero con una elevación plana de superficie cremosa, color blanquecino, transparencia translúcida y con una textura lisa, además; las cepas C6.1 y C1.S de formas circulares con borde entero con una elevación convexa de superficie cremosa, color blanquecino, transparencia translúcida y con una textura rugosa, resultados similares a las obtenidas por Juárez, (2012), quien muestra la caracterización cultural de 28 cepas aisladas de suelos avícolas como colonias circulares e irregulares; bordes regulares, irregulares y onduladas; superficies convexas, planas y elevadas, colores cafés, grises, beige y texturas rugosas, encontrándose similitudes en el crecimiento y desarrollo bacteriano de las colonias crecidas en agar pluma ave, teniendo a la pluma como única fuente de energía y carbono. Tal como Sarita y Wadhwa, (2010), describieron a tres cepas bacterianas aisladas en suelos avícolas, *B. megaterium*, *B. thuringensis* y *B. pumilis*, como cepas circulares e irregulares, bordes enteros, elevación convexa y de coloración blanquecina o cremosa. Las cuatro cepas bacterianas aisladas en la presente investigación resultaron ser bacilos Gram positivos; comparadas con lo obtenido por Zorro y Catalina, (2019), que encontraron dos cepas bacterianas Gram positivas, bacilos e identificadas como *B. circulans* y *B. subtilis*, aislados de plumas de pollo en la ciudad de Bogotá – Colombia.

En la Figura 7, se observan los valores promedios de las concentraciones de aminoácidos presentes en los medios de cultivo de las cuatro cepas bacterianas queratinofílicas a los 35 días de incubación, evaluados mediante la técnica de ninhidrina como lo menciona Friedaman, (2004), caldos que fueron previamente filtrados a través de un filtro de membrana de 0,45 μm de porosidad que retuvieron la biomasa microbiana y permitiendo el paso de aminoácidos, donde nos generó valores promedios de concentración de aminoácidos de 0,00182 mg/mL y 0,060 de absorbancia para la cepa C8.1; 0,00186 mg/mL y 0,069 para la cepa C1.1; 0,00189 mg/mL y 0,075 para la cepa C6.1 y 0,00194 mg/mL y 0,087 para la cepa C1.S; al respecto, Hernández, (2020), obtiene un valor de absorbancia de 0,035 utilizando a *Chryseobacterium indologenes*, valor menor en comparación a lo obtenido en la presente investigación; en contraste con lo obtenido por Juárez, (2012) quien toma solamente los valores altos de absorbancia de la cepa J28 con 0,326 y la cepa J27 con 0,155, obtenidas con una lectura en espectrofotómetro a 540 nm de longitud de onda; donde también realizó la coloración con la técnica de ninhidrina que es un indicador de la presencia de aminoácidos, donde reaccionan los extremos aminos del aminoácido con el cromóforo del indicador mostrando una coloración que va desde el color azul a púrpura, contrastando la presencia de grupos aminos libres, quienes utilizaron el método como una prueba cualitativa demostrando la actividad degradadora de las bacterias en las plumas, sin establecer una curva estándar de aminoácidos.

Para mayor facilidad y mejor manejo de los datos obtenidos en la presente investigación, se hicieron la conversión de los valores de la lectura de la absorbancia a concentración de aminoácidos en mg/mL, sin embargo, diferentes autores solo utilizan como medida de degradación la medición de absorbancia basándose en un resultado cualitativo de coloración púrpura. Por otro lado, Piñero et al., (2000), cuantifican la degradación de queratina a través de la unidad de actividad enzimática (U/mL) la cual no fue utilizada por que no se cuantificó la presencia y cantidad de enzimas en esta investigación por lo que solo se tuvo como objetivo determinar la capacidad de degradación de queratina. Los datos obtenidos, en promedio, como acción degradadora de las cuatro cepas, fueron similares y las pruebas estadísticas realizadas con ANOVA, sugieren que no hay diferencias significativas de concentración de aminoácidos en los tratamientos realizados por la degradación queratinofílica. Estos resultados sientan las bases de futuras investigaciones en la obtención de aminoácidos y oligopéptidos para el

uso biotecnológico e industrial, así como Hernández, (2020), y otros autores ya lo están realizando y demostrando la degradación de queratina y obtención de aminoácidos mediante el uso de bacterias en la fermentación e hidrolisis de las plumas que son desechos contaminantes.

En la Figura 12, se observan los valores promedios de la variación de la biomasa de las cuatro cepas queratinofílicas, a los 35 días de incubación, producto del crecimiento en medio basal salino (MBS) cuya única fuente de carbono y energía fue la pluma de ave, logrando alcanzar una concentración máxima de biomasa de las cepas C1.S de 0,1994 mg/mL y C6.1 con 0,1612 mg/mL respectivamente, cantidades menores en comparación con los hallazgos realizados por Macedo et al., (2002), quienes reportaron una cantidad de biomasa más alta con una concentración de 2,34 mg/mL en 44 horas de fermentación de hidrolisis de plumas de aves de corral usando al microorganismo *Bacillus* spp. realizadas en Venezuela, esta diferencia podría deberse a las condiciones ambientales a las que fueron sometidas los microorganismos aislados del vertedero clandestino del CC.PP. de Condoray y no hayan sido las adecuadas para su desarrollo óptimo y aumento significativo de biomasa en las fermentaciones realizadas en el presente trabajo de investigación. Igualmente lo demuestran Bertsch et al., (2003) con un contenido final de biomasa de 2,64 mg/mL proveniente del caldo de fermentación de plumas utilizando como único microorganismo queratinofílico a *Kocuria rosea* una bacteria Gram positiva. Así mismo, Piñero et al., (2000) muestran en sus resultados una concentración de biomasa similar a los autores antes mencionados en su aislamiento y caracterización usando a *Bacillus* spp. con una concentración de biomasa de 1,6 mg/mL e incubadas a 35 – 40 °C lo que indica diferencias de condiciones de cultivo con la presente investigación, con respecto a la temperatura, lo que probablemente influyó en el aumento de biomasa en un tiempo de cultivo de 72 horas. Además, las cepas C8.1 y C1.1 presentaron las más bajas concentraciones de biomasa con 0,1030 y 0,0990 mg/mL respectivamente, estos resultados sugieren que podrían optimizarse las condiciones de cultivo para mejorar las características queratinofílicas de los microorganismos aislados y mejorar la magnitud de plumas degradadas.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la identificación molecular de las cepas C1.S y C6.1, que presentaron la mayor eficiencia en el incremento de la concentración de biomasa, ya que todas las cepas no presentaron una diferencia significativa para degradar la queratina, se tomó el criterio de biomasa con

