



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

**DIVERSIDAD DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN UN CULTIVO ENRIQUECIDO  
DE SUELO DE PÁRAMO Y GLACIAR DEL PARQUE NACIONAL NATURAL LOS NEVADOS**

**PAOLA ANDREA PALACIOS JARAMILLO**

**Director:**

**JOSE SALVADOR MONTAÑA LARA**

**Codirector:**

**DANIEL ENRIQUE BORDA MOLINA**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de Microbióloga Industrial**

**BOGOTÁ, D. C  
DICIEMBRE DEL 2012**

**DIVERSIDAD DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN UN CULTIVO ENRIQUECIDO  
DE SUELO DE PÁRAMO Y GLACIAR DEL PARQUE NACIONAL NATURAL LOS NEVADOS**



**PAOLA ANDREA PALACIOS JARAMILLO**

**APROBADO**

---

**INGRID SCHULER Ph D.**  
Decana Académica

---

**JANETH ARIAS Msc.**  
Directora de Carrera

**DIVERSIDAD DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN UN CULTIVO ENRIQUECIDO  
DE SUELO DE PÁRAMO Y GLACIAR DEL PARQUE NACIONAL NATURAL LOS NEVADOS**



**PAOLA ANDREA PALACIOS JARAMILLO**

**APROBADO**

---

**JOSÉ SALVADOR MONTAÑA**  
Estudiante Ph D.  
Director

---

**DANIEL BORDA MOLINA**  
Estudiante Msc.  
Codirector

---

**WILSON TERAN Ph D.**  
Jurado

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución No 13 de julio de 1946.

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres por brindarme oportunidades como esta y por estar a mi lado apoyándome cada día, porque gracias a su amor y dedicación he podido lograr muchas de las cosas que me he propuesto.

A mi hermanita por ser la mejor del mundo, por estar siempre conmigo apoyándome y dándome de los mejores momentos llenos de alegría y ternura.

A Daniel Borda y a José Salvador Montaña por acompañarme y enriquecer mi trabajo cada día, por compartir sus conocimientos, aportarme a mi crecimiento personal y por ayudarme durante mi aprendizaje en el laboratorio de GeBix.

A María Ximena Rodríguez, por apoyarme y guiarme en muchos momentos, a Iván, a María Alejandra y a Laura, por su compañía y por haberme ensañado tantas cosas valiosas durante este tiempo.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	PÁG. 1
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	PÁG. 2
3. MARCO TEORICO.....	PÁG. 3
4. OBJETIVOS.....	PÁG. 7
5. METODOLOGÍA.....	PÁG. 8
6. RESULTADOS.....	PÁG. 11
7. DISCUSIÓN.....	PÁG. 19
8. CONCLUSIONES.....	PÁG. 24
9. RECOMENDACIONES.....	PÁG. 25
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	PÁG. 26
11. ANEXOS.....	PÁG. 32

## RESUMEN

En este estudio se aislaron 43 cepas lipolíticas, a partir de un cultivo microbiano enriquecido de muestras de suelo de páramo y glaciar del Parque Nacional Natural los Nevados (PNN). El tamizaje de las cepas sobre medios con tributirina y aceite de oliva, permitió identificar cualitativamente su capacidad lipolítica. Con el fin de estimar de forma preliminar la diversidad de bacterias lipolíticas cultivables de ambos ecosistemas, se realizó un análisis de restricción del gen ADNr 16S (ARDRA) y la secuenciación del gen completo. Los patrones de digestión obtenidos con las enzimas *AluI*, *HpaII* y *RsaI* dieron una aproximación preliminar sobre la diversidad, mientras que el análisis de las secuencias permitió por un lado identificar bacterias psicrófilas y por otro estimar de manera más precisa la diversidad en los dos ecosistemas. Empleando estas dos aproximaciones, se observó una mayor diversidad en el enriquecimiento de la muestra de glaciar. Sin embargo en los dos casos la mayoría de bacterias identificadas pertenecen al *Phylum* proteobacteria y los géneros representados corresponden a: *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia* y *Aeromonas*. La evaluación cualitativa de actividad lipolítica en medios suplementados con tributirina y aceite de oliva, mostró que las cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Ralstonia*, presentan una mayor capacidad de hidrólisis de sustratos lipídicos. Estas cepas fueron seleccionadas con el fin de realizar estudios posteriores relacionados con la determinación de la especificidad de sustrato y actividad lipolítica específica.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas lipolíticas son importantes biocatalizadores que tienen la habilidad de utilizar un amplio rango de sustratos, por lo que abarcan un espectro potencialmente alto de usos biotecnológicos. (63) Las lipasas llevan a cabo la hidrólisis de triacilglicérols, liberando el ácido graso, el diacilglicérol, el monoacilglicérol y el glicérol (49). El papel que cumplen estas enzimas, rompiendo y modificando el enlace carboxil éster de estos compuestos insolubles en agua es de gran importancia, teniendo en cuenta que los lípidos constituyen gran parte de la biomasa del planeta. (34) Las lipasas se pueden encontrar distribuidas ampliamente en la naturaleza; sin embargo las microbianas son comercialmente significantes por su bajo costo de producción, una alta disponibilidad y gran estabilidad (49).

Algunos de los procesos industriales que involucran lipasas, requieren condiciones extremas como temperaturas altas y bajas. El hecho de que bajo estas condiciones, las enzimas mesofílicas presenten inestabilidad, ha motivado la búsqueda de nuevas enzimas termoestables (63) y la selección de nuevos microorganismos capaces de producir lipasas con propiedades fisicoquímicas apropiadas para diversas aplicaciones industriales (43).

Los microorganismos adaptados a temperaturas bajas (psicrófilos) tienen la capacidad de producir lipasas que funcionan eficientemente a bajas temperaturas. Sus rangos de catálisis son altos comparados con los de las mesofílicas o termofílicas que presentan actividad baja o nula bajo esta condición. Las lipasas adaptadas a frío poseen características estructurales que les confieren un alto nivel de flexibilidad particularmente alrededor del sitio activo, reflejándose en una baja entalpía y alta actividad específica a bajas temperaturas (34).

La búsqueda de microorganismos psicrófilos lipolíticos con potencial biotecnológico, suele realizarse en ambientes extremos con bajas temperaturas (47). Son varios los estudios que reportan *screening* funcional directo para la identificación de microorganismos lipolíticos a través de estrategias de enriquecimiento microbiano empleando sustratos lipídicos (23, 71). Generalmente se parte del supuesto que los microorganismos capaces de crecer en un cultivo enriquecido con este tipo de sustratos son capaces de producir lipasas, y de ahí el interés por aislarlos e identificarlos (22).

En este contexto, el centro de genómica y bioinformática de ambientes extremos GeBiX se ha enfocado en el estudio de comunidades, organismos y enzimas de ambientes extremos del Parque Nacional Natural de los Nevados (PNN) y está particularmente interesado, a través de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental USBA, en explorar el potencial biotecnológico en estos ambientes, especialmente en la identificación de enzimas lipolíticas. Esta propuesta se encuentra enmarcada en los objetivos del GeBiX y pretendió identificar la diversidad de bacterias lipolíticas en enriquecimientos microbianos de muestras de suelo de páramo y glaciar del PNN.

Bajo esta perspectiva el presente trabajo estudió la diversidad de 43 aislamientos obtenidos a partir de enriquecimientos microbianos de muestras de suelo de páramo y glaciar a través del análisis de restricción del gen ribosomal 16S (ARDRA) y su secuenciación. El resultado de este análisis permitió la identificación de géneros como *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia* y *Dermacoccus*. Algunas cepas identificadas como *Pseudomonas psychrophila*, *Pseudomonas fragi*, *Stenotrophomonas rhizophila* y *Ralstonia pickettii* se destacaron por su capacidad lipolítica, por lo que pueden utilizarse para estudios posteriores de bioprospección.



## 2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la industria, la hidrólisis de lípidos hace parte de procesos para la elaboración de lácteos bajos en grasa, bebidas, papel, cosméticos, biodiesel, detergentes, e incluso para el tratamiento de efluentes de estas industrias (40). La demanda para adquirir tecnologías específicas y limpias para la hidrólisis de estos compuestos es alta, por lo que la búsqueda de nuevas enzimas para hidrolizar compuestos complejos como las grasas es intensiva (56).

Las enzimas lipolíticas (56) están presentes en animales, humanos y microorganismos, siendo estos últimos la fuente más importante de lipasas, útiles en procesos industriales (58). Los ambientes extremos son escenarios con gran potencial biotecnológico por ser espacios en los cuales los microorganismos se adaptan generando diversos mecanismos para enfrentarse a condiciones extremas como: elevadas o bajas temperaturas, pH (alcalino, ácido), alta salinidad, presión, radiación, entre otras. Debido a que algunas de estas condiciones son utilizadas en procesos industriales (40), uno de los retos de la biotecnología actual es desarrollar estrategias para optimizar la capacidad hidrolítica o de síntesis de algunas enzimas bajo estas condiciones particulares (11).

El primer paso en la búsqueda de lipasas termoestables está encaminado hacia la bioprospección. Este término se refiere a la exploración de la biodiversidad y el acceso a su potencial biotecnológico novedoso, brindando así un valor agregado a todo el proceso. (40).

En Colombia, uno de los esfuerzos para hacer bioprospección de enzimas en ambientes extremos se lleva a cabo en el Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos GeBiX. Dentro de los objetivos que persigue el centro, se encuentra la exploración de la diversidad microbiana de ambientes extremos (Suelos de Bosque Alto Andino, páramo y glaciar, y aguas termales) del parque Nacional Natural los Nevados con el fin de aprovechar el potencial biotecnológico de los recursos genéticos allí presentes.

La Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de La Pontificia Universidad Javeriana, que hace parte del GeBiX, está particularmente interesada en la búsqueda de enzimas lipolíticas en las comunidades microbianas de estos ambientes a través de tres aproximaciones. 1. Mediante el aislamiento de microorganismos cultivables y la identificación de la actividad enzimática de interés, en este caso actividad lipolítica. 2. Mediante la recuperación de la información genética que represente los miembros de la comunidad (metagenómica) y 3. Favoreciendo el crecimiento de aquellos microorganismos que muestren la actividad deseada, empleando sustrato lipídicos específicos (enriquecimiento microbiano) (19).

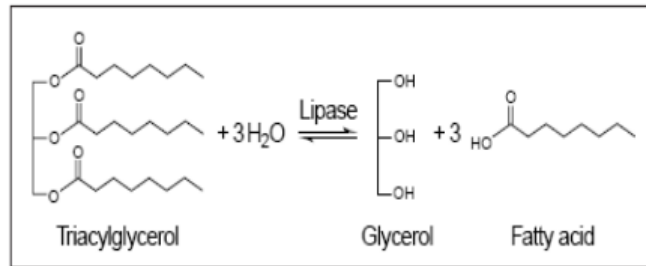
Como la posibilidad de encontrar lipasas novedosas, que no hayan sido reportadas, caracterizadas, cristalizadas, aumenta cuando la diversidad dentro del ecosistema es mayor, es indispensable realizar estudios de diversidad que acompañen la identificación de especies lipolíticas presentes en los lugares donde se realiza el muestreo (40). Estos estudios se pueden realizar mediante el análisis del gen ADNr 16S de los microorganismos de la comunidad (55).

En este contexto, el presente trabajo pretende estimar la diversidad de bacterias con actividad lipolítica de aislamientos derivados de un enriquecimiento de muestras de suelos de páramo y glaciar, como una aproximación para identificar el potencial biotecnológico de microorganismos psicrófilos con actividad lipolítica del Parque Nacional Natural los Nevados (PNN)

### 3. MARCO TEORICO REFERENTES CONCEPTUALES

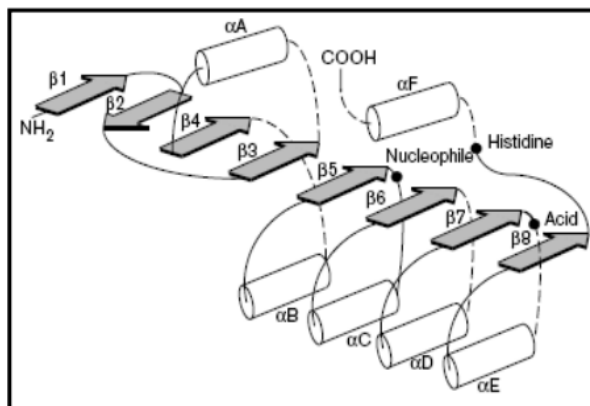
#### 3.1 Lipasas

Estas enzimas se definen como glicerol éster hidrolasas que actúan en condiciones acuosas, sobre los enlaces éster de los triacilglicérols, rompiendo la molécula en ácidos grasos y glicerol. (Fig.1) (24)



**Fig. 1.** Hidrólisis de triacilglicérols. (Fuente: Jaeger y Reetz 1998)

La estructura de varias triacilglicérol lipasas ha sido identificada, confirmando que son miembros de la superfamilia de  $\alpha/\beta$  hidrolasas (29). El plegamiento de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas incluye ocho cadenas  $\beta$  conectadas por seis  $\alpha$  hélices (Fig. 2) con una tríada catalítica que consta de serina, aspártico, ácido glutámico y residuos de histidina (28).



**Fig. 2.** Estructura de una lipasa (Fuente: Jaeger et al. 1999)

Aunque las lipasas son muy abundantes en la naturaleza y están presentes en todos los organismos, las de origen microbiano son las que más atención han captado (24) por su alto potencial biotecnológico como aditivos en alimentos, síntesis de ésteres, tratamiento de aguas residuales, remoción de lípidos y grasas en cosméticos, aceites, alimentos, pieles de animal y ensayos en sangre para triglicéridos (51).

Estas lipasas son estables en solventes orgánicos, no requieren cofactores, poseen una amplia especificidad de sustrato (30) y enantioselectividad, que es una propiedad que le permite a la lipasa discriminar entre enantiómeros de una mezcla racémica producto de reacciones químicas que generan enantiómeros R y S, siendo de gran importancia en procesos de química farmacéutica y en la síntesis orgánica y productos naturales (24).

Las bacterias producen tres tipos diferentes de enzimas lipolíticas, las carboxilesterasas. (CE 3.1.1.1) que hidrolizan moléculas pequeñas que contienen éster, lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3) que presentan actividad sobre triglicéridos de cadena larga y varios tipos de fosfolipasas (EC 3.1.1.4) (3).

### **3.2 Ambientes extremos y microorganismos extremófilos**

Los microorganismos extremófilos, viven en ambientes bajo condiciones extremas, diferentes a las normales. Ellos se han adaptado a condiciones fisicoquímicas extremas como altas temperaturas (termófilos e hipertermófilos) bajas temperaturas (psicrófilos), elevada concentración de sal (halófilos) y otras condiciones extremas como la presión alta, radiación, pH ácido y alcalino (62). Estos ambientes son una de las mejores fuentes para la búsqueda de nuevos compuestos porque ofrecen ambientes únicos y favorables para la producción de moléculas biológicas de interés (40).

Los extremófilos y sus enzimas tienen un importante potencial económico en diversas áreas, ya sea en aplicaciones directas para procesos de hidrólisis bajo condiciones extremas o como modelo biológico para mejorar las enzimas mesofílicas (adaptadas a condiciones físico químicas normales) optimizando sus propiedades y su estabilidad bajo condiciones distintas a las normales (62).

En el caso de los microorganismos psicrófilos la búsqueda de nuevos bioproductos se ha enfocado en cuatro áreas principales incluyendo: 1. Enzimas para procesos industriales. 2. Bioremediación y otras tecnologías para el control de contaminación. 3. Suplementos dietarios particularmente los ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) y 4. Proteínas anticongelantes (47).

Los microorganismos psicrófilos producen lipasas adaptadas al frío y activas en un amplio rango de temperaturas en comparación con las lipasas mesofílicas y termofílicas, que muestran poca actividad o nula a bajas temperaturas (34). Estas enzimas poseen características estructurales que les confieren un alto nivel de flexibilidad de manera complementaria entre el sitio activo y el sustrato, a un bajo costo energético, generando una alta actividad específica a bajas temperaturas (12) como consecuencia de la alta proporción de aminoácidos como la serina, ácido aspártico, treonina y alanina en la región enrollada de la estructura secundaria, y una baja proporción de aminoácidos como el ácido glutámico y la leucina en las regiones helicoidales de la enzima (47).

### **3.3 Parque Nacional Natural de los Nevados**

El Parque Nacional Natural de los Nevados se encuentra ubicado entre los departamentos del Quindío, Risaralda, Tolima y Caldas (Colombia) (04°48' Norte 75°22' Oeste). El parque cuenta con aguas termoacidófilas, sulfataras volcánicas, lagunas a bajas temperaturas, nieves perpetuas, suelos desérticos, ecosistemas de bosque alto andino, páramo, súper páramo y glaciares, donde las temperaturas varían entre 3°C a 14°C con precipitaciones de 1.600 a 2.600mm anuales (64).

En este gradiente altitudinal se encuentran diversos ecosistemas con ambientes extremos, algunos de los cuales están siendo explorados por GeBiX. El ecosistema de páramo es uno de ellos y se caracteriza por su importancia socio-económica como reservorio de agua, para grandes ciudades como Bogotá y por su acumulación de carbono (9). Este ecosistema ocupa solo el 2% de la superficie terrestre de los países andinos y aunque se encuentra en muy pocas partes del mundo (42), alberga una gran diversidad de microorganismos, gracias a la alta acumulación de materia orgánica, presencia de ácidos orgánicos e incorporación de Aluminio y hierro influenciada por el bajo pH del suelo (9). Por otro lado el ecosistema de glaciar, se caracteriza por su baja temperatura y baja disponibilidad de nutrientes, lo que lo constituye en un escenario interesante

para estudio sobre diversidad microbiana y bioprospección, que se puede llevar a cabo bajo diferentes aproximaciones de cultivo dependiente e independiente.

### **3.4 Cultivos microbianos enriquecidos**

Los cultivos microbianos enriquecidos permiten una aproximación a la búsqueda funcional de microorganismos con una actividad específica de interés; estos cultivos presentan ventajas como la preparación de la muestra para mejorar la calidad de las pruebas moleculares y la posibilidad de realizar un *screening* funcional directo, en el cual se observa el crecimiento y la actividad de los microorganismos en los medios con el sustrato de interés (19). En el caso del *screening* de microorganismos productores de lipasas, usualmente se lleva a cabo en medios de cultivo adicionados con un sustrato lipídico como la tributirina (gliceril tributirato); sin embargo este sustrato no permite diferenciar entre lipasas verdaderas y estererasas (37).

Adicionalmente los cultivos enriquecidos de consorcios microbianos permiten explorar la diversidad metabólica, junto con actividades catabólicas, a través de estudios a nivel molecular, que permiten explorar las comunidades desde de su potencial biotecnológico, sin olvidar que la estructura de varias comunidades microbianas a partir de muestras ambientales es compleja y diversa, representando un reto para la biotecnología (19).

### **3.5 Identificación de microorganismos a partir del análisis de la secuencia del ADN<sub>r</sub>16S**

La diversidad e identificación de microorganismos recuperados de muestras ambientales se puede realizar mediante técnicas de secuenciación del ADN<sub>r</sub>16S. Para tal motivo, primero se realiza la extracción de ADN seguida de la amplificación del ADN<sub>r</sub>16S y su posterior secuenciación (55). La razón por la cual este gen es empleado para la identificación, se debe a que es una región conservada a nivel evolutivo, permitiendo el diseño de *primers* sobre regiones conservadas que presentan algún grado de variabilidad (39) y realizar estimaciones filogenéticas entre las OTUS (Unidades taxonómicas operativas) identificadas (31).

### **3.6 Análisis de restricción del ADN<sub>r</sub> 16S amplificado (ARDRA)**

La técnica de ARDRA es un método que incluye la amplificación de la región del ADN<sub>r</sub> 16S por PCR, seguida por la digestión con una o más enzimas de restricción (38). La digestión se puede llevar a cabo con una sola o varias enzimas combinadas, lo que genera un patrón de bandas característico de cada bacteria (18). Estos patrones de bandas han sido ampliamente utilizados para establecer relaciones entre bacterias aisladas que comparten características fenotípicas en común y para estimar la biodiversidad en comunidades microbianas (8).

### **3.7 Análisis de secuencias del gen ADN<sub>r</sub> 16s**

El análisis de secuencias se realiza mediante alineamientos locales a través del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que encuentra regiones similares entre secuencias biológicas, de la base de datos del NCBI. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (41). La construcción de árboles es otra herramienta para el análisis evolutivo en biología. Los árboles de distancias relacionan las especies a través de una estructura ramificada (74) y se pueden construir empleando Weighbor (Weighted Neighbor Joining) una aproximación basada en probabilidades (7).

### **3.8 Ensayos cualitativos para evaluar la actividad lipolítica**

Las lipasas se encuentran clasificadas como: carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) que hidrolizan moléculas pequeñas que contienen éster, lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3) que presentan actividad sobre triglicéridos de cadena larga, y varios tipos de fosfolipasas (EC 3.1.1.4) (3). Para verificar la presencia de lipasas verdaderas, se deben emplear sustratos lipídicos de cadena larga como el aceite de oliva (37) que contiene ácido oleico, palmítico y linoleico (6). Para el caso de las esterasas se emplea como sustrato de referencia la tributirina que corresponde a un triacilglicerol de cadena corta. En cualquiera de los dos casos, la evaluación cualitativa de actividad lipolítica se determina por las zonas de aclaramiento o halos de hidrólisis formados alrededor de la colonia sobre el medio que contiene el sustrato lipídico correspondiente (35).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Caracterizar la diversidad de bacterias lipolíticas, provenientes de cultivos microbianos enriquecidos de suelo de glaciar y de páramo del Parque Nacional Natural de los Nevados.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar la morfología de cepas lipolíticas aisladas a partir de cultivos microbianos enriquecidos de suelo de glaciar y páramo.
- Estimar la diversidad microbiana presente en los cultivos enriquecidos, con base en el análisis de restricción del gen 16S y/o su secuencia.
- Identificar las cepas lipolíticas mediante el análisis de la secuencia del gen ADNr16S.
- Evaluar cualitativamente la actividad lipolítica de los microorganismos aislados, en diferentes sustratos.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Recuperación de las cepas y realización del banco de trabajo

Las cepas evaluadas en este proyecto, provienen de aislamientos previos realizados a partir de cultivos microbianos enriquecidos de suelos de páramo y glaciar. Las muestras de suelo fueron colectadas entre 10 y 15 cm de profundidad en diciembre de 2009 en los sitios con coordenadas geográficas 04°51'51.1" N 75°21'13.7 "W (páramo) y 04°47'44.98" N 75°21'52.33" O (glaciar) a una altura de 4322 msnm y 5200 msnm respectivamente.

El enriquecimiento microbiano, realizado en un trabajo previo, se llevó a cabo por fermentación discontinua durante 15 días con un pH inicial de 7, aireación de 1.6 L/min, temperatura ambiente, agitación controlada de 120 rpm en un volumen de trabajo de 700mL, con un inóculo del 10% en medio mineral MSM (67), suplementados con Tween20 (0,5%) y 1% de aceite de oliva. Se obtuvo un total de 43 aislamientos de bacterias lipolíticas, 13 provenientes del enriquecimiento microbiano de suelo de glaciar y 30 del enriquecimiento de suelo de páramo. Estas cepas se encuentran conservadas en glicerol a -80°C y hacen parte de la colección de microorganismos aislados del PNN que se encuentra en el laboratorio GeBiX de la Pontificia Universidad Javeriana.

La reactivación de las cepas se realizó en agar LB (Luria Bertani) más el sustrato lipídico (Tributirina ó aceite de oliva al 1%) y tritón X 100 al 0,01% (52) a 25°C. A partir de las colonias obtenidas se elaboró el banco de trabajo mediante la inoculación de cada colonia en 5mL de caldo LB más el sustrato lipídico y posterior incubación a 25°C y agitación a 180 rpm por 24 horas. Finalmente 850 µL de cada uno de los cultivos se mezcló con 150 µL de glicerol al 100% (Concentración final de glicerol 15%) y se conservó a -20°C.

### 5.2 Caracterización morfológica

A partir de cada uno de los aislamientos crecidos en el agar LB más el sustrato lipídico, se realizó la descripción morfológica de las colonias. Posteriormente se tomó una colonia para realizar la tinción de Gram y la correspondiente descripción microscópica.

### 5.3 Extracción de ADN

La extracción del ADN de cada uno de los aislamientos inició con la recuperación de la biomasa celular mediante centrifugación de 10 ml de cultivo a 12.000 rpm durante 6 minutos. Posteriormente se realizaron lavados con solución salina hasta que se obtuvo un precipitado considerable. El *pellet* se resuspendió en 487 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM), 15 µL de lisozima 50 mg/ml, 40 µL de acromopeptidasa 10mg/ml (Sigma-Aldrich Corp.) y se incubó por una hora a 37°C. Se adicionó en el mismo tubo 30 µL de SDS 10%, 3 µL de proteinasa K (20mg/ml) y se incubó durante una hora a 50°C. Se agregaron 100 µL de NaCl (5M), 80 µL de CTAB/NaCl 14.1%, se agitó en vortex y se incubó por 10 minutos a 65°C. Se agregó 750 µL de cloroformo alcohol isoamilico 24:1, se mezcló en vórtex y se centrifugó 5 minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se agregó 750 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (F:C:I) 25:24:1, se mezcló en vórtex y se centrifugó 5 minutos a 14.000 rpm. De

nuevo el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, se agregó 450 µL de isopropanol para precipitar el ADN y se incubó a -20°C durante 30 minutos. Los tubos se centrifugaron 10 minutos a 14.000 rpm, el sobrenadante se descartó, el sedimento de ADN se lavó con 200 µL de etanol al 70% y los tubos se centrifugaron por 10 minutos a 14.000 rpm. El sedimento se secó al vacío y se resuspendió en 60 µL de tampón TE. Finalmente se adicionó 3 µL de RNAsa 15 µg/ml y se incubó a 37°C durante una hora. El ADN fue almacenado a -20°C (59).

#### **5.4 Cuantificación de ADN y estimación de la calidad**

La verificación de la pureza y de la concentración del ADN extraído se realizó en el equipo *Thermo Scientific Nano Drop*<sup>TM</sup>1000 (Labtech International, UK). El ADN se cuantificó con base en el valor de absorbancia a 260 nm y fue expresado como ng µL<sup>-1</sup>. Una disminución en la relación de absorbancia a 260/230nm (<1,2) y 260/280 (<1,7) se utilizó como indicador de la presencia de fenoles y proteínas respectivamente.

La calidad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se determinó por la presencia de una banda definida de alto peso molecular en el gel.

#### **5.5 Amplificación y secuenciación del gen ADNr16S:**

La amplificación del gen ADNr16S se llevó a cabo empleando los *primers* universales (27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 1492R 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') (13), en una mezcla que contiene: Buffer 1X, MgCl 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.3 µM de cada primer, 0.5% de BSA, Taq Polimerasa Promega 1U, en un volumen final de 100 µL. El perfil de temperaturas empleado para la amplificación consistió en: Denaturación inicial 94°C por 5 min seguido por 30 ciclos de: denaturación 94°C por 30 seg, hibridación 57°C por 45 seg, elongación 72°C por 1 min y 30 seg y un ciclo final de elongación a 72°C por 7 min. Los productos de PCR fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SyBR-safe (InvitroGen<sup>TM</sup>) 0.001%.

50 µL de cada producto de PCR fue enviado por duplicado para la secuenciación de las dos cadenas, por el método de Sanger a Macrogen Inc. Korea, y el volumen restante (50 µl) fue empleado para el análisis de restricción.

#### **5.6 Análisis de restricción del ADNr 16S amplificado (ARDRA)**

El gen ADNr16S amplificado por PCR fue digerido con las enzimas de restricción *RsaI*, *AluI* y *HpaIII* (Enzimas de corte frecuente). La digestión se realizó en un volumen final de 15 µl, que contenía 1.5 µL de Buffer 10X, 1.5 U de la enzima respectiva, 1.6 µL BSA 1mg/ml y 5 µl de producto de PCR. La mezcla de reacción se incubó por 4 horas a 37°C con posterior inactivación de la enzima a 65°C por 15 min. Los productos de restricción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio 0.5 µg/ml y visualizados y documentados empleando el programa *Quantity one 1-D Analysis* (Biorad, Hércules, CA, USA).



### **5.7 Análisis de las secuencias e identificación de las cepas:**

La limpieza de las secuencias se llevó a cabo manualmente a través del análisis del cromatograma. Los picos indefinidos se borraron de la secuencia. El ensamblaje se realizó empleando el programa CLC Main Workbench 6. El análisis de las secuencias se hizo mediante alineamientos locales a través de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y el árbol de distancias se construyó empleando el programa MEGA versión 5.0, usando el algoritmo Weighted Neighbor Joining, una aproximación basada en probabilidades para la reconstrucción de filogenias basadas en distancias (7).

### **5.8 Caracterización preliminar de la actividad lipolítica:**

El análisis cualitativo de la actividad lipolítica se realizó por triplicado, midiendo las zonas de aclaramiento o halos de hidrólisis formados alrededor de las colonias, inoculadas sobre discos de papel de filtro que fueron colocados en medio LB suplementado con tributirina o aceite de oliva al 1% (13). Para esto, se realizó un cultivo líquido de cada una de las cepas en caldo LB (10 mL) por 24 horas a 20°C. Tres discos de papel filtro fueron inoculados con 5 µl de cada cultivo y posteriormente ubicados sobre medio sólido adicionado con el sustrato respectivo. Las cajas fueron incubadas a 20°C durante 8 días. Una vez se evidenció la aparición de un pequeño halo alrededor del papel de filtro se realizaron mediciones del diámetro en mm cada 24 h.

### **5.9 Análisis Estadístico para la actividad lipolítica**

Los datos obtenidos en el análisis cualitativo de la actividad lipolítica se evaluaron por medio de una prueba de normalidad (test de Shapiro-wilk) y una prueba de homogeneidad de varianzas (test de Levene) con el programa Statistix 9.0®. Una vez se determinó que los datos no tenían una distribución normal, se optó por aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para muestras independientes con el objetivo de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Las comparaciones entre las medias de los tratamientos se realizaron por la prueba de t-multivariado, en el programa SPSS®, la cual no es sensible a la no normalidad de los datos ni a la homogeneidad de varianzas.

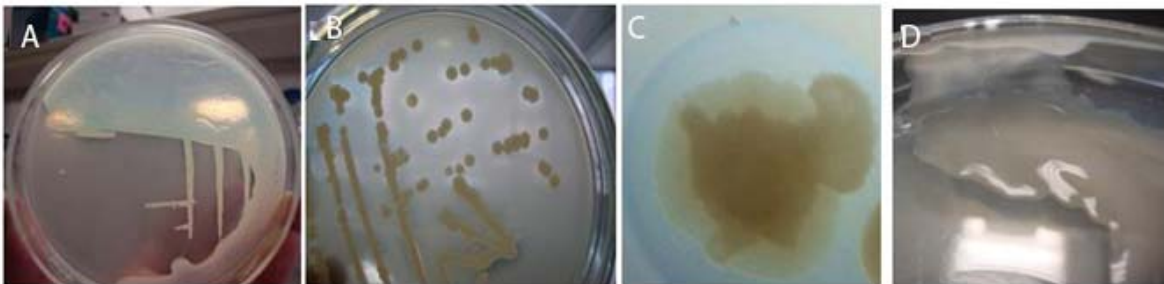
## 6. RESULTADOS

Para acceder a la diversidad e identificación de las 43 bacterias lipolíticas aisladas de páramo y glaciar, se llevó a cabo una caracterización morfológica, un análisis de restricción del gen 16S y la secuenciación del gen ADNr 16S. La selección de las cepas con mayor actividad lipolítica se llevó a cabo en el medio LB suplementado con aceite de oliva y tributirina al 1%.

### 6.1 Caracterización morfológica de los aislamientos

#### 6.1.1 Morfología de las colonias

En el total de aislamientos se evidenció gran variedad de morfologías, tal como se describe detalladamente en los anexos 1A y 1B. La mayoría de aislamientos presentó una textura mucosa ó gelatinosa de color crema brillante (Fig. 3B), que con el tiempo va cambiando hacia un color café. Algunas de ellas tienden a crecer masivamente por toda la caja y producen exopolisacáridos, como se observa con la cepa IIAT3 (fig. 3D). Otra característica observada en algunas de las bacterias aisladas fue la formación de puntos oscuros o cafés sobre la colonia, después de varios días de incubación. El borde regular en las colonias predominó sobre el borde irregular. Algunos aislamientos del enriquecimiento de suelo de glaciar como IGT1 y IIGO1, presentaron colonias muy pequeñas y transparentes, lo que dificultó su descripción y su visualización a los pocos días de incubación. Otra característica en algunas colonias, fue el borde con aspecto gelatinoso traslucido con el centro cremoso (Fig. 3C). En el caso de la cepa del enriquecimiento de suelo de páramo IIIAT2 al ser observada a contraluz presenta un efecto de papel celofán (Fig. 3A) (Anexo 1A y 1B).



**Fig. 3.** Morfologías de algunos aislamientos obtenidos a partir de los enriquecimientos microbianos de muestras de suelo de páramo y glaciar. A: crecimiento masivo con apariencia de papel celofán. B: Morfología predominante, colonias cremosas. C: Borde de la colonia con aspecto gelatinoso y centro cremoso. D: Morfología de crecimiento masivo en la tapa de la caja. Fuente: Autor.

#### 6.1.2 Morfología de las células (tinción de Gram)

En los 43 aislamientos se encontraron bacilos Gram negativos como morfología predominante. Sin embargo, en el caso de las cepas IIGO3 de glaciar y IIIAO4 de páramo no se logró obtener una morfología definida, encontrándose en la tinción bacilos Gram positivos y Gram negativos con

diferente tamaño. Únicamente se presentó cocos Gram positivos en el aislamiento IIIIGO5 de glaciario (Anexo1C Y 1D).

## 6.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó empleando el protocolo de Patel y Cayol 1994, modificado por Spanevello (2002). Este protocolo resultó ser efectivo al permitir obtener ADN de buena calidad y pureza (Anexo 2A).

La pureza del ADN fue evaluada a través del equipo *ThermoScientificNanoDrop*<sup>TM</sup>1000 (Labtech International, UK), donde se obtuvieron concentraciones de ADN entre 105 ng/μl y 3.400 ng/μl; y relaciones de absorbancia 260/280 de 1.97 y 260/230 de 1.89 aproximadamente (Anexo 2B).

## 6.3 Amplificación y secuenciación del gen ADNr 16S

A partir de los ADN obtenidos, se realizaron diluciones para tener concentraciones de ADN entre 10 ng/μl y 100 ng/μl. La amplificación del gen ADNr 16S se llevó a cabo con los *primers* 1492R Y 27F (13). El amplicón presentó el tamaño esperado de 1.500 pb, de acuerdo con el marcador de peso molecular (Fig. 4).

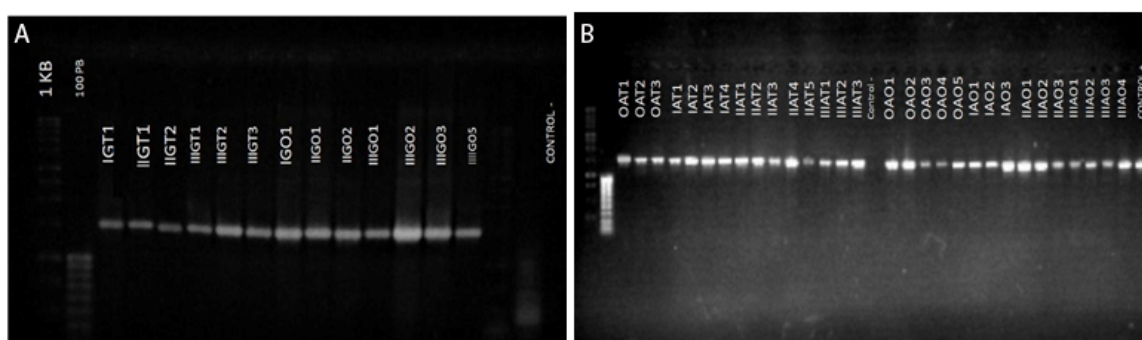


Fig. 4. Amplificación por PCR del ADNr 16S de aislamientos obtenidos a partir del enriquecimiento de muestras de suelo. A. Glaciario y B. Páramo. Fuente: Autor.

## 6.4 Análisis de restricción del ADNr 16S amplificado (ARDRA)

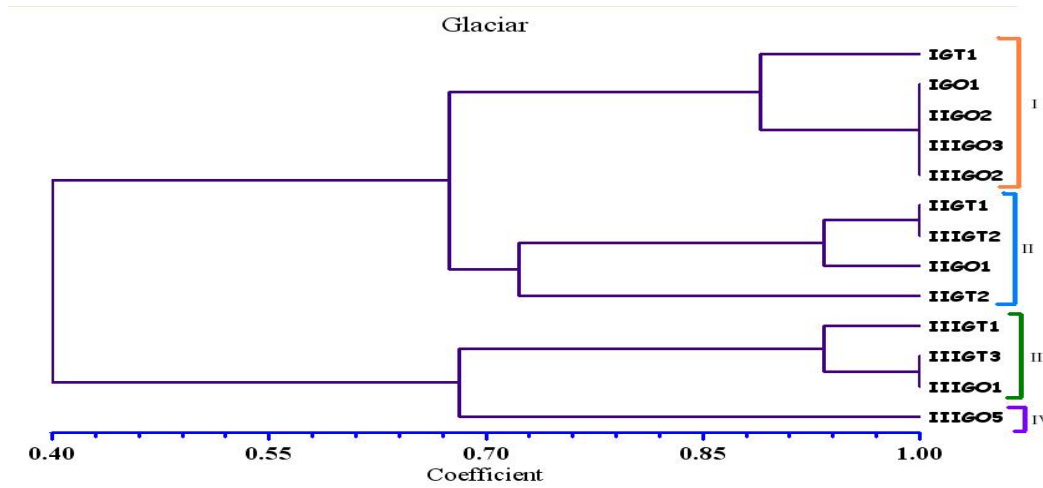
La restricción con la enzima *RsaI* generó un patrón de 11 bandas, la enzima *HpaII* generó también 11 bandas y la enzima que menos patrones de bandas generó fue *AluI* con 8 bandas (Anexo3). El peso molecular de las bandas para cada morfotipo, fue calculado de acuerdo al marcador de peso molecular 1KB (Promega).