respecto a los aminoácidos para decidir su proceso de identificación molecular, dejando de lado las cepas bacterianas C8.1 y C1.1. La identificación de las cepas C1.S y C6.1 fue realizada por la empresa “Umbrella Genomics Company” ubicados en la ciudad de Lima, mediante la extracción de ADN, cuantificación de ADN, amplificación de ADN 16S, revelado de ADN por electroforesis, secuenciación de gen 16S y análisis de secuencias de Oxford Nanopore Technologies; como resultado final identifica a las dos cepas como pertenecientes al género *Bacillus* y ambas de la especie *Bacillus sanguinis*; estos resultados son contrastables con la identificación molecular de las cepas aisladas por Juárez, (2012), quien utilizó también una extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen 16S encontrando una homología del 87% con el género *Bacillus* utilizando la herramienta BLAST que encuentra similitud en las regiones entre secuencias biológicas a través de nucleótidos de ADN.

Por otro lado, el género *Bacillus* viene siendo una de las taxonomías más diversas y encontradas en diferentes muestras de suelo y plumas como lo mencionan Zorro y Catalina, (2019), quienes lograron aislar e identificar a tres cepas bacterianas Gram positivas de las cuales dos pertenecen al género *Bacillus* de las especies *B. circulans* y *B. subtilis*, además; Cuti y Vargas (2023), también encontraron a bacterias del género *Bacillus* identificadas con pruebas bioquímicas y tinción de Gram, con capacidades degradadoras de queratina.

Finalmente *Bacillus sanguinis* fue descrito por primera vez por Tohya et al., (2021), en muestras de sangre en Japón y reconocida como especie en el 2022 que describe a esta especie como bacterias Gram positivas y una variación de especie dentro del grupo de *Bacillus cereus* que se encuentran en el ambiente como lo mencionan Sánchez et al., (2016), al indicar que estas producen esporas que les permiten ser resistentes a condiciones adversas en el medio en el que habitan brindándoles la capacidad de resistir en el tiempo, lo que indicaría su presencia en el vertedero clandestino de plumas de pollo, por otro lado; este resultado sugiere la existencia de *Bacillus sanguinis* posiblemente en la sangre de los pollos quienes son sacrificados para el consumo humano que poseen la capacidad de producir enzimas que degradan la queratina lentamente en las condiciones en las que se encuentran. Estos hallazgos permiten el inicio de investigaciones futuras sobre las capacidades de esta bacteria y su capacidad queratinofílica que puedan incrementarse con la optimización de condiciones de laboratorio en la reducción de tiempo generando mayores cantidades de concentración de aminoácidos en el

menor tiempo posible como lo indica Abril (2020), y que puedan ser utilizadas en las industrias biotecnológicas, ganaderas y sintéticas, para reducir el impacto ambiental que producen los desechos de plumas.

VI. CONCLUSIONES

1. Las cepas bacterianas queratinofílicas: C8.1, C1.1, C6.1 y C1.S, presentaron las siguientes características culturales en sus colonias: C8.1 de forma circular con borde entero, elevación plana, superficie cremosa, color crema, transparencia opaca y textura lisa; C1.1 forma circular de borde entero con una elevación plana, superficie cremosa, color blanquecino, transparencia translúcida y textura lisa; y las cepas C6.1 y C1.S formas circulares de borde entero con una elevación convexa, superficie cremosa, color blanquecino, transparencia translúcida y textura rugosa. Todas Gram positivas.
2. Las cepas bacterianas en 35 días produjeron en el medio, concentraciones de aminoácidos de: cepa C8.1 con 0,00182 mg/mL, cepa C1.1 con 0,00186 mg/mL, cepa C6.1 de 0,00189 mg/mL y la cepa C1.S de 0,00194 mg/mL respectivamente. Todas presentaron una coloración ligeramente azul – púrpura.
3. Las cepas bacterianas en 35 días produjeron en el medio, concentraciones de biomasa de: cepa C8.1 con 1030 mg/mL, cepa C1.1 con 0,0990 mg/mL, cepa C6.1 con 0,1612 y la cepa C1.S con 0,1994 mg/mL.
4. Las cepas aisladas y seleccionadas fueron identificadas como bacterias queratinofílicas del género *Bacillus* de la especie *B. sanguinis*.

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar con esta línea de investigación en la determinación de la capacidad degradadora de queratina en plumas de aves de corral por bacterias queratinofílicas, en el laboratorio en diferentes condiciones.
- Realizar trabajos de investigación haciendo uso de diferentes parámetros para optimizar la degradación de plumas de aves por las bacterias queratinofílicas.
- Determinar la degradación de queratina de pluma con el uso de las bacterias previamente identificadas como queratinofílicas para obtener mejores resultados.
- Aumentar el tiempo de incubación para la degradación de queratina con plumas enteras o cortadas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

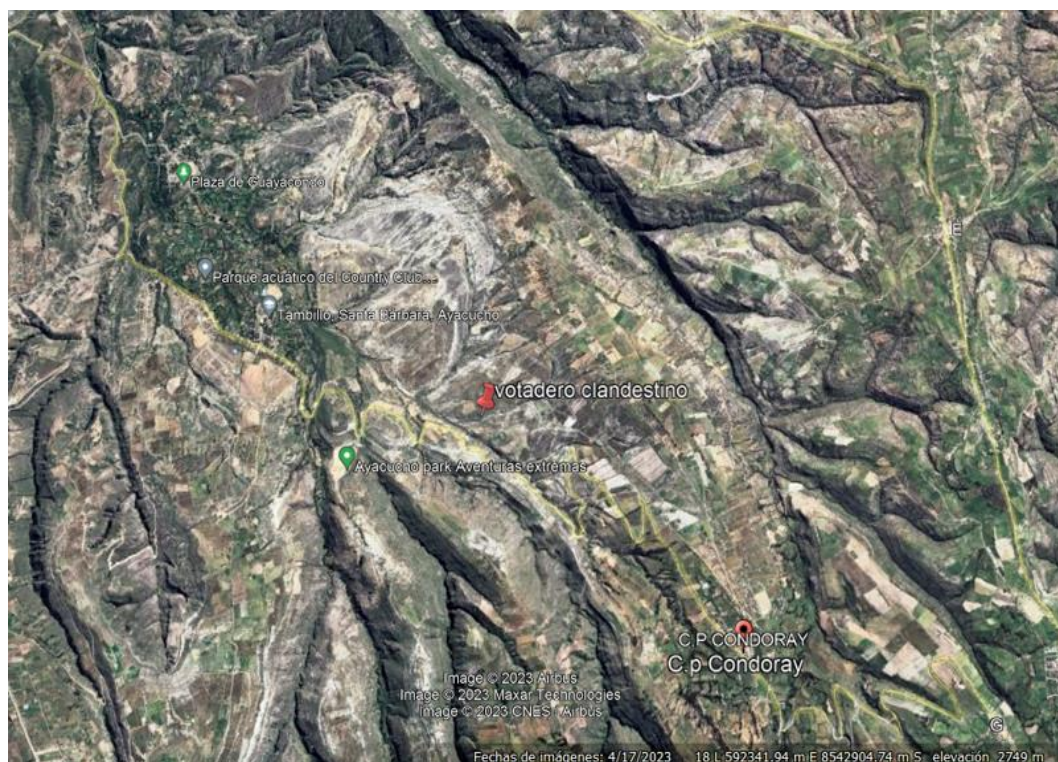
- Abril, A. L. (2020). *Elaboración de bioplástico de queratina obtenida de residuos de plumas de aves de corral y quitosano* [bachelorThesis, Quito: Universidad de las Américas, 2020]. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/12056>
- Arnaiz, C., Isac, L., & Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos I. Métodos directos e indirectos. *Technologia del Agua*, 20, 45-52.
- Bertsch, A., Álvarez Z., R., & Coello, N. (2003). *Evaluación de la calidad nutricional de la harina de plumas fermentadas por Kocuria rosea como fuente alternativa de proteínas en la alimentación de aves*. https://www.researchgate.net/publication/242613984_EVALUACION_DE_LA_CALIDAD_NUTRICIONAL_DE_LA_HARINA_DE_PLUMAS_FERMENTADAS_POR_Kocuria_rosea_COMO_FUENTE_ALTERNATIVA_DE_PROTEINAS_EN_LA_ALIMENTACION_DE_AVES_Nutritional_Evaluation_of_Kocuria_rosea_Fermen
- Bonilla, J. (2010). *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias*. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14695>
- Cavello, I. (2013). *Queratinasas microbianas: Microorganismos, producción y caracterización* [Doctor en Ciencias Exactas, área Química, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/32430>
- Cuti, V., & Vargas, Y. (2023). Tratamiento de residuos orgánicos (plumas) generados en centros de faenamiento avícola a partir de compostaje optimizado con bacterias queratinolíticas, Arequipa 2020. *Universidad Católica de Santa María*. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/12581>
- Espino, B., Tenorio, V., Hernández, A., & Montes, G. (2019). *Determinación de la actividad queratinolítica en la degradación de plumas de pollo*. https://congresos.cio.mx/16_enc_mujer/cd_congreso/archivos/resumenes/S4/S4-BCA02.pdf
- Ferrareze, P., Correa, A., & Brandelli, A. (2016). Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.009>
- Friedman, M. (2004). Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385-406. <https://doi.org/10.1021/jf030490p>
- Google, E. (2024). *Coordenadas Centro Poblado de Condoray*. <https://earth.google.com/web/search/Tambillo,+Ayacucho/@-13.1964101,-74.14286995,3006.59895391a>
- Google, M. (2024). *Centro Poblado de Condoray*. <https://www.google.com/maps/@-13.160246,-74.2259916,14z?entry=ttu>
- Hernández, L. (2020). *Estrategia biotecnológica para la biodegradación de la pluma de pollo con bacterias productoras de enzimas queratinasas*.

- <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/10017>
- Huang, Y., Lezyk, M., Herbst, F., Busk, P., & Lange, L. (2020). Novel keratinolytic enzymes, discovered from a talented and efficient bacterial keratin degrader. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66792-2>
- Ibáñez, I., Carnero, A., Ruiz, I., Padilla, M., & Caballero, P. (2004). Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de «*Bacillus thuringiensis*» procedentes de muestras de tierra de Canarias. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 30(4), 703-712.
- Juárez, J. (2012). *“Búsqueda e identificación de microorganismos”*. 56.
- Kazilek, C. (2017). *Biología de las Plumas* [Text]. <https://askabiologist.asu.edu/explore/biologia-de-las-plumas>
- Loja, M. (2015). *Utilizando queratinasas producidas por Bacillus spp.* 76.
- Macedo, M., Segura, R., Bonilla, J., & Coello, N. (2002). Obtención de un hidrolizado proteico por fermentación sumergida de plumas utilizando *Bacillus* spp. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 12(3), 214-221.
- Mesias, M., Piontelli, E., Fernández, E., Siegel, M., & Solari, A. (2019). Proteasas (queratinasas) extracelulares en cepas fúngicas queratinofílicas aisladas de suelos chilenos: Estudio preliminar. *Boletín Micológico*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.1988.4.1.1681>
- Molecular, D. (2023, julio). *Absorbancia*. <https://es.moleculardevices.com/technology/absorbance>
- Montes, L. (2020). *Caracterización bioquímica de la proteasa producida por Bacillus licheniformis LB04* [Masters, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/22380/>
- OCBEC. (2022, octubre). 1.8: *Diluciones en Serie y Curva Estándar*. LibreTexts Español. https://espanol.libretexts.org/Biologia/Biotecnolog%C3%ADa/Manual_de_Laboratorio%3A_Introducci%C3%B3n_a_la_Biotecnolog%C3%ADa/01%3A_T%C3%A9cnicas/1.08%3A_Diluciones_en_Serie_y_Curva_Est%C3%A1ndar
- Pathange, P., Jayalakshmi, S., & Sreeramulu, K. (2010). Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 625-633. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2499-1>
- Piñero, J., Vidal, L., & Coello, N. (2000). Aislamiento y caracterización de una cepa de *Bacillus* spp degradadora de plumas de aves de corral. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 10(2), 124-130.
- RAE, (2023). *Amino | Diccionario de la lengua española*. «Diccionario de la lengua española» - Edición del Tricentenario. <https://dle.rae.es/amino>
- Riffel, A., & Brandelli, A. (2006). Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3), 395-399. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300036>
- Rofner, F. (2019). Plumage: Environmental impact and use in the industry