A partir de los diferentes morfotipos de restricción obtenidos con cada una de las enzimas, se construyeron matrices básicas de ausencia y presencia (0 y 1). A partir de esta, se obtuvo la matriz de similitud empleando el coeficiente de DICE (33) y se realizó el agrupamiento respectivo empleando el método UPGMA (Anexo 4).

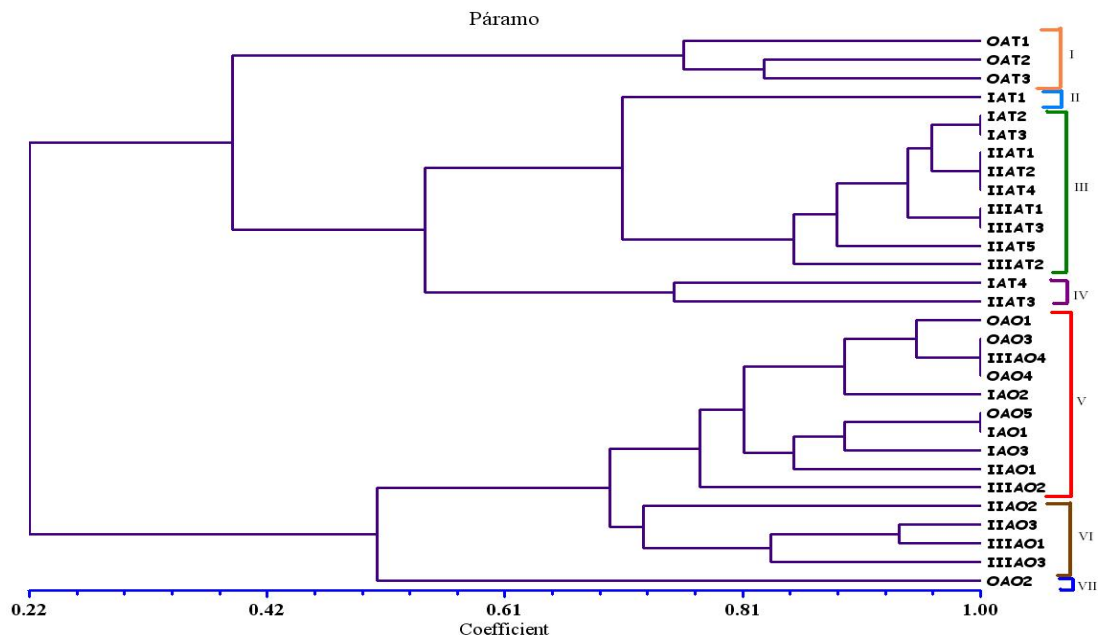
Los agrupamientos generaron dendogramas para cada enzima (Anexo 5) y de esta manera se obtuvo el dendograma consenso para todos los aislamientos de los dos enriquecimientos (Fig.5 y 6). En el dendograma consenso (Fig. 5) es posible observar 4 grupos para las bacterias lipolíticas aisladas a partir de glaciario. Los aislamientos IGO1, IIGO2, IIIGO3 y IIIIGO2 tienen un coeficiente de

similitud de 1 lo que indica que podría tratarse de la misma cepa. Esta situación también se observa para los aislamientos IIGT1 y IIIGT2, IIIGT3 y IIIGO1.

En el dendograma obtenido para los aislamientos del enriquecimiento de suelo de páramo, se observan 7 grupos. Los aislamientos IAT2 y IAT3 incluidos en el grupo III, presentaron el mismo coeficiente de similitud (2), sugiriendo que se trata de la misma cepa. De la misma forma ocurre con las cepas IIAT1, IIAT2 y IIAT4; IIIAT1 y IIIAT3; OAO3, OAO4 y IIIAO4 y OAO5 y IAO1 (Fig. 6).



**Fig. 5.** Análisis de agrupamiento UPGMA para las enzimas *RsaI*, *HpaII* y *AluI*. Análisis realizado con base en el ARDRA de aislamientos obtenidos del enriquecimiento de muestras de suelo de glaciar. Fuente: Autor.



**Fig. 6.** Análisis de agrupamiento UPGMA de aislamientos obtenidos del enriquecimiento de muestra de suelo de páramo con las enzimas *RsaI*, *HpaII* y *AluI*. Fuente: Autor.

## 6.5. Análisis de las secuencias e identificación de las cepas:

Para identificar y estimar la diversidad de bacterias lipolíticas de muestras de suelo de páramo y glaciar del Parque Nacional Natural de los Nevados, se secuenció el gen ADN<sub>r</sub>16S, en los 43 aislamientos. Los productos de secuenciación con tamaños promedio de 900pb, se obtuvieron empleando los *primers* 27F y 1492R. Una vez ensambladas las secuencias, el tamaño aproximado de los *contigs* correspondió a 1.5 Kb. Su análisis se hizo mediante BLASTN contra la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project) con el fin identificar los microorganismos relacionados con las secuencias obtenidas para cada aislamiento (Tabla 1).

**Tabla 1.** Identificación de bacterias lipolíticas de glaciar y páramo con base en la secuencia del gen ADN<sub>r</sub>16S.

Código	Bacteria asociada	No de acceso	E value	% identidad	Score
<b>Glaciar</b>					
IGT1	<i>Pseudomonas mandelii</i>	024902.1	0.0	99%	2737
IIGT1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3119
IIGT2	<i>Burkholderia fungorum</i>	025058.1	0.0	100%	2864
IIIGT1	<i>Ralstonia pickettii</i>	043152.1	0.0	100%	3049
IIIGT2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3204
IIIGT3	<i>Ralstonia pickettii</i>	043152.1	0.0	100%	3329
IGO1	<i>Pseudomonas mandelii</i>	024902.1	0.0	100%	3104
IIGO1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	100%	2919
IIGO2	<i>Pseudomonas fragi</i>	024946.1	0.0	99%	3028
IIIGO1	<i>Ralstonia pickettii</i>	043152.1	0.0	100%	3145
IIIGO2	<i>Pseudomonas fragi</i>	024946.1	0.0	100%	1755
IIIGO3	<i>Pseudomonas fragi</i>	024946.1	0.0	99%	3198
IIIGO5	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	044872.1	0.0	99%	1931
<b>Páramo</b>					
OAT1	<i>Aeromonas bivalvium</i>	043885.1	0.0	99%	1944
OAT2	<i>Aeromonas veronii</i>	044845.1	0.0	99%	3370
OAT3	<i>Aeromonas veronii</i>	044845.1	0.0	99%	3278
IAT1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3193
IAT2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3376
IAT3	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3377
IAT4	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	028619.1	0.0	100%	3413
IIAT1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3191
IIAT2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	2796
IIAT3	<i>Pseudomonas mandelii</i>	024902.1	0.0	99%	3322
IIAT4	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3289
IIAT5	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3195
IIIAT1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3283
IIIAT2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3202
IIIAT3	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3388
OAO1	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	028619.1	0.0	99%	3405
OAO2	<i>Aeromonas veronii</i>	044845.1	0.0	99%	3370
OAO3	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	028619.1	0.0	100%	3318
OAO4	<i>Pseudomonas lini</i>	029042.1	0.0	100%	2940
OAO5	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	028619.1	0.0	99%	3403
IAO1	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	028619.1	0.0	99%	3407
IAO2	<i>Pseudomonas fragi</i>	024946.1	0.0	100%	3206
IAO3	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	028619.1	0.0	100%	1570
IIAO1	<i>Pseudomonas jessenii</i>	024918.1	0.0	99%	2995
IIAO2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3099
IIAO3	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3202
IIIAO1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	3195
IIIAO2	<i>Pseudomonas congelans</i>	028985.1	0.0	99%	2785
IIIAO3	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	028930.1	0.0	99%	2271
IIIAO4	<i>Pseudomonas mandelii</i>	024902.1	0.0	99%	3444

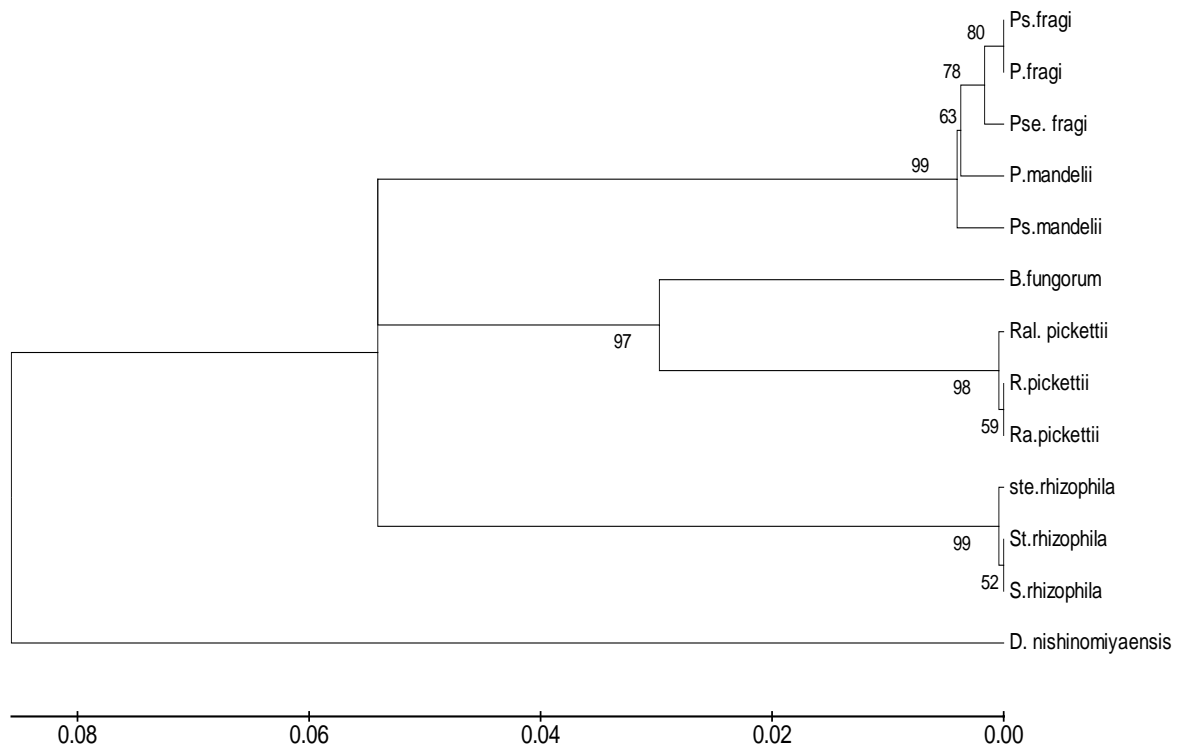
Estas especies de bacterias lipolíticas obtenidas del cultivo enriquecido de suelo de páramo y glaciar, han sido encontradas y reportadas previamente por otros autores en diferentes lugares. La mayoría de las fuentes descritas se caracterizan por tener temperaturas inferiores a los 20°C enmarcando un gran número de escenarios como lo son suelos, aguas, comida refrigerada, entre otros (tabla 2).

**Tabla 2.** Ambientes fríos y otras fuentes donde se han encontrado los aislamientos obtenidos provenientes del cultivo enriquecido de suelo de páramo y glaciar.

Bacteria	Fuente	Referencias
<i>Aeromonas sp.</i>	Sedimentos marinos, ambientes acuáticos, asociada a animales acuáticos.	Miñana et al. (2007)
<i>Burkholderia sp.</i>	Suelo al norte de China a 10°C	Jin et al. (2012)
<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	Aislado de agua	Pathom et al. (2006)
<i>Pseudomonas sp.</i>	ambientes subterráneos, suelo en Alaska	Rashid et al. (2001)
<i>Pseudomonas congelans</i>	Superficie de las hojas en pastos.	Behrendt et al. (2003)
<i>Pseudomonas fragi</i>	Carne refrigerada, plantas de productoras de leche.	Ferrocino et al. (2009), Morrison et al. (1940)
<i>Pseudomonas jessenii</i>	Agua mineral	Verhille et al. (1999)
<i>Pseudomonas lini</i>	Ambientes acuáticos, en raíces y suelos.	Delorme et al. (2002)
<i>Pseudomonas mandelii</i>	Agua mineral	Verhille et al. (1999)
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	Cuarto frío para almacenamiento de comida.	Yumoto et al. (2001)
<i>Ralstonia pickettii</i>	Agua, suelos.	Coenye et al. (2003)
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Suelos, principalmente en la rizósfera.	Wolf et al. (2002)

Fuente: Autor

Con el fin de establecer la relación evolutiva de cada secuencia obtenida de los aislamientos, se realizó un alineamiento múltiple de las 43 secuencias empleando la herramienta MUSCLE del EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>). Los árboles de distancias fueron construidos con el programa MEGA 5 utilizando el algoritmo de Neighbor-joining (7) y un valor de *Bootstrap* calculado con 1000 réplicas (Fig. 7 y 8). Los resultados de este análisis muestran para el enriquecimiento de la muestra de glaciar 5 grupos, 4 de los cuales incluyen el *phylum* Proteobacteria con los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia* y *Burkholderia*, y el grupo más alejado es del *phylum* Actinobacteria, género *Dermaococcus* (Fig. 7).



**Fig. 7.** Árbol de distancias basado en las secuencias del gen ADNr16S de las bacterias aisladas de un enriquecimiento microbiano de muestra de suelo de glaciar del PNN.

En el caso del árbol obtenido con los aislamientos provenientes del enriquecimiento de la muestra de páramo, sólo se encuentran 3 grupos representados por los géneros del *phylum* Proteobacteria; *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, siendo los dos últimos los géneros predominantes. Adicionalmente se ve una mayor diversidad de especies para *Pseudomonas* en comparación a los otros géneros. *Aeromonas* se ubico en un único grupo siendo el menos predominante (Fig. 8).

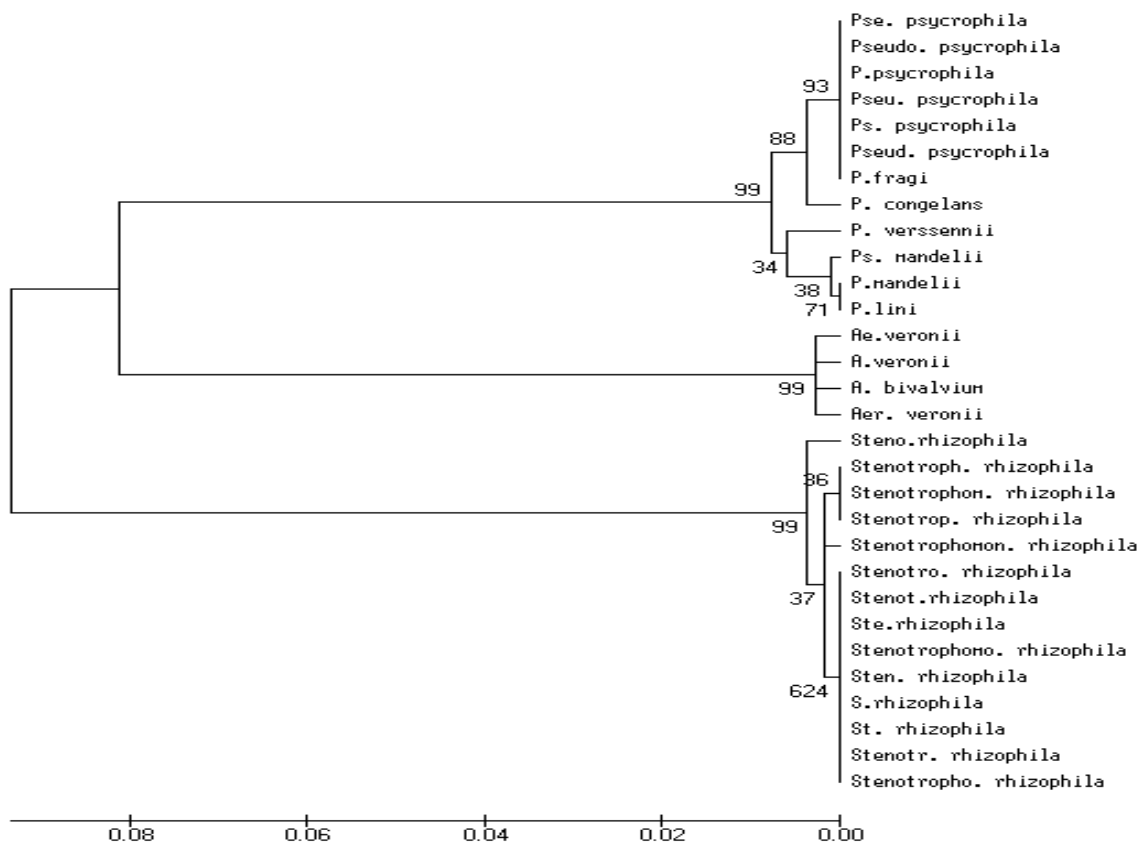


Fig. 8. Árbol de distancias basado en las secuencias del gen ADNr16S de las bacterias aisladas de páramo.

### 6.6 Caracterización preliminar de la actividad lipolítica

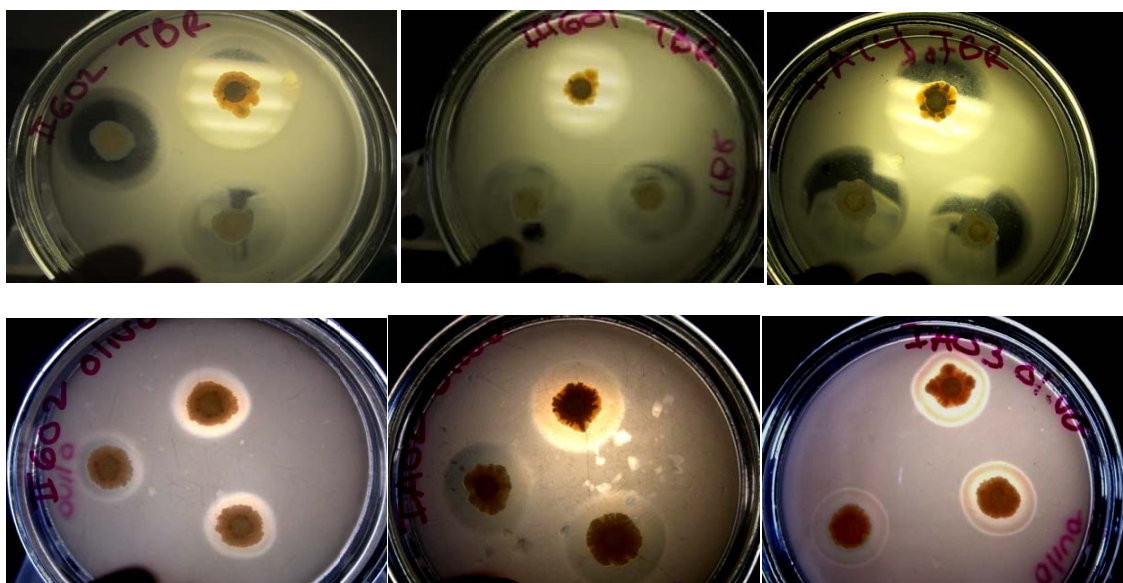
La actividad lipolítica fue evaluada para cada cepa en los sustratos Tributirina (ácido graso de cadena corta) y aceite de oliva (Compuesto por ácidos grasos de cadena larga) durante ocho días. El ensayo se llevó a cabo por triplicado con tres discos de papel filtro, inoculados con 5 µl del cultivo líquido (Anexo 6 y 7).

Los aislamientos destacados por producir un mayor halo de hidrólisis en el medio LB suplementado con tributirina fueron IIGO1 Y IAT4, mientras que los aislamientos IIGO2, IAO2 Y IAO3 presentaron mayores tamaños de halo de hidrólisis en LB suplementado con aceite de oliva.

Los aislamientos recuperados inicialmente en aceite de oliva, IIGO2, IIGO1, OAO1, IAO1, IAO2 Y IAO3 presentaron actividad lipolítica tanto en tributirina como en aceite de oliva. Cabe destacar que el aislamiento IIGO2, mostró una capacidad lipolítica interesante que debe ser evaluada en detalle (Fig. 9). La única cepa recuperada en tributirina que fue capaz de hidrolizar el aceite de oliva fue la cepa IAT4 (Anexo 6 y 7).

Por su parte IGT1, IIGT2, IIIGT3, IGO1, IIGO1 Y IIGO2 de suelo de glaciar, y OAT1, OAT2, OAT3, OAO5 Y IIIAO4 del enriquecimiento de suelo páramo, perdieron su capacidad de hidrólisis frente a los dos sustratos evaluados para los 8 días del ensayo (Anexo 6 y 7).





**Fig. 9.** Actividad lipolítica de cepas aisladas a partir del enriquecimiento de muestras de suelo de glaciar y páramo del PNN. Panel superior: halo de hidrólisis producido por las cepas IIG02, IIIG01, IAT4 en medio LB con tributirina 1%. Panel inferior: cepas IIG02, IAO2, IAO3 en medio LB con aceite de oliva.

Con el fin de determinar si existen diferencias entre los medios evaluados y determinar las bacterias con mayor actividad lipolítica, se realizó un análisis de los datos con el programa Statistix 9.0® (Anexo 7). El análisis previo empleando el test de Shapiro-Wilk mostró que los datos no seguían una distribución normal (Anexo 8A), por lo que se aplicó la prueba no paramétrica de comparación de medias de Kruskal Wallis, para establecer si existen diferencias entre la formación de halos de hidrólisis en los dos medios. De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis estadístico, se seleccionó LB suplementado con tributirina como el mejor medio para evaluar la actividad lipolítica cualitativa (Anexo 8B). Como los datos tampoco presentaron homogeneidad de varianzas de acuerdo al test de Levene (Anexo 8C) se aplicó una prueba de t-multivariado para hacer comparaciones pareadas (Anexo 8D). Esta prueba permitió seleccionar a IAT4, IIG01, IIG02, IIAO1, IIAT5 Y IAT2 como las cepas con mayor actividad lipolítica sobre tributirina y a IAO2, IAO3 Y IIG02 IAT2 como las cepas con mayor actividad sobre aceite de oliva.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización morfológica

La observación macroscópica de los aislamientos recuperados del enriquecimiento de muestras de suelo de Glaciar y páramo mostró colonias con diferentes morfologías, inclusive para diferentes aislamientos de una misma cepa. Estudios realizados con varias especies de *Pseudomonas* han mostrado que bajo condiciones diferentes del medio de cultivo, se expresan distintos morfotipos; unos conocidos como *Small colony variant* (SCV) y *Wrinkly spreader* y otros simplemente descritos por su textura gelatinosa hacia los bordes y cremosa hacia el centro, como consecuencia de una disminución en la motilidad *swimming* (70). Estos morfotipos se observan por pases sucesivos de la misma bacteria. (70)

Las colonias circulares, de color naranja observadas en los aislamientos de la actinobacteria *Dermacoccus nishinomiyaensis* fueron descritas por Kocur et al. en 1975, cuando esta bacteria se conocía con el nombre de *Micrococcus nishinomiyaensis* y había sido aislada únicamente en piel de mamíferos. El autor describió esta bacteria como un coco Gram positivo, caracterizado por producir un pigmento naranja insoluble en agua sobre los medios sólidos (36), tal como se observa en el anexo 1C para el aislamiento IIGO5. Actualmente esta Actinobacteria se ha encontrado en agua. (48)

Para los aislamientos de *Stenotrophomonas rhizophila* (Anexo 1C, aislamientos: IIAT1, IIAT2) se observó un morfotipo parecido al descrito por Wolf et al. en el 2002, quien las describe de color amarillo verdoso y sin actividad lipolítica, difiriendo del morfotipo aislado en este estudio, ya que esta si hidroliza sustratos lipolíticos de cadena corta (69).

El morfotipo observado en los aislamientos de *Aeromonas* presentó la misma descripción realizada por Abbot et al. 2003 y Cai et al. 2012 quienes describen estas colonias de color amarillo claro o beige con una microscopia de bacilos rectos Gram negativos (Anexo 1C Aislamientos: OAT1, OAT2) (1,10).

*Burkholderia fungorum* mostró uno de los tres morfotipos mencionados por Estrada et al. en el 2002 con unas colonias blancas, pequeñas, circulares, mucosas, convexas, de borde completo, tal como se observan en el anexo 1C en el aislamiento IIGT2. Esta especie de *Burkholderia* se ha encontrado principalmente asociada a hongos de podredumbre blanca (20).

Los aislamientos fueron bacilos Gram negativos, todos pertenecientes al *phylum* Proteobacteria (2), exceptuando un coco Gram positivo identificado como *Dermacoccus nishinomiyaensis* perteneciente al *phylum* Actinobacteria (25).

### 7.2 Análisis de restricción del ADNr 16S amplificado (ARDRA) y Análisis de las secuencias e identificación de las cepas para la estimación de la diversidad de bacterias lipolíticas en el ecosistema de páramo y glaciar.

El análisis de restricción del gen ADNr16S (ARDRA) brindó información preliminar sobre la diversidad de microorganismos lipolíticos presente en ambos ecosistemas. Esta información fue corroborada a través de la secuenciación y análisis bioinformático del gen ADNr 16S. En el análisis de diversidad para el ecosistema de glaciar, el dendograma producto del ARDRA (Fig.8) muestra en el grupo I los aislamientos, que de acuerdo con el análisis de la secuencia del 16S pertenecen al

género *Pseudomonas*. En el grupo II se encuentran los géneros *Stenotrophomonas* y *Burkholderia*. En el grupo III el género *Ralstonia* y por último el grupo IV con un solo individuo *Dermaococcus nishinomiyaensis*. Los grupos de este dendograma reflejaron la diversidad de bacterias lipolíticas en suelo de glaciar a nivel de género.

En el caso de la diversidad de bacterias lipolíticas en suelo de páramo, el dendograma del ARDRA (Fig.9) mostró el género de *Aeromonas* en el grupo I, exceptuando la cepa OAO2, que curiosamente fue ubicada de manera distante en el grupo VII. Aislamientos pertenecientes al género *Stenotrophomonas* se ubicaron en los grupos II, III y VI, también alejados dentro del árbol. Finalmente en el grupo IV y V se ubicaron todas las especies de *Pseudomonas*.

Estos resultados muestran que la información obtenida a través de ARDRA refleja la diversidad genética de los aislamientos, pero esta técnica de *fingerprinting* no es una herramienta muy útil para la discriminación de bacterias a nivel de especies de bacterias (14).

Otro aspecto a tener en cuenta, observando el agrupamiento generado en el ARDRA de aislamientos del enriquecimiento de suelo de páramo, es la ubicación de bacterias del mismo género en distintos grupos como se mencionó anteriormente. Esto se evidencia por los dos grandes grupos que conforma el árbol según el tipo de sustrato (LB con tributirina 1% ó LB con aceite de oliva 1%). Aunque el ADNr 16S de estos dos grupos de bacterias fue digerido con las mismas enzimas y bajo las mismas condiciones, se observaron patrones de restricción diferentes. La única condición que varió en el ARDRA, fue el corrido electroforético en geles independientes para cada caso. Esto se hizo con el fin de mejorar la resolución de las bandas en el gel. De acuerdo con esto podemos suponer que el corrido electroforético en diferentes geles, ocasionó una variación en el patrón de bandas obtenido.

Con el fin de obtener información más precisa sobre la diversidad de bacterias lipolíticas en estos dos enriquecimientos, se llevó a cabo el análisis de la secuencia del gen ADNr 16S de todos los aislamientos. Los resultados mostraron que en el enriquecimiento de suelo glaciar se presentan 5 géneros, donde predominan diferentes especies de *Pseudomonas*, seguidas por *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia* y finalmente *Dermaococcus*. En el enriquecimiento de suelo de páramo se obtuvieron solo tres géneros, *Pseudomonas* (Con alta diversidad de especies), *Stenotrophomonas* y *Aeromonas*.

De acuerdo con la información producto del análisis de la secuencia del gen ADNr 16S, el ecosistema de glaciar tiene mayor diversidad de bacterias lipolíticas que el ecosistema de páramo. Estos resultados difieren de lo reportado por Buytaert *et al.*, (2006) (9), quien sustenta que el suelo de páramo contiene una mayor diversidad microbiana, como consecuencia de las condiciones de temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, el hecho de haber realizado un cultivo enriquecido, implica cambios en la dinámica de la comunidad, causadas por las interacciones microbianas dentro del bioreactor, la presión de selección generada por el aceite de oliva como única fuente de carbono y las condiciones de temperatura y pH (4).

La mayor proporción de bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* en el enriquecimiento de suelos en ambos ecosistemas, ha sido documentada por Bardgett *et al.* (2005), quienes afirman que la diversidad disminuye cuando un nicho aporta más individuos a la comunidad que otro, debido a que los mejor adaptados terminan dominando la comunidad y cuando el aumento de la competencia entre bacterias se incrementa por la adición de un sustrato no convencional (4) como el aceite de oliva en este caso. Generalmente este tipo de

microorganismos tienen una estrategia de consumo rápido de sustratos fácilmente disponibles y son los que en un enriquecimiento por una fermentación alimentada se van a ver favorecidos.

Los *phyla* Proteobacteria y Actinobacteria identificados en los enriquecimientos de páramo y glaciar también han sido reportados en estudios recientes en ambientes de bajas temperaturas (15, 46, 57, 60). Adicionalmente estos autores encuentran la presencia de bacterias pertenecientes a los *phyla* Bacteroidetes y Firmicutes. Otros reportes han indicado la presencia de diferentes especies de *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Burkholderia* y *Ralstonia* como bacterias psicrófilas productoras de lipasas (34, 27, 72).

Todas las bacterias aisladas del cultivo enriquecido de suelo de páramo y glaciar caracterizadas en este trabajo, han sido reportadas por otros autores en estudios previos en ambientes fríos por debajo de los 20°C (Tabla 2). En bajas temperaturas las bacterias lipolíticas son capaces de llevar a cabo sus funciones metabólicas a través de los mecanismos de adaptación que han desarrollado para enfrentarse a esta condición extrema. El género *Aeromonas*, por ejemplo, ha sido encontrado en sedimentos marinos y ambientes acuáticos (44). El género *Burkholderia* fue reportado en suelos con temperaturas de 10°C (33). *Dermacoccus nishinomiyaensis* ha sido aislado también en ambientes acuáticos (48). *Pseudomonas* sp. en ambientes subterráneos y en suelos de Alaska (53). *Pseudomonas congelans* en la superficie de las hojas de pastos (5). *Pseudomonas fragi* en carne refrigerada y en industrias de lácteos (21, 45). *Pseudomonas jessenii* y *Pseudomonas mandelii* en agua mineral subterránea (65). *Pseudomonas lini* en ambientes acuáticos, raíces y suelos (17). *Pseudomonas psychrophila* en cuartos fríos para almacenamiento de comidas (73). *Ralstonia pickettii* en ambientes acuáticos y suelos (16) y *Stenotrophomonas rhizophila* principalmente en suelos y raíces (69).

Con relación al género *Stenotrophomonas*, Wang *et al.*, (2008) reportan específicamente la especie *S. maltophila*, la cual presenta una alta capacidad lipolítica (66), sin embargo para la especie identificada en este estudio, *Stenotrophomonas rhizophila*, la información sobre lipasas es escasa; situación similar a la anterior se encuentra para *Dermacoccus nishinomiyaensis* que se ha reportado en aguas termales y en piel de mamíferos (54); motivo por el cual profundizar en el estudio de estos dos géneros podría ser interesante con miras a una posible aplicación biotecnológica.

### 7.3 Caracterización preliminar de la actividad lipolítica:

Con base en el diámetro del halo de hidrólisis y el análisis estadístico, en este trabajo cuatro de las especies identificadas: *Pseudomonas fragi*, *Ralstonia picketti*, *Pseudomonas psychrophila* y *Stenotrophomonas rhizophila*, presentaron una mayor capacidad lipolítica. El potencial biotecnológico de lipasas en *Pseudomonas fragi* y *Ralstonia picketti* ha sido documentado en trabajos relacionados con la actividad y estabilidad de lipasas a bajas temperaturas (34, 27). Sin embargo, para *Pseudomonas psychrophila* no se encontraron referencias sobre dicha actividad y únicamente se encuentran reportes sobre su cercanía a *Pseudomonas fragi*, quien ha sido previamente reportada como productora de lipasas extracelulares (73). Esta cercanía se hace evidente en los grupos conformados en los arboles de distancias en este trabajo (Fig.11). En el caso de *Stenotrophomonas rhizophila*, hasta la fecha no existen reportes de lipasas extracelulares, siendo este el primer estudio que documenta la producción de lipasas en esta especie.

En cuanto a la actividad lipolítica con base en la presencia y el tamaño de halo de hidrólisis sobre medios suplementados con sustratos lipídicos, algunos autores reportaron que el mayor halo hidrólisis obtenido por bacterias provenientes de suelos del amazonas fue de 1.6 mm en aceite oliva al 2% (68), mientras que el mayor halo de hidrólisis obtenido en este trabajo sobre el mismo sustrato lipídico pero al 1%, fue de 7 mm. Takó et al. (2002) evaluó los halos de hidrólisis sobre tributirina al 0.1% obteniendo el mayor halo de hidrólisis de 12 mm con la bacteria *Umbelopsis autotrophica* (61), mientras que en este ensayo se evaluó este mismo sustrato pero en mayor concentración, al 1%, obteniendo halos de hidrolisis hasta de 11 mm.

Algunos halos de hidrólisis observados en este estudio, están por encima del promedio en relación a los observados por otros autores. *Pseudomonas fragi* obtuvo unos diámetros de hidrólisis de 7mm en aceite de oliva y 10 mm en tributirina. *Pseudomonas psychrophila* 11 mm en tributirina y 5 mm en aceite de oliva. *Ralstonia picketti* 10 mm en tributirina. *Stenotrophomonas rhizophila* 7 mm en tributirina.

Por otro lado una posible explicación para la baja actividad lipolítica mostrada por algunos aislamientos se encuentra soportada por el trabajo de Persson en el 2002, quien sugiere que la baja actividad puede atribuirse a la temperatura empleada, ya que cada enzima difiere de su energía de activación y de su selectividad, dependiendo de la temperatura a la que se expone (50). Este factor puede tener influencia sobre la aparición y tamaño del halo, que en nuestro caso fue evidente en algunas cepas, donde el halo apareció después de 15 días o incluso hasta un mes de incubación a 20°C.

Otros trabajos llevados a cabo en GeBiX han permitido encontrar novedosas esterasas monoméricas adaptadas a frio, bajo una aproximación metagenómica, en suelos de bosque alto andino del PNN. En estos proyectos se ha evaluado de manera cualitativa la actividad lipolítica para identificar la presencia o ausencia de lipasas o esterasas en los clones metagenómicos obtenidos. Los halos de hidrólisis observados en agar LB con tributirina al 1% no son comparables con los obtenidos por la mayoría de las enzimas reportadas de librerías metagenómicas, sin embargo la actividad lipolítica puede mejorarse con el uso de cofactores como solventes, surfactantes e iones (32).

Sin embargo en base a los resultados obtenidos en este estudio bajo la aproximación de cultivos enriquecidos, se puede inferir que los microorganismos muestran mayor halo de hidrolisis sobre los sustratos lipídicos, cuando se aíslan bajo este *screening* funcional, permitiendo seleccionar de manera preliminar los microorganismos que mas hidrolizan sustratos lipídicos a partir de lipasas extracelulares que son secretadas al medio.

Cuando se realiza estos ensayos cualitativos de actividad lipolítica es importante tener en cuenta que los datos de actividad cuantitativa que se van a obtener posteriormente a diferentes pH y temperaturas sobre los extractos enzimáticos o incluso sobre la enzima purificada, pueden variar de los obtenidos a partir del ensayo cualitativo.

Cabe destacar que ambas aproximaciones tanto la de metagenómica como la de cultivo enriquecido presentan sus ventajas y sus desventajas, sin embargo el objetivo principal dentro de la búsqueda de lipasas es la obtención de la enzima purificada con alta capacidad hidrolítica en diferentes sustratos lipídicos. Y en este caso, la evaluación cualitativa es la visión preliminar sobre las lipasas que pueden presentar los microorganismos evaluados.

Esta visión preliminar sobre la diversidad de bacterias lipolíticas del enriquecimiento de suelos de páramo y glaciar, demostró que las especies de *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas psychrophila*, *Ralstonia picketti* y *Stenotrophomonas rhizophila*, se destacan por su capacidad hidrolítica en sustratos lipídicos de cadena corta y larga, siendo seleccionadas para estudios posteriores sobre sus lipasas que se infiere son enzimas adaptadas a frío, por las condiciones de los suelos donde fueron recolectadas. Estudios posteriores de bioprospección, pueden verificar la presencia de lipasas novedosas, para las especies de *Pseudomonas psychrophila* y *Stenotrophomonas rhizophila*, ya que a la fecha no se encuentran reportes sobre la actividad lipolítica en estas especies.

## 8. CONCLUSIONES

Se logró reactivar 43 cepas aisladas a partir de un cultivo microbiano enriquecido con aceite de oliva de muestras de suelo de los ecosistemas de páramo y glaciar del Parque Nacional Natural de los Nevados e identificar cada cepa a partir de la secuencia del gen ADNr 16S.

Se estimó preliminarmente la diversidad de bacterias lipolíticas mediante el Análisis de Restricción del ADN Ribosomal Amplificado ARDRA y el análisis de la secuencia completa del gen ribosomal 16S. El ecosistema de glaciar presentó mayor diversidad de bacterias lipolíticas y esta estimación se vio influenciada por el enriquecimiento con aceite de oliva.

La evaluación cualitativa de la actividad lipolítica en medio LB con tributirina, permitió seleccionar las especies *Pseudomonas fragi*, *Ralstonia pickettii*, *Stenotrophomonas rhizophila* y *Pseudomonas psychrophila* por ser las que presentaron mayor tamaño del halo de hidrólisis. En el medio LB con aceite de oliva fueron seleccionadas las especies *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas psychrophila* que hidrolizaron ácidos grasos de cadena larga.

## 9. RECOMENDACIONES

Utilizar un mayor número de enzimas de restricción de corte frecuente en el análisis ARDRA con el fin de obtener más información para la estimación de diversidad de bacterias lipolíticas en suelos de páramo y glaciar.

Evaluar las cepas seleccionadas a partir del *screening* funcional en diferentes condiciones de temperatura y pH para estimar su estabilidad y determinar los valores óptimos en los que se presenta la actividad lipolítica.

Se sugiere evaluar la actividad lipolítica de las enzimas en diferentes sustratos con el fin de determinar su especificidad

Evaluar a través de un ensayo cuantitativo la actividad lipolítica de los extractos enzimáticos provenientes de las cepas seleccionadas.