- agropecuaria. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 21(3), 225-237.
<https://doi.org/10.18271/ria.2019.480>
- Sánchez, J., Correa, M., & Castañeda, L. (2016). *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2), 230-242.
- Sarita, A., y Wadhwa, N. (2010). Degradation of Chicken Feather a Poultry Waste Product by Keratinolytic Bacteria Isolated from Dumping Site at Ghazipur Poultry Processing Plant. *International Journal of Poultry Science*, 9. <https://doi.org/10.3923/ijps.2010.482.489>
- Suzuki, Y., Tsujimoto, Y., Matsui, H., & Watanabe, K. (2006). Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(2), 73-81.
<https://doi.org/10.1263/jbb.102.73>
- Tohya, M., Hishinuma, T., Watanabe, S., Shimojima, M., Ogawa, M., Tada, T., & Kirikae, T. (2021). Three novel species of the *Bacillus cereus* group isolated from clinical samples in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(9). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004993>
- UNAM. (2016). *Aminoácidos y proteínas*.
https://www.unam.mx/resultados?as_q=aminoacidos
- Valencia, M. (2018). *Obtención de queratina a partir de plumas de la industria avícola mediante hidrólisis enzimática*.
https://rraae.cedia.edu.ec/Record/UDLA_7d113bf0056a1d386992ebd912fb5f4f
- Vocero, I. (2023, junio 20). *Vertederos clandestinos, un desafío para varios municipios*. El Vocero de Puerto Rico.
https://www.elvocero.com/gobierno/municipal/vertederos-clandestinos-un-desaf-o-para-varios-municipios/article_da691fe6-0ef8-11ee-8c32-e348fc289649.html
- Zorro, R., & Catalina, P. (2019). *Evaluación de diferentes cepas queratinolíticas en la hidrólisis de plumas de pollo*.
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77074>

ANEXOS

Anexo 1. Fotografía geográfica de la zona de muestreo en el CC.PP. de Condoray, tomadas con el programa Google earth. Ayacucho – 2023.



Anexo 2. Toma de muestras de suelo y plumas del vertedero clandestino en el CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.



Anexo 3. Composición del medio Bushnell Hass. Ayacucho – 2023.

Ingredientes	Cantidad
KH ₂ PO ₄ Fosfato monopotásico	1 g/L
K ₂ HPO ₄ Fosfato dipotásico	1 g/L
MgSO ₄ . 7H ₂ O Sulfato de magnesio	0,2 g/L
CaCl ₂ Cloruro de calcio	0,02 g/L
NH ₄ NO ₃ Nitrato de amonio	1 g/L
FeCl. 6H ₂ O Cloruro de Hierro	0,05 g/L

Nota: llevar a 1 litro con agua destilada, ajustar el pH a 7.0, homogenizar bien. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb/pulg² por 15 minutos.

Anexo 4. Matraces con medio Bushnell Hass y muestras de suelo y pluma del CC.PP. de Condoray. Ayacucho – 2023.



Anexo 5. Rotación de los matraces con medio Bushnell Hass y muestras de suelo y pluma a 100 rpm por 7 días. Ayacucho – 2023.



Anexo 6. Composición del medio salino basal (MBS). Ayacucho – 2023.

Ingredientes	Cantidad
KH ₂ PO ₄ Fosfato monopotásico	0,3 g/L
K ₂ HPO ₄ Fosfato dipotásico	0,4 g/L
MgCl ₂ Hexahidratado	0,1 g/L
NaCl ₂ Cloruro de sodio	0,5 g/L
NH ₄ Cl Cloruro de amonio	0,5 g/L

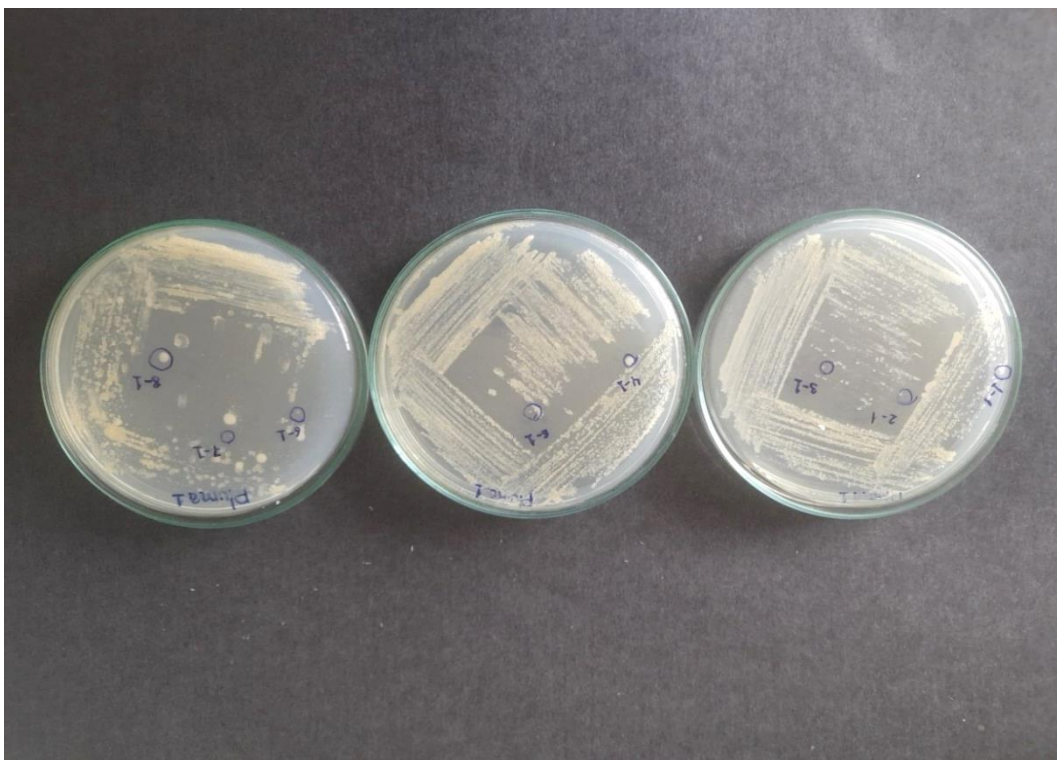
Nota: llevar a 1 litro con agua destilada, ajustar el pH a 7.0, homogenizar bien. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb/pulg² por 15 minutos.