Amplificar los genes lipolíticos de las cepas seleccionadas y secuenciarlos para identificar las lipasas y clasificarlas dentro de las familias propuestas por Arpigny y Jaeger 1999.

Es importante profundizar y seguir evaluando la actividad lipolítica en *Stenotrophomonas rhizophila* y *Pseudomonas psychrophila*, porque producen halos de hidrólisis por encima del promedio y hasta la fecha no se encuentran reportes sobre sus lipasas.



## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Abbott SL, Cheung WK, Janda M. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. *Journal of clinical microbiology* 2003; **41** (6): 2348–2357.
2. Ahrens A, Lipski A, Klatte S, Busse HJ, Auling G, Altendorf K. Polyphasic Classification of Proteobacteria Isolated from Biofilters. *System. Appl. Microbio.* 1997; **20**, 255-267.
3. Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 1999; **343**, 177-183.
4. Bardgett RD, Usher MB, Hopkins DW. *Biological Diversity and Function in Soils*. Cambridge University Press. United States. New York. 2005, 87, 89, 90 p.
5. Behrendt U, Ulrich A, Schumann P. "Fluorescent pseudomonas associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov.". *Evol. Microbiol.* 2003; **53**, 1461-1469.
6. Benitez PL, Camacho ML, Aparicio R. A comprehensive study of hazelnut oil composition with comparisons to other vegetable oils, particularly olive oil. *Eur Food Res Technol* 2003; **218**, 13–19.
7. Bisht SS, Panda AK. Biochemical Characterization and 16S rRNA Sequencing of Few Lipase-Producing Thermophilic Bacteria from Taptapani Hot Water Spring, Orissa, India. *Biotechnology Research International* 2011; doi:10.4061/2011/452710.
8. Brim H, Heyndrickx M, Vos P, Wilmotie A, Springael D, Schlegel HG, Mergea M. Amplified rDNA Restriction Analysis and Further Genotypic Characterisation of Metal-Resistant Soil Bacteria and Related Facultative Hydrogenotrophs. *System. Appl. Microbiol* 1999; **22**, 258-268.
9. Buytaert W, Deckers J, Wyseure G. Description and classification of nonallophanic Andosols in south Ecuadorian alpine grasslands (páramo). *Geomorphology* 2006; **73**, 207–221.
10. Cai S, Wu Z, Jian J, Lu J, Tang J. Characterization of pathogenic *aeromonas veronii* bv. *veronii* associated with ulcerative syndrome from chinese longsnout catfish (*leiocassis longirostris* güntner). *Brazilian Journal of Microbiology* 2012; 382-388.
11. Cai Y, Wang L, Liao X, Ding Y, Sun J. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. *Process Biochemistry* 2009; **44**, 786–790.
12. Cavicchioli R, Charlton T, Ertan H, Mohd Omar S, Siddiqui K.S, Williams T. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microb. Biotechnol.* 2011; **4**, 449–460.
13. Chakravarthy KB, Narasu LM. Screening, isolation and identification of extracellular lipase producing bacteria from oil mill waste. *J. Chem. Bio. Phy. Sci.* 2012; **2** (2): 814-819.
14. Chaturvedi V, Kumar A. Diversity of culturable sodium dodecyl sulfate (SDS) degrading bacteria isolated from detergent contaminated ponds situated in Varanasi city, India. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2011; **65**, 961-971.
15. Cheng SM, Foght JM. Cultivation-independent and -dependent characterization of Bacteria resident beneath John Evans Glacier. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; **59**, 318–330.

16. Coenye T, Goris J, Vos P, Vandamme P, LiPuma JJ. Classification of *Ralstonia pickettii*-like isolates from the environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; **53**, 1075–1080.
17. Delorme S, Lemanceau P, Christen R, Corberand T, Meyer JM, Gardan L. *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; **52**, 513–523.
18. Dherbécourt J, Thierry A, Madec MN, Lortal S. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, peptidoglycan hydrolase and biochemical profiles for rapid dairy propionibacteria species identification. *Research in Microbiology* 2006; **157**, 905–913.
19. Entcheva P, Liebl W, Johann A, Hartsch T, Streit W. Direct Cloning from Enrichment Cultures, a Reliable Strategy for Isolation of Complete Operons and Genes from Microbial Consortia. *Applied and environmental microbiology* 2001; **67** (1): 89–99.
20. Estrada P, Mavingui P, Cournoyer B, Fontaine F, Balandreau J, Caballero J. A N<sub>2</sub>-fixing endophytic Burkholderia sp. Associated with maize plants cultivated in Mexico. *Can. J. Microbiol.* 2002; **48**, 285–294.
21. Ferrocino I, Ercolini D, Villani F, Moorhead SM, Griffiths MW. *Pseudomonas fragi* Strains Isolated from Meat Do Not Produce N-Acyl Homoserine Lactones as Signal Molecules. *Journal of Food Protection* 2009; **72** (12): 2597–2601.
22. GaoXG, Cao SG, Zhang KC. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme and Microbial Technology* 2000; **27**, 74–82.
23. Gombert AK, Pinto AL, Castilho LR, Freire D. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry* 1999; **35**, 85–90.
24. Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; **64**, 763–781.
25. Gvozdiak OR, Schumann P, Gripenburg U, Auling G. Polyamine Profiles of Gram-positive Catalase Positive Cocci. *System. Appl. Microbiol.* 1998; **21**, 279-284.
26. HasanF, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 2006; **39**, 235–251.
27. Hemachander C, Puvanakrishnan R. Lipase from *Ralstoniapickettii* as an additive in laundry detergent formulations. *Process biochemistry* 2000; **35**, 809-814.
28. Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol* 1999; **53**, 315–51.
29. Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 1994; **15**(1):29-63.
30. Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH* 1998; **16**, 396-403.
31. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of clinical microbiology* 2007; **45** (9): 2761–2764.

32. Jimenez DJ, Montaña JS, Alvarez D, Baena S. A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean forest soil metagenome. *World J Microbiol Biotechnol* 2012; **28**, 361–370.
33. Jin D, Wang Z, Cao J, Yu L. Purification and characterization of a novel cold-adapted lipase from Burkholderia anthina NT15. *African Journal of Microbiology Research* 2012; **6** (31): 6075-6080.
34. Joseph B, RamtekePW, Thomas G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances* 2008; **26**, 457–470.
35. Kademi A, Abdelkader N, Fakhreddine L, Baratti JC. A thermostable esterase activity from newly isolated moderate thermophilic bacterial strains. *Enzyme and Microbial Technology* 1999; **24**, 332–338.
36. Kocur M, Schleifer KH, Kloos WE. Taxonomic Status of Micrococcus nishinomiyaensis Oda 1935. *International journal of systematic bacteriology* 1975; **25** (3): 290-293.
37. KoukerG, JaegerKE. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Applied and environmental microbiology* 1987; **53** (1): p. 211-213.
38. Krizova J, Spanova AS, Rittich B. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of Bifidobacterium species. *Systematic and Applied Microbiology* 2006; **29**, 36–44.
39. Li Z, Xu J, Tang C, Wu J, Muhammad A, Wang H. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. *Chemosphere* 2006; **62**(8): 1374–1380.
40. Liu X, Bolla K, Ashforth EJ, Zhuo Y, Gao H, Huang P, Stanley SA, Hung DT, Zhang L. Systematics-guided bioprospecting for bioactive microbial natural products. *Antonie van Leeuwenhoek* 2012; **101**, 55–66.
41. Marchandin H, Teyssier C, Bilak EJ, Robert M, Artigues AC, Pierre HJ. Molecular identification of the first human isolate belonging to the Veillonellaratti–Veillonellacriceti group based on 16S rDNA and dnaK gene sequencing. *Research in Microbiology* 2005; **156**, 603–607.
42. Melcher IM, Bouman F, Cleef AM. Seed atlas of the monocotyledonous genera of the páramo. *Flora* 2004; **199**, 286–308.
43. Messiasa JM, Costaa BZ, Limab V, Dekker R, Rezendea MI, Kriegerd N, Barbosa AM. Screening Botryosphaeria species for lipases: Production of lipase by Botryosphaeria ribis EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* 2009; **45**, 426–431.
44. Miñana DG, Farfan M, Fuste MC, Loren JG. Aeromonas bivalvium sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; **57**, 582–587.
45. Morrison HB, Hammer BW. distribution of Pseudomonas fragi. *Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bul.* 1937; 9-17.
46. Neufeld JD, Yu Z, Lam W, Mohn WW. Serial analysis of ribosomal sequence tags (SARST): a high-throughput method for profiling complex microbial communities. *Environmental Microbiology* 2004; **6** (2): 131–144.

47. Pascale D, Santi C, Fu J, Landfald B. The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. *Marine Genomics* 2012; doi:10.1016/j.margen.2012.04.004.
48. Pathom W, Nogi Y, Sutcliffe LC, Ward AC, Horikoshi K, Bull AT, Goodfellow M. *Dermacoccus abyssi* sp. nov., a piezotolerant actinomycete isolated from the Mariana Trench. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 1233–1237.
49. Patil KJ, Chopda MZ, Mahajan RT. Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology* 2011; **4** (8): 971-982.
50. Persson M, Costes D, Wehtje E, Adlercreutz P. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. *Enzyme and Microbial Technology* 2002; **30**, 916–923.
51. Prazeres JN, Bortolotti JA, Pastore GM. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Brazilian Journal of Microbiology* 2006; **37**, 505-509.
52. Ramani K, Boopathy R, Vidya C, Kennedy LJ, Velanc M, Sekaran G. Immobilisation of *Pseudomonas gessardii* acidic lipase derived from beef tallow onto mesoporous activated carbon and its application on hydrolysis of olive oil. *Process Biochemistry* 2010; **45**, 986–992.
53. Rashid N, Yuji S, Satoshi E, Haruyuki A, Tadayuki I. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**, 4064–9.
54. Ruckmani A, Kaur I, Schumann P, Klenk HP, Mayilraj S. *Calidifontibacter indicus* gen. nov., sp. nov., a member of the family Dermacoccaceae isolated from a hot spring, and emended description of the family Dermacoccaceae. *Int J SystEvolMicrobiol.* 2011; **61**, 2419-2424.
55. Segawa T, Miyamoto K, Ushida K, Agata K, Okada N, Kohshima S. Seasonal Change in Bacterial Flora and Biomass in Mountain Snow from the Tateyama Mountains, Japan, Analyzed by 16S Rna Gene Sequencing and Real-Time PCR. *Applied and environmental microbiology* 2005; **71** (1): p. 123–130.
56. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 2001; **19**, 627–662.
57. Shivaji S, Chaturvedi P, Suresh K, Reddy SN, Dutt CB, Wainwright M, Narlikar V, Bhargava PM. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**, 1465–1473.
58. Silva JE, Jesus PC. Evaluation of the catalytic activity of lipases immobilized on chrysotile for esterification. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2003; **75**(2): 157-162.
59. Spanevello MD, Yamamoto H, Patel KC. *Thermaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel aerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia, and emendation of the genus *Thermaerobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; **52**, 795–800.

60. Steven B, Briggs G, McKay CP, Pollard WH, Greer CW, Whyte LG. Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; **59**, 513–523.
61. Takó M, Kotogán A, Németh B, Vágvölgyi C, Papp T. Production of extracellular lipase enzymes by zygomycetous fungi isolated from soil. Department of Microbiology, Faculty of Science and Informatics, University of Szeged.
62. Teheia M, Zaccab G. Adaptation to extreme environments: Macromolecular dynamics in complex systems. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; **1724**, 404 – 410.
63. Tirawongsaroj P, Sriprang R, Harnpicharnchai P, Thongarama T, Champreda V, Tanapongpipat S, Pootanakit K, Eurwilaichitr L. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *Journal of Biotechnology* 2008; **133**, 42–49.
64. Van Wyngaarden, Fandiño *Parque nacional “los nevados”. Un caso de selección y zonificación de áreas de conservación biológica*. En serie: Investigación 4. Javegraf (eds.) Pontificia Universidad Javeriana. Bogota, Colombia 2002.
65. Verhille S, Baida N, Dabboussi F, Izard D, Leclerc H. Taxonomic Study of Bacteria Isolated from Natural Mineral Waters: Proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *System. Appl. Microbiol* (1999); **22**, 45-58.
66. Wang QF, Houa YH, Z Xua Z, Miaoc JL, Li GY. Purification and properties of an extracellular cold-active protease from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ276. *Biochemical Engineering Journal* 2008; **38**, 362–368.
67. Wang, X., Wang, H., & Tan, C. Degradation and metabolism of hexazinone by two isolated bacterial strains from soil. *Chemosphere* 2005 61(10), 1468-1474. doi: S0045-6535(05)00698-3 [pii]10.1016/j.chemosphere.2005.04.116
68. Willerding AL, Oliveira LA, Moreira FW, Gomes M, Freitas A. Lipase Activity among Bacteria Isolated from Amazonian Soils. *Enzyme Research* 2011; doi:10.4061/2011/720194.
69. Wolf A, Fritze A, Hagemann M, Berg G. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; **52**, 1937–1944.
70. Workentine ML, Harrison JJ, Weljie AM, Tran A, Stenroos PU, Tremaroli V, Vogel HJ, Ceri H, Turner RJ. Phenotypic and metabolic profiling of colony morphology variants evolved from *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Environmental Microbiology* 2010; **12**(6): 1565–1577.
71. Yao C, Cao Y, Wu S, Li S, He B. An organic solvent and thermally stable lipase from *Burkholderia ambifaria* YCJ01: Purification, characteristics and application for chiral resolution of mandelic acid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2013; **85**, 105–110.
72. Yuan B, Cai Y, Liao X, Yun L, Zhang F, Zhang D. Isolation and identification of a cold-adapted lipase producing strain from decayed seeds of *Ginkgo biloba* L. and characterization of the lipase. *African Journal of Biotechnology* 2010; **9** (18): 2661-2667.
73. Yumoto I, Kusano T, Shingyo T, Nodasaka Y, Matsuyama H, Okuyama H. Assignment of *Pseudomonas* sp. strain E-3 to *Pseudomonas psychrophila* sp. nov., a new facultatively psychrophilic bacterium. *Extremophiles* 2001; **5**, 343–349.

74. Zhoua T, Carlsona JM, Doyle J. Evolutionary dynamics and highly optimized tolerance. *Journal of Theoretical Biology* 2005; **236**, 438–447.

## 11. ANEXOS

### ANEXO 1A. Morfología de las colonias aisladas a partir del cultivo enriquecido de suelos de glaciar.

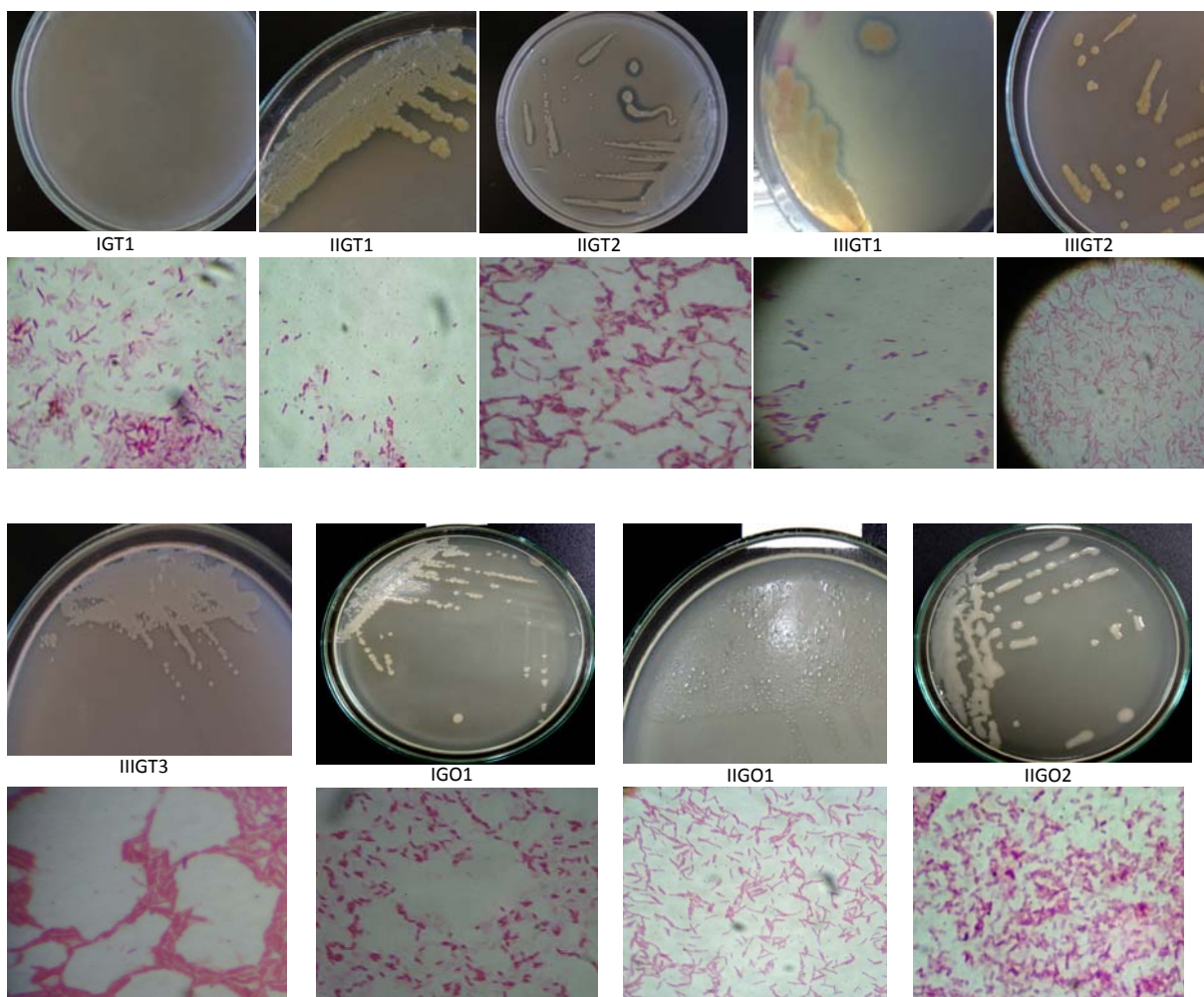
Cepa	Descripción morfológica
IGO1	Colonias blancas cremosas, brillantes, grandes, circulares, de borde definido.
IIGO1	Colonias transparentes, brillantes, de forma irregular, borde definido.
IIGO2	Colonias blancas gelatinosas brillantes, grandes, circulares, de aspecto cremoso, borde definido.
IIIGO1	Colonias blancas crema, textura gelatinosa, grandes, brillantes, circulares, de borde definido.
IIIGO2	Colonias gelatinosas a los bordes y blancas cremosas al centro, circulares, brillantes de borde definido.
IIIGO3	Colonias grandes, de borde gelatinoso traslucido y centro blanco cremoso, forma irregular.
IIIGO5	Colonias pequeñas, amarillas, puntiformes, brillantes, de borde regular.
IGT1	Colonias pequeñas, traslucidas, transparentes, puntiformes, brillantes.
IIGT1	Colonias pequeñas, blancas, traslucidas, puntiformes, de borde definido.
IIGT2	Colonias medianas, color blanco rosado, circulares, brillantes, de borde definido.
IIIGT1	Colonias grandes, gelatinosas, brillantes, de color beige, de borde definido.
IIIGT2	Colonias medianas, de color blanco amarillo, gelatinosas, brillantes.
IIIGT3	Colonias blancas, medianas, circulares, brillantes, de borde definido.

### ANEXO 1B. Morfología de las colonias aisladas a partir del cultivo enriquecido de suelos de páramo.

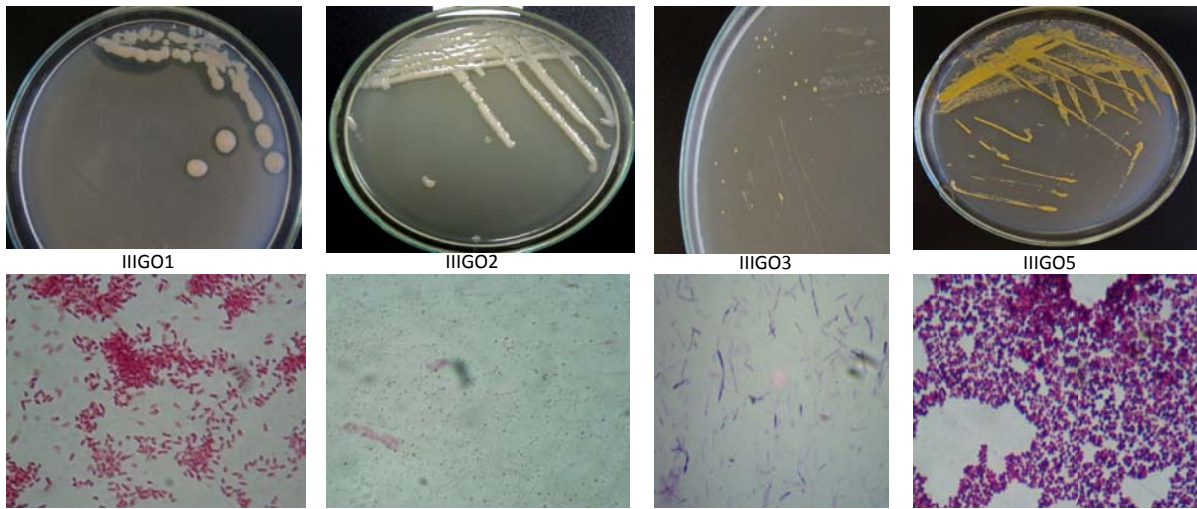
Cepa	Descripción morfológica
OAT1	Colonias medianas, blancas traslucidas, brillantes, circulares, de borde definido.
OAT2	Colonias medianas, blancas, brillantes, circulares, de borde definido.
OAT3	Colonias medianas, blancas, brillantes, circulares, de borde definido.
IAT1	Colonias pequeñas, blancas, amarillas, brillantes, de borde definido, puntiformes
IAT2	Colonias amarillas, traslucidas, brillantes, pequeñas, de borde definido.
IAT3	Colonias grandes, de borde gelatinoso traslucido y centro cremoso, borde definido.
IAT4	Colonias grandes, blancas cremosas, brillantes circulares, borde definido, por dentro tienen zonas más claras.
IIAT1	Colonias pequeñas, amarillas, puntiformes, brillantes, de borde definido.
IIAT2	Colonias pequeñas, color blanco beige, puntiformes, brillantes, de borde definido.
IIAT3	Colonias grandes gelatinosas, circulares, brillantes, blancas cremosas, de borde definido.
IIAT4	Colonias pequeñas, color blanco beige, puntiformes, borde regular.
IIAT5	Colonias pequeñas, puntiformes, brillantes, traslucidas, amarillas, de borde definido.
IIIAT1	Colonias pequeñas, puntiformes, brillantes, traslucidas, amarillas, borde definido
IIIAT2	Colonias medianas, puntiformes, blancas, brillantes, borde definido, a la luz se ven como papel celofán.
IIIAT3	Colonias pequeñas, blancas, puntiformes, cremosas, de borde definido.
OA01	Colonias grandes, blancas cremosas, brillantes, circulares, de borde definido.
OA02	Colonias medianas, blancas cremosas, brillantes, puntiformes de borde definido
OA03	Colonias grandes, blancas, cremosas, brillantes, circulares de borde definido.
OA04	Colonias gelatinosas, brillantes, partes cremosas, circulares, de borde definido.
OA05M	Colonias medianas, circulares, de borde definido, el borde es gelatinoso y oscuro y el centro es blanco y cremoso.
IAO1	Colonias medianas, circulares, blancas, cremosas, brillantes, de borde definido.

<b>IAO2</b>	Colonias medianas, circulares, blancas, cremosas, brillantes, de borde definido.
<b>IAO3</b>	Colonias medianas, circulares, blancas, cremosas, brillantes, de borde definido.
<b>IIAO1</b>	Colonias medianas, circulares, brillantes, blancas, cremosas, a veces con centro traslucido, borde definido.
<b>IIAO2</b>	Colonias, pequeñas, puntiformes, blancas, amarillas, brillantes, de borde definido.
<b>IIAO3</b>	Colonias pequeñas, amarillas, puntiformes, brillantes, traslucidas de borde definido.
<b>IIIAO1</b>	Colonias medianas, blancas, beige, con centro claro, brillantes, de borde definido.
<b>IIIAO2</b>	Colonias pequeñas, blancas, traslucidas, puntiformes, brillantes, de borde definido.
<b>IIIAO3</b>	Colonias pequeñas, blancas, amarillas, brillantes, puntiformes, de borde definido.
<b>IIIAO4</b>	Colonias medianas, amarillas, circulares de borde definido.

**ANEXO 1C. Morfología de los 13 aislamientos obtenidos a partir de cultivo enriquecido del suelo de glaciár.**

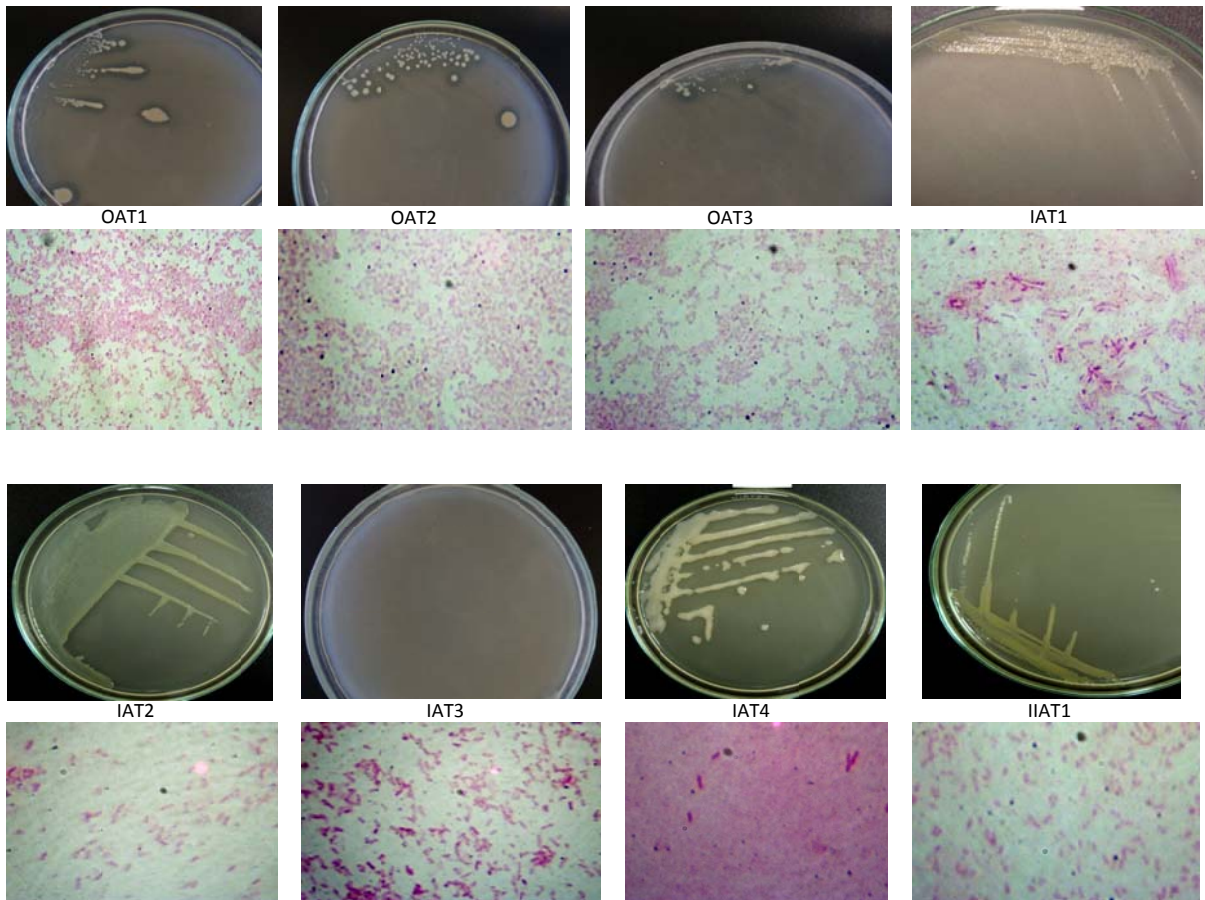






**Anexo 1C.** Descripción microscópica de los aislamientos obtenidos a partir del cultivo enriquecido de suelo de glaciar. Bacilos Gram negativos: IGT1, IIGT1, IIGT2, IIIGT1, IIIGT2, IIIGT3, IGO1, IIGO1, IIGO2, IIIGO1, IIIGO2. Bacilos negativos y positivos: IIIGO3. Cocos positivos: IIIGO5.

**ANEXO 1D. Morfología de los 30 aislamientos obtenidos a partir del cultivo enriquecido del suelo de páramo**





IIAT2



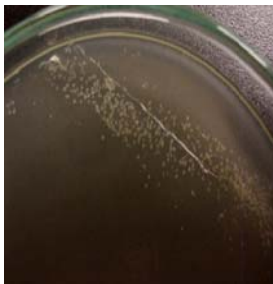
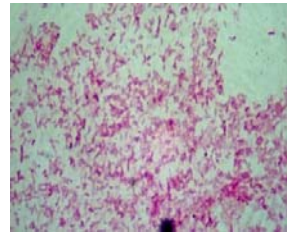
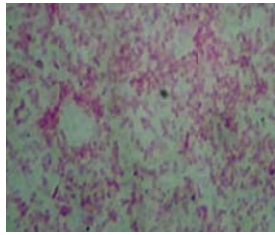
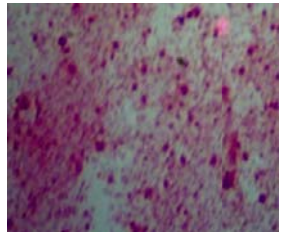
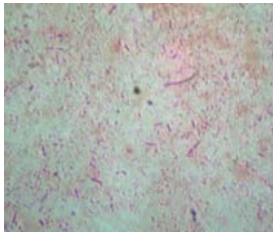
IIAT3



IIAT4



IIAT5



IIIAT1



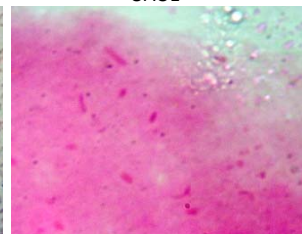
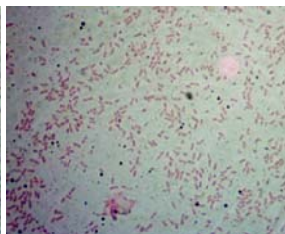
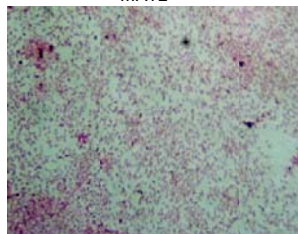
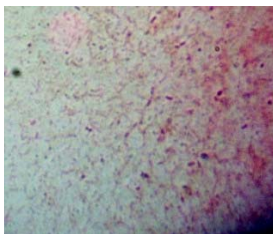
IIIAT2



IIIAT3



OAO1



OAO2



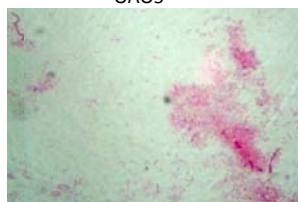
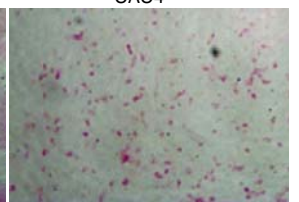
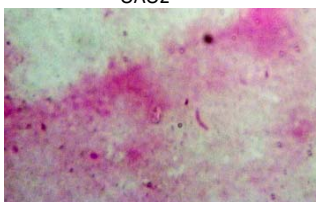
OAO3

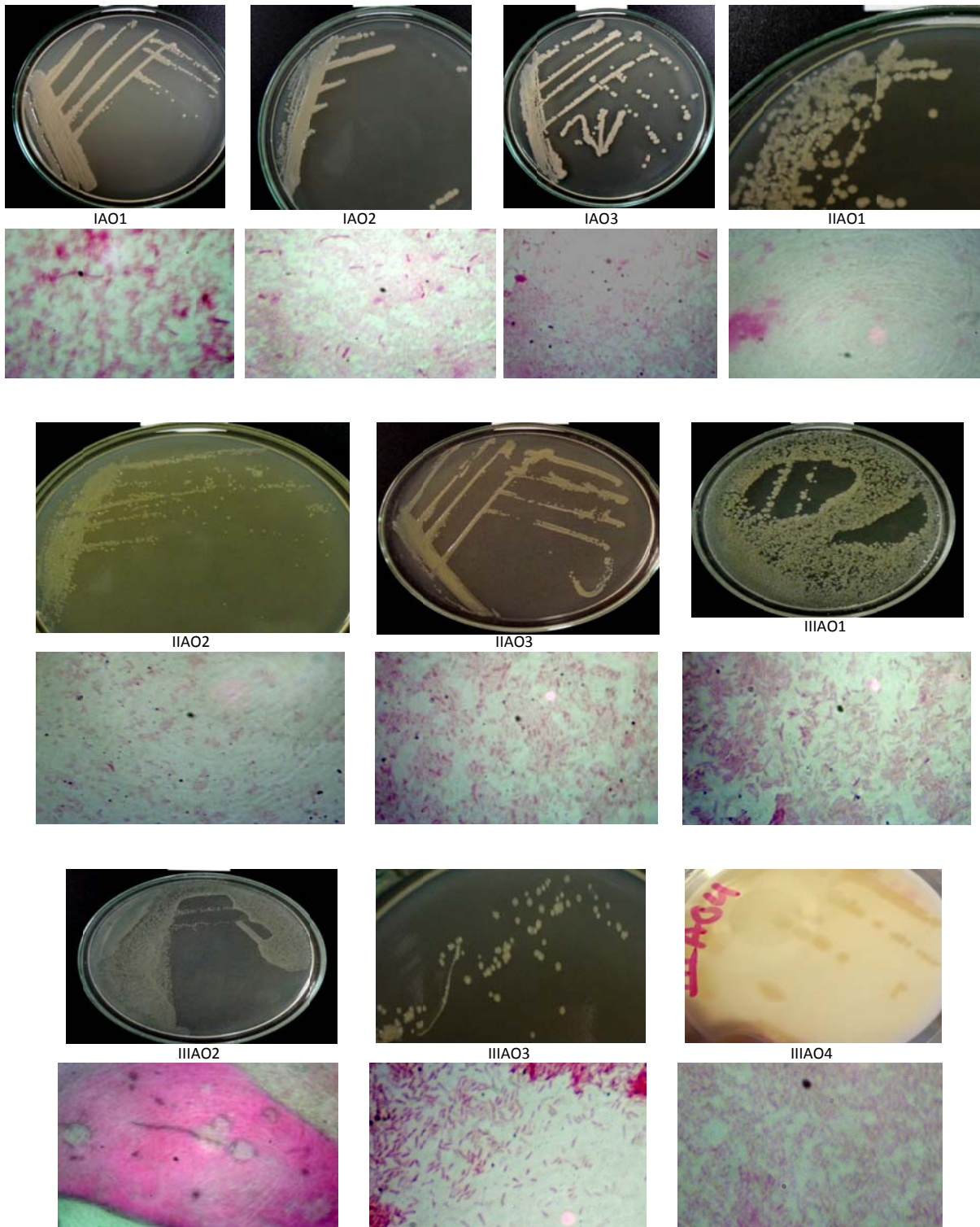


OAO4



OAO5

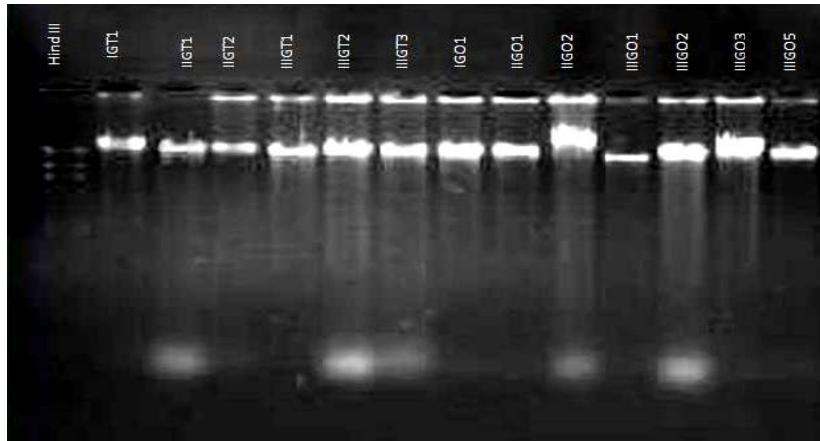




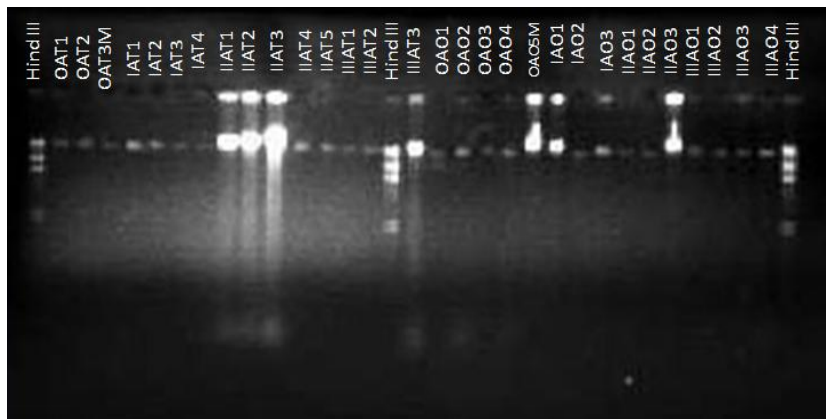
**Anexo 1D:** Descripción microscópica de los aislamientos obtenidos a partir del cultivo enriquecido del suelo de páramo. Bacilos negativos: OAT1, OAT2, OAT3, IAT1, IAT2, IAT3, IAT4, IIAT1, IIAT2, IIAT3, IIAT4, IIAT5, IIIAT1, IIIAT2, IIIAT3, OAO1, OAO2, OAO3, OAO4, OAO5, IAO1, IAO2, IAO3, IIAO1, IIAO2, IIAO3, IIIAO1, IIIAO3, IIIAO4. Bacilos positivos y negativos: IIIAO2.