Anexo 7. Observación microscópica de la coloración de Gram del cultivo mixto, después de 15 días de adaptación a sustrato de plumas. Ayacucho – 2023.



A: células con forma de bacilos cortos, color violeta, B: células con forma de bacilos largos, color violeta.

Anexo 8. Crecimiento de bacterias en medio de agar nutritivo (AN) sembrado por agotamiento en superficie. Ayacucho – 2023.



Anexo 9. Crecimiento de cuatro cepas (C8.1, C1.1, C6.1 y C1.S) bacterianas en medio de agar pluma ave (APA). Ayacucho – 2023.



Anexo 10. Filtración de los tratamientos en el equipo de succión con bomba al vacío.
Ayacucho – 2023.



Anexo 11. Datos de la medición de absorbancias (Abs) de biomásas de las cuatro cepas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.

Tiempo (días)	C8.1	C1.1	C6.1	C.1.S	blanco
0	0.097	0.041	0.053	0.057	0.000
	0.074	0.054	0.065	0.069	0.000
	0.077	0.058	0.061	0.063	0.000
5	0.094	0.022	0.001	0.013	0.000
	0.076	0.002	0.008	0.022	0.000
	0.065	0.006	0.003	0.048	0.000
10	0.195	0.089	0.091	0.083	0.000
	0.178	0.108	0.187	0.088	0.000
	0.173	0.170	0.096	0.094	0.000
15	0.247	0.124	0.103	0.095	0.000
	0.204	0.100	0.101	0.091	0.000
	0.212	0.201	0.088	0.204	0.000
20	0.253	0.110	0.162	0.087	0.000
	0.204	0.064	0.095	0.089	0.000
	0.293	0.053	0.213	0.212	0.000
25	0.220	0.109	0.099	0.081	0.000
	0.165	0.068	0.154	0.079	0.000
	0.215	0.207	0.109	0.230	0.000
30	0.237	0.160	0.109	0.200	0.000
	0.204	0.146	0.229	0.259	0.000
	0.237	0.248	0.231	0.201	0.000
35	0.281	0.185	0.102	0.313	0.000
	0.167	0.145	0.100	0.370	0.000
	0.257	0.240	0.309	0.187	0.000

Anexo 12. Datos de medición de las concentraciones de biomasas (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.

Tiempo (días)	C8.1	C1.1	C6.1	C1.S	blanco
0	0.0455	0.0290	0.0531	0.0486	0.00000
	0.0359	0.0315	0.0679	0.0563	0.00000
	0.0371	0.0370	0.0644	0.0524	0.00000
5	0.0442	0.0201	0.0112	0.0201	0.00000
	0.0367	0.0107	0.0174	0.0259	0.00000
	0.0321	0.0125	0.0130	0.0427	0.00000
10	0.0863	0.0516	0.0909	0.0654	0.00000
	0.0792	0.0605	0.1760	0.0686	0.00000
	0.0771	0.0896	0.0954	0.0725	0.00000
15	0.1080	0.0680	0.1016	0.0732	0.00000
	0.0901	0.0567	0.0998	0.0706	0.00000
	0.0934	0.1042	0.0883	0.1438	0.00000
20	0.1105	0.0614	0.1538	0.0680	0.00000
	0.0901	0.0398	0.0945	0.0693	0.00000
	0.1272	0.0346	0.1990	0.1489	0.00000
25	0.0967	0.0610	0.0980	0.0641	0.00000
	0.0738	0.0417	0.1468	0.0628	0.00000
	0.0947	0.1070	0.1069	0.1606	0.00000
30	0.1038	0.0849	0.1069	0.1412	0.00000
	0.0901	0.0783	0.2132	0.1794	0.00000
	0.1038	0.1263	0.2150	0.1418	0.00000
35	0.1222	0.0967	0.1007	0.2143	0.00000
	0.0746	0.0779	0.0989	0.2513	0.00000
	0.1122	0.1225	0.2841	0.1327	0.00000

Anexo 13. Datos de la medición de absorbancias (Abs) de grupos aminos libres (GAL) producidas por las cuatro cepas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.

Tiempo (días)	C8.1	C1.1	C6.1	C1.S	blanco
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.024	0.000	0.004	0.004	0.000
	0.015	0.004	0.001	0.003	0.000
	0.003	0.007	0.001	0.001	0.000
15	0.022	0.029	0.018	0.018	0.000
	0.022	0.026	0.022	0.020	0.000
	0.037	0.017	0.021	0.010	0.000
20	0.012	0.054	0.009	0.023	0.000
	0.032	0.019	0.029	0.021	0.000
	0.030	0.054	0.033	0.037	0.000
25	0.029	0.036	0.027	0.032	0.000
	0.044	0.059	0.030	0.040	0.000
	0.038	0.049	0.031	0.050	0.000
30	0.036	0.049	0.075	0.074	0.000
	0.037	0.047	0.095	0.109	0.000
	0.047	0.039	0.061	0.130	0.000
35	0.078	0.059	0.066	0.087	0.000
	0.046	0.069	0.097	0.081	0.000
	0.057	0.080	0.062	0.093	0.000

Anexo 14. Datos de medición de las concentraciones de aminoácidos (mg/mL) producidas por las cuatro cepas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.

Tiempo (días)	C8.1	C1.1	C6.1	C1.S	blanco
0	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
5	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
10	0.00167	0.00000	0.00158	0.00158	0.00000
	0.00163	0.00158	0.00157	0.00158	0.00000
	0.00158	0.00159	0.00157	0.00157	0.00000
15	0.00166	0.00169	0.00164	0.00164	0.00000
	0.00166	0.00167	0.00166	0.00165	0.00000
	0.00172	0.00164	0.00165	0.00161	0.00000
20	0.00162	0.00179	0.00160	0.00166	0.00000
	0.00170	0.00164	0.00169	0.00165	0.00000
	0.00169	0.00179	0.00170	0.00172	0.00000
25	0.00169	0.00172	0.00168	0.00170	0.00000
	0.00175	0.00181	0.00169	0.00173	0.00000
	0.00173	0.00177	0.00165	0.00178	0.00000
30	0.00172	0.00177	0.00188	0.00188	0.00000
	0.00172	0.00176	0.00197	0.00202	0.00000
	0.00176	0.00173	0.00182	0.00211	0.00000
35	0.00189	0.00181	0.00182	0.00185	0.00000
	0.00176	0.00186	0.00195	0.00198	0.00000
	0.00181	0.00190	0.00190	0.00199	0.00000

Anexo 15. Prueba de análisis de varianza (ANOVA) de la biomasa (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas por cada tiempo de incubación. Ayacucho – 2023.

ANOVA						
	Tiempo (días)	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
0	Entre grupos	.000	4	.000	97.329	<.001
	Dentro de grupos	.000	10	.000		
	Total	.000	14			
5	Entre grupos	.000	4	.000	15.495	<.001
	Dentro de grupos	.000	10	.000		
	Total	.000	14			
10	Entre grupos	.000	4	.000	10.435	.001
	Dentro de grupos	.000	10	.000		
	Total	.000	14			
15	Entre grupos	.000	4	.000	10.585	.001
	Dentro de grupos	.000	10	.000		
	Total	.000	14			
20	Entre grupos	.000	4	.000	9.283	.002
	Dentro de grupos	.000	10	.000		
	Total	.000	14			
25	Entre grupos	.000	4	.000	5.912	.010
	Dentro de grupos	.000	10	.000		
	Total	.000	14			
30	Entre grupos	.000	4	.000	5.327	.016
	Dentro de grupos	.000	10	.000		
	Total	.000	14			
35	Entre grupos	.000	4	.000	4.704	.021
	Dentro de grupos	.000	10	.000		
	Total	.000	14			

Anexo 16. Prueba de Tukey de la biomasa (mg/mL) de las cuatro cepas queratinofílicas por cada tiempo de incubación. Ayacucho – 2023.

Tiempo (días)	Cepa	N° de repeticiones	Subconjuntos para $\alpha = 0.05$		
			1	2	3
0	C.8.1	3		B	
	C1.1	3		B	
	C6.1	3	A		
	C1.S	3	A		
	B	3			C
5	C.8.1	3	A		
	C1.1	3		B	C
	C6.1	3		B	C
	C1.S	3	A	B	
	B	3			C
10	C.8.1	3		B	
	C1.1	3		B	
	C6.1	3		B	
	C1.S	3		B	
	B	3			C
15	C.8.1	3		B	
	C1.1	3		B	
	C6.1	3		B	
	C1.S	3		B	
	B	3			C
20	C.8.1	3	A	B	
	C1.1	3		B	C
	C6.1	3	A		
	C1.S	3	A	B	
	B	3			C
25	C.8.1	3		B	
	C1.1	3		B	C
	C6.1	3		B	
	C1.S	3		B	
	B	3			C
30	C.8.1	3			
	C1.1	3		B	C
	C6.1	3		B	
	C1.S	3		B	
	B	3			C
35	C.8.1	3		B	C
	C1.1	3		B	C
	C6.1	3		B	C
	C1.S	3		B	
	B	3			C

Anexo 17. Prueba de análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de aminoácidos (mg/mL) de cuatro cepas queratinofílicas en el día 35 de incubación. Ayacucho – 2023.

ANOVA					
Aminoácidos					
	gl	Suma Cuadrática	Media Cuadrática	F	Sig.
Factor	3	0.000	0.000	1.86	0.214
Error	8	0.000	0.000		
Total	11	0.000			

Anexo 18. Procedimiento de la identificación molecular de las cepas C1.S y C6.1 mediante la técnica de PCR y secuenciación genómica. Lima – 2023.

Extracción de ADN

Añadir al pellet 100 uL de Buffer BE y resuspender.

Se transfirió la suspensión celular al tubo MN Bead Tube Type B.

Se añadió 40 uL de Buffer MG. Luego, se adicionó 10 uL de Proteinase K.

Se agitó el tubo MN Bead Tube en un vortex por

Se centrifugó el MN BEad Tube por 30 segundos a 11,000g

Se añadió 600 uL de buffer MG y se mezcló por vórtex brevemente.

Se transfirió el sobrenadante a una columna Nucleospin Microbial DNA column.

Se centrifugó por 30 segundos a 11,000g. Se descartó el filtrado.

Se añadió 500 uL de Buffer BW y se centrifugó por 30 segundos a 11,000 g. Se descartó el filtrado.

Se añadió 500 uL de Buffer B5 y se centrifugó por 30 segundos a 11,000g. Se descartó el filtrado.

Se centrifugó la columna a 11,000g por 30 segundos.

Se añadió 100 uL de Elution Buffer BE. Se incubó por 1 minuto y luego se centrifugó a 30 segundos a 11,000g.

Cuantificación de ADN

Se realizó mediante la determinación de concentración de ADN extraído [ng/uL]

Amplificación de ADN 16S

Se amplificó el ADN de los microorganismos extraídos mediante reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos específicos 27F y 1492R.

Revelado de ADN por electroforesis

El revelado de ADN se realizó mediante electroforesis en agarosa al 2% utilizando Buffer TAE.

Secuenciación de gen 16S

Se realizó siguiendo el protocolo del

fabricante:

Se preparó una cantidad de 10 ng por cada muestra.

Se preparó una reacción de amplificación. Cada amplicon se purificó con un volumen igual de perlas magnéticas

Se incubó por 5 minutos en un rotador.

Se dejó reposar en un rack magnético por 5 minutos.

Se realizó dos lavados con etanol al 80%.

Se eluyó al final en 11 uL de Buffer

Se agregó 1 uL de RAP

Se colocó la celda de flujo R9.4.1. en el dispositivo secuenciador

Se pasó control de calidad a la celda de flujo.

Se preparó priming mix (1170 de Buffer FB y 30 uL de Buffer FLT)

Se añadió 800 uL de priming mix a través del priming port en la celda de flujo.

Se incubó por 5 minutos.

Se destapó el SpotOn sample

Se añadió 200 uL de priming mix a través del priming port.

Se añadió 75 uL de librería acondicionada a través del Spot ON sample.

Se configura el secuenciamiento y se ejecuta.