**ANEXO 2A. Evaluación de la calidad del ADN a través de electroforesis en gel de agarosa 1%**

**Extracciones de ADN de glaciar.**



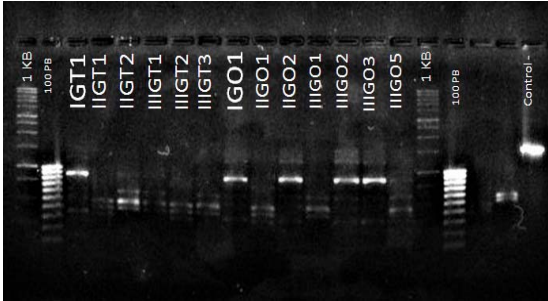
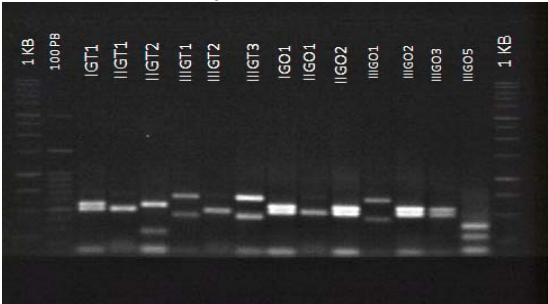
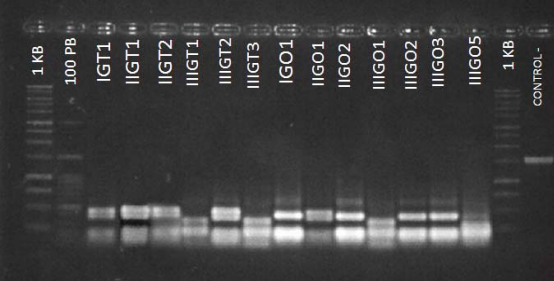
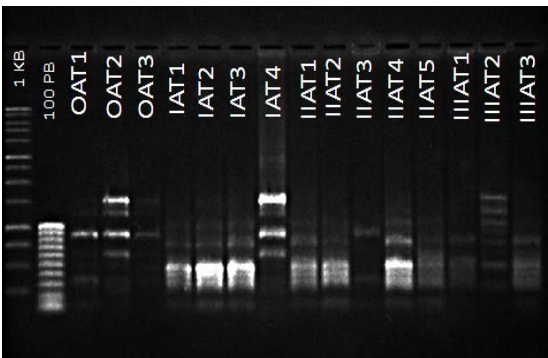
**Extracciones de ADN de páramo**



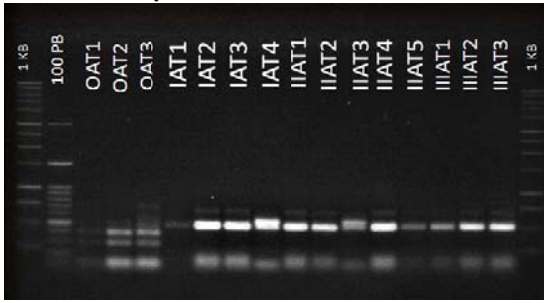
**ANEXO 2B. Evaluación de la calidad del ADN a través de NanoDrop [ThermoScientific]**

<b>Cepa</b>	<b>[ng/μL]</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
IGT1	792	1.9	1.46
IIGT1	3.562	1.92	1.86
IIGT2	718	1.89	1.18
IIIGT1	314.7	1.67	0.67
IIIGT2	2.872	1.95	1.85
IIIGT3	1.631	1.9	1.19
IGO1	1.046	1.91	1.4
IIGO1	1.166	1.9	1.72
IIGO2	2.436	1.96	1.77
IIIGO1	1.104	1.94	1.45
IIIGO2	3.400	1.97	1.86
IIIGO3	1.103	1.9	1.65
IIIGO5	894	1.88	1.31
<b>Cepa</b>	<b>[ng/μL]</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
OAT1	141.9	1.40	0.40
OAT2	1027.2	1.89	1.39
OAT3M	26.4	0.89	0.32
IAT1	543.1	1.76	0.93
IAT2	298.2	1.77	0.86
IAT3	319.7	1.71	0.92
IAT4	352.3	1.71	0.82
IIAT1	263.3	1.60	0.68
IIAT2	332.4	1.59	0.72
IIAT3	101.6	1.24	0.28
IIAT4	486.6	1.84	0.96
IIAT5	105	1.51	0.86
IIIA1	189.3	1.40	0.40
IIIA2	433.3	1.57	0.81
IIIA3	476.1	1.73	0.87
OAO1	477	1.76	0.88
OAO2	80	1.2	0.35
OAO3	123	1.59	0.60
OAO4	114	1.47	0.49
OAO5M	154	1.57	0.59
IAO1	163	1.66	0.74
IAO2	183	1.75	0.89
IAO3	1303.2	1.92	1.69
IIAO1	1488.2	1.92	1.76
IIAO2	3279.2	1.9	1.89
IIAO3	303	1.78	0.99
IIIAO1	136.7	1.54	0.54
IIIAO2	138.9	1.63	0.70
IIIAO3	138.5	1.57	0.63
IIIAO4	1594	1.93	1.80

**ANEXO 3. Electroforesis del análisis de restricción del gen 16S ADNr (ARDRA)**

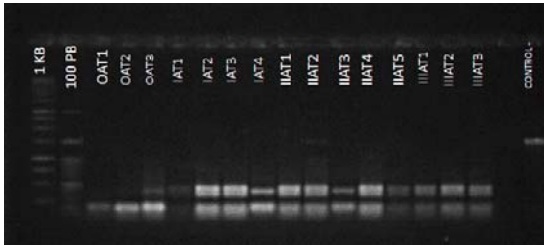
	<b>Número de Bandas</b>	<b>Peso (pb)</b>
<p><b><i>RsaI</i> Glaciar</b></p> 	1	900
	2	500
	3	400
	4	300
<p><b><i>HpaII</i> Glaciar</b></p> 	1	700
	2	600
	3	500
	4	450
	5	400
	6	350
	7	300
	8	150
<p><b><i>AluI</i> Glaciar</b></p> 	1	550
	2	450
	3	400
	4	350
	5	200
	6	150
<p><b><i>RsaI</i> Páramo tributirina</b></p> 	1	1500
	2	1250
	3	900
	4	700
	5	600
	6	450
	7	400
	8	270

**HpaII Páramotributirina**



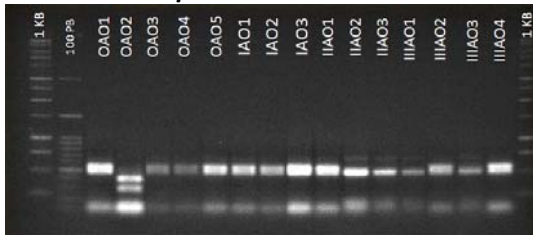
- 1 700
- 2 500
- 3 450
- 4 400
- 5 300
- 6 150

**AluI Páramo tributirina**



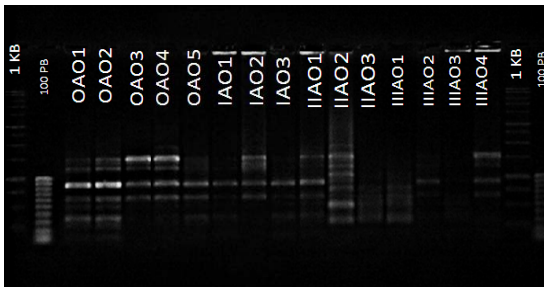
- 1 400
- 2 300
- 3 200
- 4 150

**HpaII Páramo Oliva**



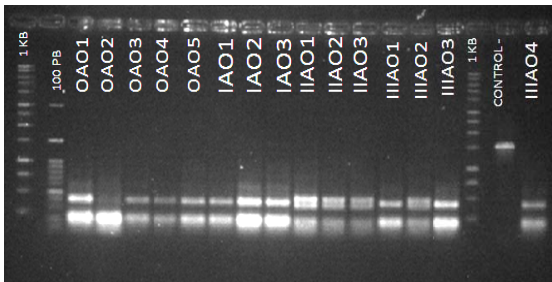
- 1 650
- 2 600
- 3 500
- 4 450
- 5 250
- 6 100

**RsaI Páramo Oliva**



- 1 1500
- 2 1200
- 3 1000
- 4 800
- 5 600
- 6 500
- 7 300

**AluI Páramo Oliva**



- 1 600
- 2 450
- 3 350
- 4 200

**ANEXO 4. Matrices de similitud de ARDRA**

**Coefficiente de Dice para el ARDRA de Glaciar con las tres enzimas *Hpa III*, *Rsa I* y *Alu I*.**

Rows\Cols	IGT1	IIGT1	IIGT2	IIIGT1	IIIGT2	IIIGT3	IG01	IIG01	IIG02	IIIG01	IIIG02	IIIG03	IIIG05
IGT1	1.0000000												
IIGT1	0.8235294	1.0000000											
IIGT2	0.6666667	0.7058824	1.0000000										
IIIGT1	0.2500000	0.4000000	0.5000000	1.0000000									
IIIGT2	0.8235294	1.0000000	0.7058824	0.4000000	1.0000000								
IIIGT3	0.3529412	0.5000000	0.4705882	0.9333333	0.5000000	1.0000000							
IG01	0.8888889	0.7058824	0.5555556	0.2500000	0.7058824	0.3529412	1.0000000						
IIG01	0.7500000	0.9333333	0.7500000	0.4285714	0.9333333	0.4000000	0.6250000	1.0000000					
IIG02	0.8888889	0.7058824	0.5555556	0.2500000	0.7058824	0.3529412	1.0000000	0.6250000	1.0000000				
IIIG01	0.3529412	0.5000000	0.4705882	0.9333333	0.5000000	1.0000000	0.3529412	0.4000000	0.3529412	1.0000000			
IIIG02	0.8888889	0.7058824	0.5555556	0.2500000	0.7058824	0.3529412	1.0000000	0.6250000	1.0000000	0.3529412	1.0000000		
IIIG03	0.8888889	0.7058824	0.5555556	0.2500000	0.7058824	0.3529412	1.0000000	0.6250000	1.0000000	0.3529412	1.0000000	1.0000000	
IIIG05	0.4444444	0.4705882	0.4444444	0.6250000	0.4705882	0.7058824	0.4444444	0.3750000	0.4444444	0.7058824	0.4444444	0.4444444	1.0000000

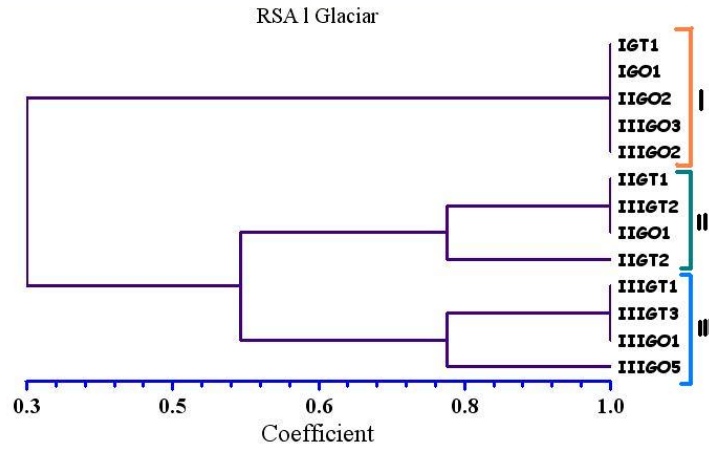


**Coeficiente de Dice para el ARDR de Páramo con las tres enzimas Hpa III, Rsa I yAlu I.**

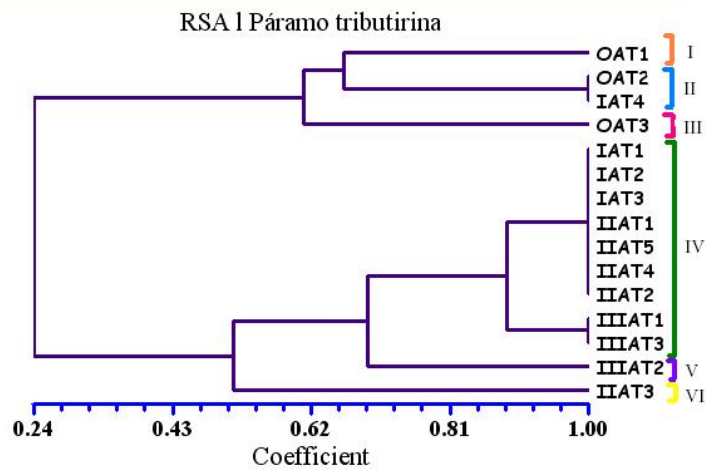
Rows\Cols	OAT1	OAT2	OAT3	IAT1	IAT2	IAT3	IAT4	IIAT1	IIAT2	IIAT3	IIAT4	IIAT5	IIIA1	IIIA2	IIIA3	OAO1	OAO2	OAO3	OAO4	OAO5	IAO1	IAO2	IAO3	IIAO1	IIAO2	IIAO3	IIIAO1	IIIAO2	IIIAO3	IIIAO4
OAT1	1.0000000																													
OAT2	0.8000000	1.0000000																												
OAT3	0.7142857	0.8235294	1.0000000																											
IAT1	0.1538462	0.1250000	0.2666667	1.0000000																										
IAT2	0.3157895	0.3636364	0.4761905	0.7000000	1.0000000																									
IAT3	0.3157895	0.3636364	0.4761905	0.7000000	1.0000000	1.0000000																								
IAT4	0.5333333	0.6666667	0.5882353	0.3750000	0.5454545	0.5454545	1.0000000																							
IIAT1	0.3333333	0.3809524	0.5000000	0.7368421	0.9600000	0.9600000	0.4761905	1.0000000																						
IIAT2	0.3333333	0.3809524	0.5000000	0.7368421	0.9600000	0.9600000	0.4761905	1.0000000	1.0000000																					
IIAT3	0.4615385	0.3750000	0.5333333	0.5714286	0.7000000	0.7000000	0.7500000	0.6315789	0.6315789	1.0000000																				
IIAT4	0.3333333	0.3809524	0.5000000	0.7368421	0.9600000	0.9600000	0.4761905	1.0000000	1.0000000	0.6315789	1.0000000																			
IIAT5	0.2500000	0.3157895	0.4444444	0.8235294	0.8695652	0.8695652	0.4210526	0.9090909	0.9090909	0.5882353	0.9090909	1.0000000																		
IIIA1	0.2352941	0.3000000	0.4210526	0.6666667	0.9166667	0.9166667	0.4000000	0.9565217	0.9565217	0.5555556	0.9565217	0.8571429	1.0000000																	
IIIA2	0.3157895	0.5454545	0.5714286	0.6000000	0.8461538	0.8461538	0.6363636	0.8800000	0.8800000	0.6000000	0.8800000	0.7826087	0.8333333	1.0000000																
IIIA3	0.2352941	0.3000000	0.4210526	0.6666667	0.9166667	0.9166667	0.4000000	0.9565217	0.9565217	0.5555556	0.9565217	0.8571429	1.0000000	0.8333333	1.0000000															
OAO1	0.2500000	0.4210526	0.2222222	0.1176471	0.2608696	0.2608696	0.5263158	0.1818182	0.1818182	0.3529412	0.1818182	0.2000000	0.1904762	0.3478261	0.1904762	1.0000000														
OAO2	0.2857143	0.4705892	0.2500000	0.2666667	0.2857143	0.2857143	0.5882353	0.3000000	0.3000000	0.4000000	0.3000000	0.3333333	0.3157895	0.4761905	0.3157895	0.6666667	1.0000000													
OAO3	0.2666667	0.4444444	0.2352941	0.0000000	0.1818182	0.1818182	0.5555556	0.0952381	0.0952381	0.2500000	0.0952381	0.1052632	0.1000000	0.2727273	0.1000000	0.9473684	0.5882353	1.0000000												
OAO4	0.2666667	0.4444444	0.2352941	0.0000000	0.1818182	0.1818182	0.5555556	0.0952381	0.0952381	0.2500000	0.0952381	0.1052632	0.1000000	0.2727273	0.1000000	0.9473684	0.5882353	1.0000000	1.0000000											
OAO5	0.2857143	0.2352941	0.1250000	0.1333333	0.2857143	0.2857143	0.3529412	0.2000000	0.2000000	0.4000000	0.2000000	0.2222222	0.2105263	0.1904762	0.2105263	0.8888889	0.5000000	0.8235294	0.8235254	1.0000000										
IAO1	0.2857143	0.2352941	0.1250000	0.1333333	0.2857143	0.2857143	0.3529412	0.2000000	0.2000000	0.4000000	0.2000000	0.2222222	0.2105263	0.1904762	0.2105263	0.8888889	0.5000000	0.8235294	0.8235254	1.0000000	1.0000000									
IAO2	0.2352941	0.4000000	0.2105263	0.0000000	0.1666667	0.1666667	0.5000000	0.0869565	0.0869565	0.2222222	0.0869565	0.0952381	0.0909091	0.2500000	0.0909091	0.8571429	0.5263158	0.9000000	0.9000000	0.7368421	0.7368421	1.0000000								
IAO3	0.2500000	0.2105263	0.1111111	0.1176471	0.2608696	0.2608696	0.3157895	0.1818182	0.1818182	0.3529412	0.1818182	0.2000000	0.1904762	0.1739130	0.1904762	0.8000000	0.4444444	0.7368421	0.7368421	0.8888889	0.8888889	0.8571429	1.0000000							
IIAO1	0.2352941	0.3000000	0.2105263	0.1111111	0.2500000	0.2500000	0.4000000	0.1739130	0.1739130	0.3333333	0.1739130	0.1904762	0.1818182	0.2500000	0.1818182	0.8571429	0.5263158	0.8000000	0.8000000	0.8421053	0.8421053	0.8181818	0.8571429	1.0000000						
IIAO2	0.2222222	0.3809524	0.2000000	0.1052632	0.2400000	0.2400000	0.4761905	0.1666667	0.1666667	0.3157895	0.1666667	0.1818182	0.1739130	0.3200000	0.1739130	0.1818182	0.6000000	0.7619048	0.7619048	0.7000000	0.7000000	0.6956522	0.6363636	0.7826087	1.0000000					
IIAO3	0.2857143	0.2352941	0.1250000	0.1333333	0.2857143	0.2857143	0.3529412	0.2000000	0.2000000	0.4000000	0.2000000	0.2222222	0.2105263	0.1904762	0.2105263	0.6666667	0.3750000	0.5882353	0.5882353	0.7500000	0.7500000	0.6315789	0.7777778	0.7368421	0.7000000	1.0000000				
IIIAO1	0.3076923	0.2500000	0.1333333	0.1428571	0.3000000	0.3000000	0.3750000	0.2105263	0.2105263	0.4285714	0.2105263	0.2352941	0.2222222	0.2000000	0.2222222	0.7058824	0.4000000	0.6250000	0.6250000	0.8000000	0.8000000	0.5555556	0.7058824	0.6666667	0.7368421	0.9333333	1.0000000			
IIIAO2	0.3076923	0.2500000	0.1333333	0.0000000	0.2000000	0.2000000	0.3750000	0.1052632	0.1052632	0.2857143	0.1052632	0.1176471	0.1111111	0.1000000	0.1111111	0.7058824	0.4000000	0.7500000	0.7500000	0.8000000	0.8000000	0.7777778	0.8235294	0.7777778	0.5263158	0.6666667	0.5714286	1.0000000		
IIIAO3	0.3076923	0.2500000	0.1333333	0.0000000	0.2000000	0.2000000	0.3750000	0.1052632	0.1052632	0.2857143	0.1052632	0.1176471	0.1111111	0.1000000	0.1111111	0.7058824	0.4000000	0.7500000	0.7500000	0.8000000	0.8000000	0.6666667	0.7058824	0.6666667	0.7368421	0.8000000	0.8571429	0.7142857	1.0000000	
IIIAO4	0.2666667	0.4444444	0.2352941	0.0000000	0.1818182	0.1818182	0.5555556	0.0952381	0.0952381	0.2500000	0.0952381	0.1052632	0.1000000	0.2727273	0.1000000	0.9473684	0.5882353	1.0000000	1.0000000	0.8235294	0.8235294	0.9000000	0.7368421	0.8000000	0.7619048	0.5882353	0.6250000	0.7500000	0.7500000	1.0000000