Análisis de secuencias de Oxford Nanopore Technologies

Los archivos fastq por cada barcode fueron trabajados en la plataforma web nanoGalaxy.

Se utilizó el programa Porechop para la remoción de adaptadores y el programa Filtlong para filtrar las secuencias en base a calidad y longitud

Se utilizó el programa Medaka para corrección de bases y generar un consenso

Anexo 19. Análisis de secuenciación genómica de Oxford Nanopore Technologies de la cepa C1.S, realizada con el programa Medaka para corrección de bases. Ayacucho – 2023.



Cepa 1S

TAGAGTTTGTATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG
TCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA
ATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTG
TCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCGAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTCGGGTGCTAAAC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCAGCACCTTGACGG
TACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGGTGGAGGGGCATTGAAAAGTGGG
AGACTTGAGTGCGAGAAGAGGAAAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATATGGAGGAACACAGTGCGGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACT
GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAA
CGCATTAAAGCCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATCGAAGCAACGCG
AAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCT
TCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACAGCTCGTGTGCTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAA
TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
TCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTA
CAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGGGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTC
GGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACC
ACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGC
CTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAA
CCTGCGGCTGGATCACC



Dirección: Emilio Althaus 576, Lince
Celular: +51 925708785

Página web: www.ugenomics.pe
Correo electrónico: ventas@ugenomics.pe

Anexo 20. Análisis de secuenciación genómica de Oxford Nanopore Technologies de la cepa C6.1, realizada con el programa Medaka para corrección de bases. Ayacucho – 2023.



Cepa 6.1

```
TTTATTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAC
ATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCT
TCGGCTGTCATTATGGATGGACCCGCGTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTC
GTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGA
CGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTT
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTG
GGAGACTTGAGTGCAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTAC
ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGT
TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAAC
GCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTC
TCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCAT
TAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC
GGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCA
GTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC
GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA
CACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGC
CGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTATCG
GAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTCT
```

Lina Alberta Salcedo Rojas
Lic. en Biología
C.B.P. 18195

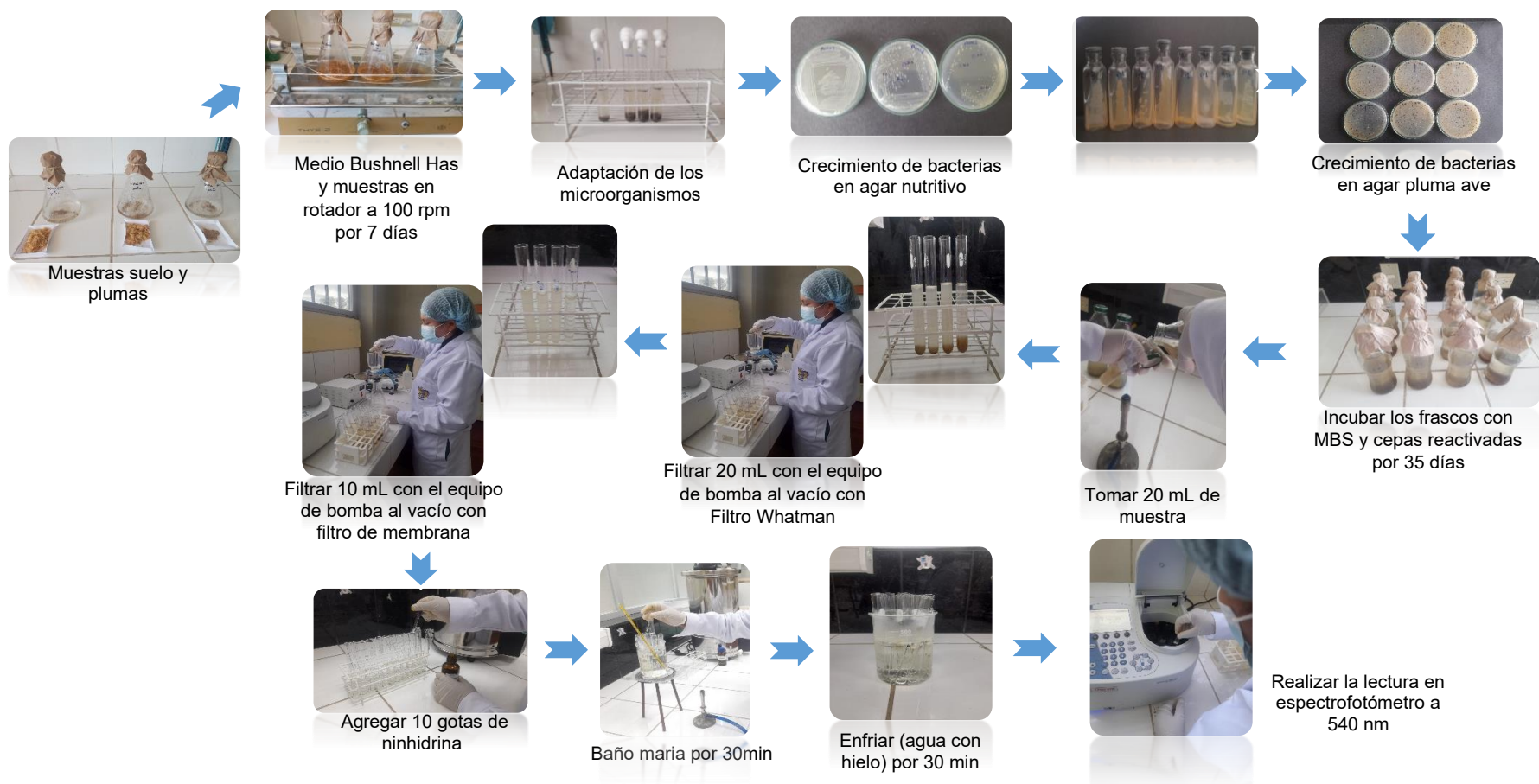
Dirección: Emilio Althaus 376, Lince
Celular: +51 925708785

Página web: www.ugenomics.pe
Correo electrónico: ventas@ugenomics.pe

Anexo 21. Flujograma del procedimiento para la determinación de la concentración de Biomasa (mg/mL) de las cepas bacterianas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.



Anexo 22. Flujograma del procedimiento para la determinación de la concentración de aminoácidos (mg/mL) de las cepas bacterianas queratinofílicas. Ayacucho – 2023.