ANEXO 5. Dendogramas de ARDRA

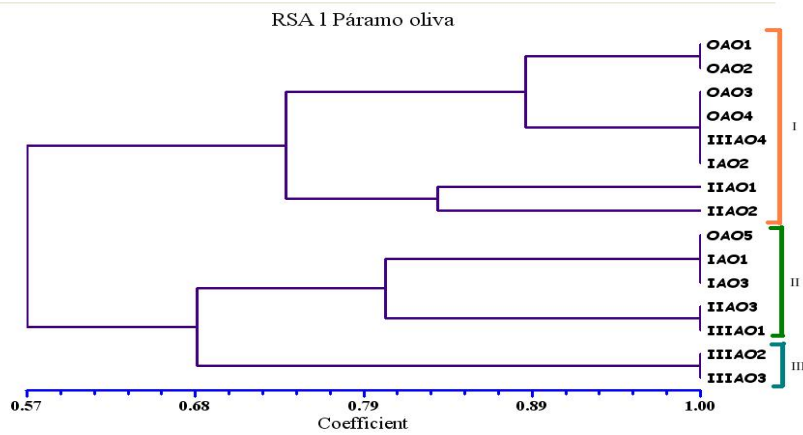
UPGMA con la enzima *RsaI* para Glaciar



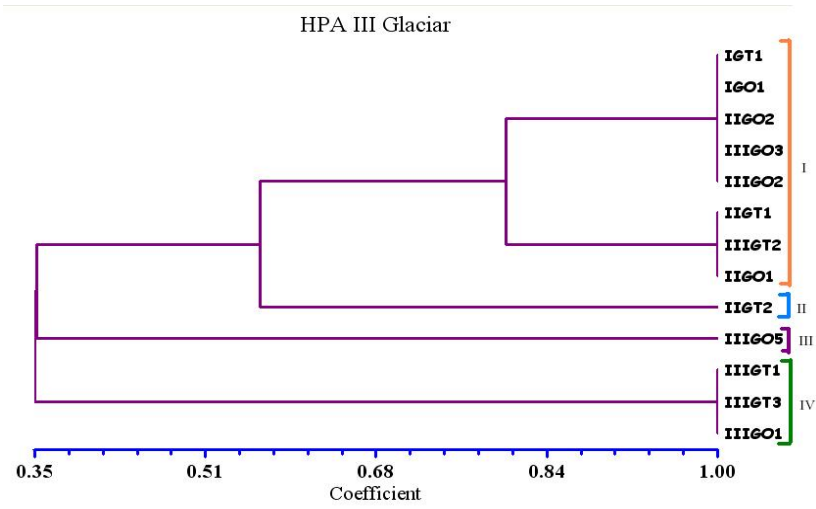
UPGMA con la enzima *RsaI* para Páramo tributirina



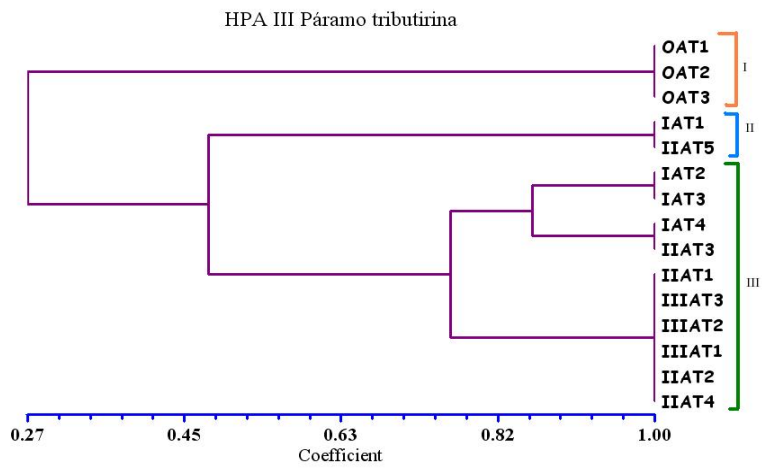
UPGMA con la enzima *RsaI* para Páramo Oliva



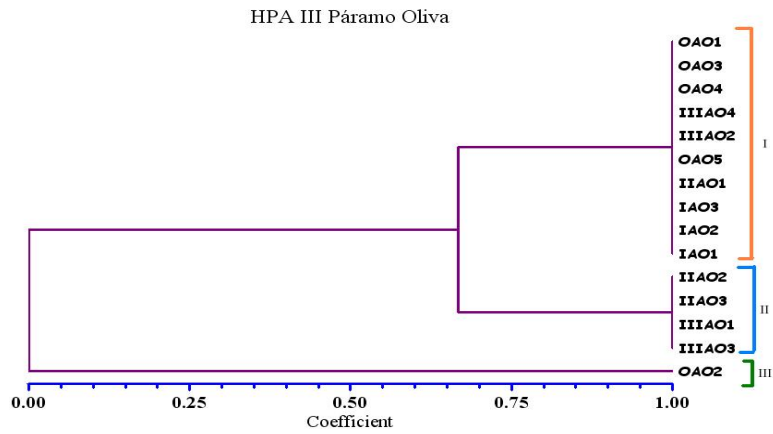
### UPGMA con la enzima *HpaII* para Glaciar



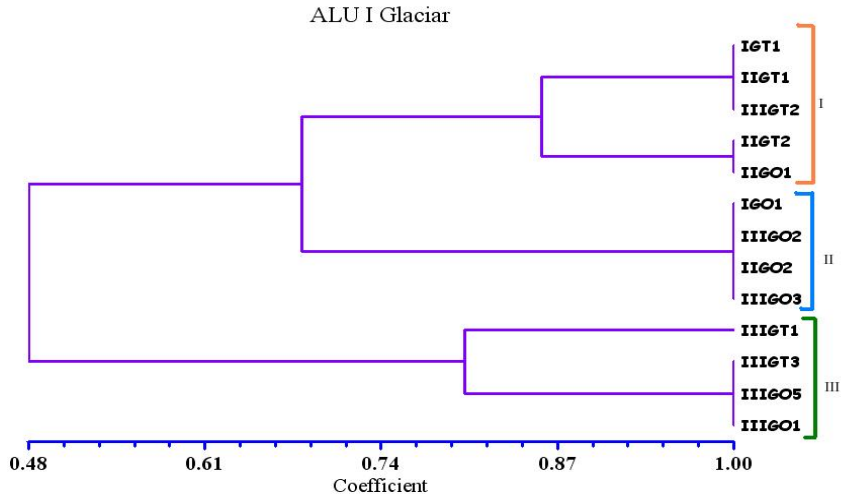
### UPGMA con la enzima *HpaII* para Páramo tributirina



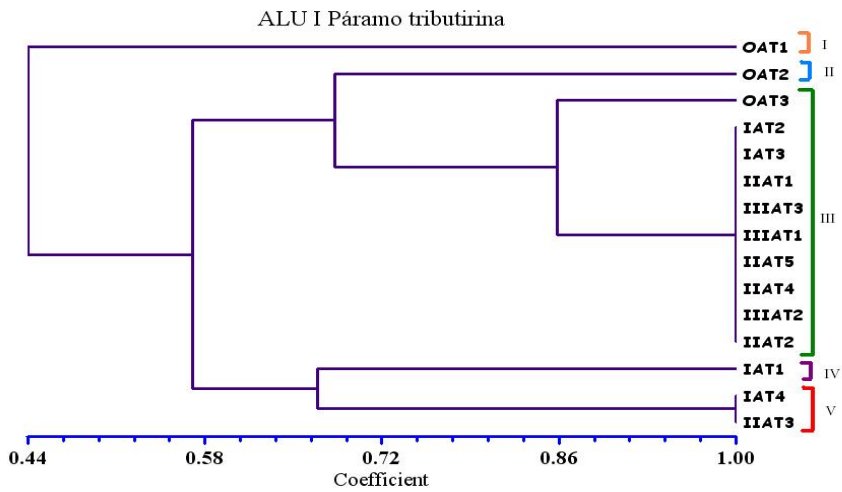
### UPGMA con la enzima *HpaII* para Páramo Oliva



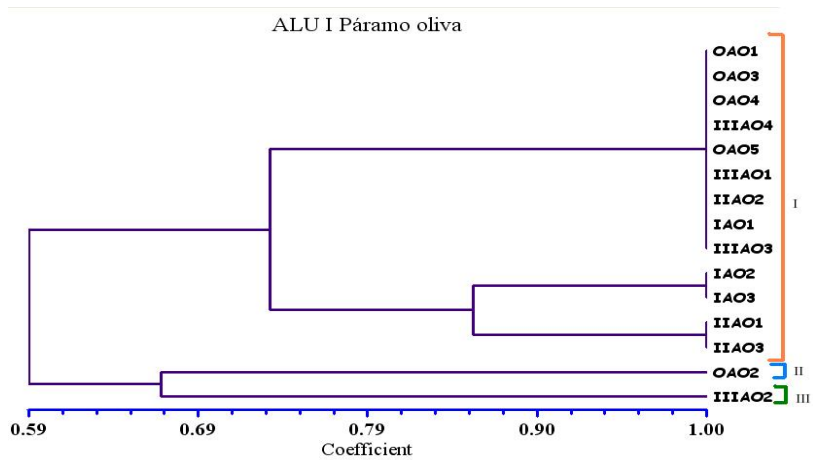
### UPGMA con la enzima *AluI* para Glaciar



### UPGMA con la enzima *AluI* para Páramo tributirina



### UPGMA con la enzima *AluI* para Páramo Oliva



Anexo 6A. Actividad lipolítica de las bacterias aisladas a partir del cultivo enriquecido de suelos de páramo y glaciar en los dos sustratos: Tributirina y Aceite de oliva.



IIG02



IIG01



OAO1



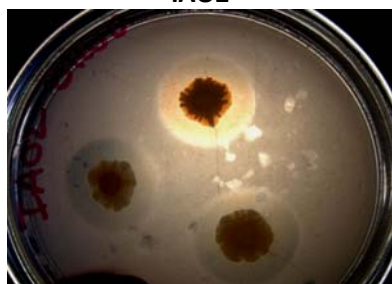
IA01



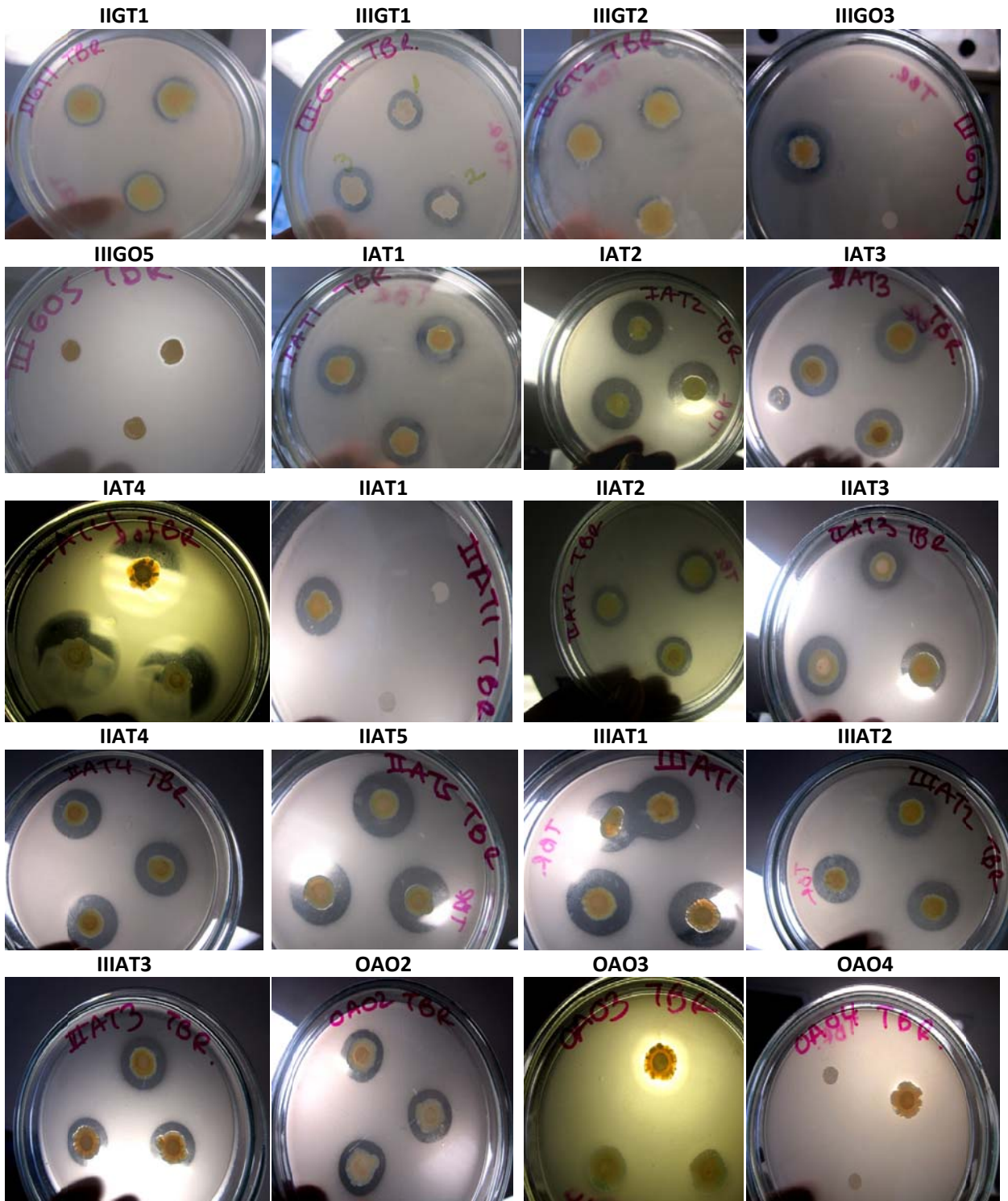
IA02

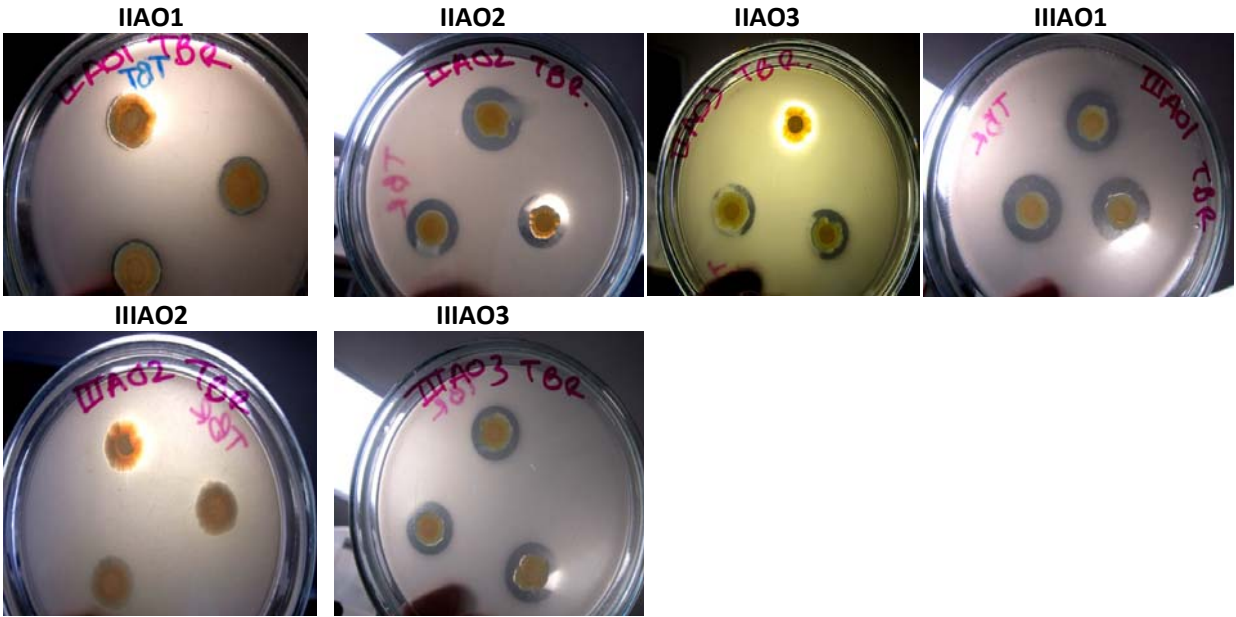


IA03



Anexo 6B. Actividad lipolítica de las bacterias aisladas a partir del cultivo enriquecido de suelos de páramo y glaciario en tributirina.





ANEXO 7. Evaluación cualitativa de actividad cualitativa en tributirina y aceite de oliva

Cepa en TBR	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	Cepa en Oliva	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8
IGT1								IGT1						
IIGT1					0,5	0,66	3	IIGT1						
IIGT2								IIGT2						
IIIGT1		1,33	2	2	2	3	4	IIIGT1						
IIIGT2					0,5	0,5	2	IIIGT2						
IIIGT3								IIIGT3						
IGO1								IGO1						
IIGO1								IIGO1						
IIGO2	1	4	4	4	6	10	10	IIGO2	2	2	2	2	3	5
IIIGO1		2,33	6	6	6	6	10	IIIGO1			1,33	1,33	2	2
IIIGO2								IIIGO2						
IIIGO3		0,33	1,66	1,66	1,66	2	2	IIIGO3						
IIIGO5				0,5	1	1	1	IIIGO5						
OAT1								OAT1						
OAT2								OAT2						
OAT3								OAT3						
IAT1		0,5	2	2	2	3	5	IAT1						
IAT2		0,5	5	5	5	6	7	IAT2						
IAT3		0,5	2	2	2	4	4	IAT3						
IAT4	1	4	4	4	6	11	11	IAT4					0,5	0,5
IIAT1				0,16	0,33	1	1,6	IIAT1						
IIAT2					0,5	2	3	IIAT2						
IIAT3				0,5	1,66	4	4	IIAT3						
IIAT4				2	3	5	5	IIAT4						
IIAT5				3	3	5	7	IIAT5						
IIIAT1		0,5	3	3	3	5	6	IIIAT1						
IIIAT2				1,33	3	4	5	IIIAT2						
IIIAT3				0,5	1,33	3	3	IIIAT3						
OAO1				2	2,33	3	6	OAO1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
OAO2	2	2	2	2	2	3	4	OAO2						
OAO3				1	1	3,6	5	OAO3						
OAO4				0,16	0,16	0,16	0,16	OAO4						
OAO5								OAO5						
IAO1				0,5	1	4	4	IAO1	0,66	1	1	1	2	3
IAO2				0,66	1	3	3	IAO2			1