Anexo 23. Matriz de consistencia.

Título : Bacterias queratinofílicas en los vertederos clandestinos de plumas, Ayacucho del 2021

Autor : Bach. CORAS CISNEROS, Liz Annelly.

Asesor : Dr. CHUCHÓN MARTÍNEZ, Saúl Alonso

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
¿Cuáles son las bacterias con capacidad queratinofílica aisladas del vertedero clandestino de plumas de aves de corral de granjas avícolas, ubicado en el CC.PP. de Condoray, Ayacucho en el año 2023?	GENERAL Identificar bacterias con capacidad queratinofílica aisladas del vertedero clandestino de plumas de aves de corral de granjas avícolas, ubicado en el CC.PP. de Condoray, Ayacucho en el año 2023.	Marco conceptual - Proteína - Aminoácidos - Queratinas - Enzimas - Proteasas - Queratinasas - Enlace disulfuro	Por el tipo de investigación no presenta hipótesis.	VARIABLES DE ESTUDIO - Cepas bacterianas - Capacidad queratinofílica.	TIPO DE INVESTIGACIÓN - Descriptiva
	ESPECIFICOS - Caracterizar el crecimiento de bacterias con capacidad queratinofílica en agar pluma ave (APA), aisladas del vertedero clandestino de plumas de aves de corral de granjas avícolas, ubicado en el CC.PP. de Condoray, Ayacucho en el año 2023. - Estimar la capacidad degradadora de las cepas bacterianas con la técnica de ninhidrina a través de la medición de absorbancia, aisladas del vertedero clandestino de plumas de aves de corral de granjas avícolas, ubicado en el CC.PP. de Condoray, Ayacucho en el año 2023. - Identificar hasta nivel de género y especie las cepas bacterianas con capacidad queratinofílica aisladas del vertedero clandestino de plumas de aves de corral de granjas avícolas, ubicado en el CC.PP. de Condoray, Ayacucho en el año 2023.	Teorías y enfoques - Plumitas de pollo. - Complejidad estructural de las plumas. - Composición de las plumas. - Microorganismos más frecuentes que presentan capacidad queratinofílica. - Proceso degradativo de la queratina por microorganismos bacterianos. - Uso potencial de plumas de aves. - Técnica de ninhidrina.		INDICADORES - Cepa bacteriana - Características culturales - Biomasa bacteriana - Concentración de aminoácidos - Categoría taxonómica	NIVEL DE INVESTIGACIÓN - Básico MUESTREO Población y muestra Está conformada por 500 g de suelo y 2 cúmulos de plumas de 155 y 200 g respectivamente Análisis estadístico Se hará uso de Excel, la prueba de ANOVA y pruebas de Tukey con una confianza del 95%

**UNSCH****FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. Liz Annelly CORAS CISNEROS
RESOLUCIÓN DECANAL N° 096-2024-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del ocho de marzo del año dos mil veinticuatro; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, presidido por el Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA; Dr. Serapio ROMERO GAVILÁN (Miembro-Jurado); Mg. Ruth Elsa HUAMÁN DE LA CRUZ (Miembro-Jurado); Dr. Saúl Alonso CHUCHÓN MARTÍNEZ (Miembro-Asesor); Mg. Rilder Nemesio GASTELÚ QUISPE (Miembro – 4to Jurado) actuando como secretario docente el Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR; para presenciar la sustentación de tesis titulada: **Bacterias queratinofílicas en los vertederos clandestinos de plumas, Ayacucho del 2021** ; presentado por la Bach. **Liz Annelly CORAS CISNEROS**; el Presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio al acto de sustentación, indicando a la sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología. Culminada la exposición, el Presidente invitó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas a la sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó a la sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Serapio ROMERO GAVILÁN	17	16	17
Mg. Ruth Elsa HUAMÁN DE LA CRUZ	17	17	17
Mg. Rilder Nemesio GASTELÚ QUISPE	16	16	16
PROMEDIO FINAL			17

La sustentante alcanzó el promedio de 17 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso de la sustentante y el público al Auditorio dando a conocer los resultados e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las seis y treinta de la tarde; firmando al pie del presente en señal de conformidad.

Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA
Presidente

Dr. Serapio ROMERO GAVILÁN
Miembro - Jurado

Mg. Ruth Elsa HUAMÁN DE LA CRUZ
Miembro – Jurado

Mg. Rilder Nemesio GASTELÚ QUISPE
Miembro – 4to Jurado

Dr. Saúl Alonso CHUCHÓN MARTÍNEZ
Miembro – Asesor

Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR
Secretario Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

Nº 31-2024-FCB-D

Yo, FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Bacterias queratinofílicas en los vertederos clandestinos de plumas, Ayacucho del 2021** por LIZ ANNELLY CORAS CISNEROS; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 18%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario Nº 039-2021-UNSCH-C.

En consecuencia, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 02 de marzo de 2024.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Escuela Profesional de Biología
Dr. Fidel R. Mujica Lengua
DIRECTOR

Bacterias queratinofílicas en los vertederos clandestinos de plumas, Ayacucho del 2021

por Liz Annelly Coras Cisneros

Fecha de entrega: 02-abr-2024 10:03a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2337946571

Nombre del archivo: CORAS-CISNEROS-Liz-Annelly-pregrado_Tesis-2024_TURNITIN.pdf (675.73K)

Total de palabras: 9601

Total de caracteres: 48656

Bacterias queratinofílicas en los vertederos clandestinos de plumas, Ayacucho del 2021

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

17%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

bdigital.unal.edu.co

Fuente de Internet

5%

2

sedici.unlp.edu.ar

Fuente de Internet

4%

3

repositorio.uaaan.mx:8080

Fuente de Internet

3%

4

congresos.cio.mx

Fuente de Internet

1%

5

repositorio.unasam.edu.pe

Fuente de Internet

1%

6

pt.scribd.com

Fuente de Internet

1%

7

www.scielo.org.pe

Fuente de Internet

1%

8

Submitted to Universidad Tecnologica del
Peru

Trabajo del estudiante

<1%

9

es.scribd.com

Fuente de Internet

<1 %

10

webdelprofesor.ula.ve

Fuente de Internet

<1 %

11

Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS

Trabajo del estudiante

<1 %

12

repositorio.unsch.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

13

eprints.ucm.es

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo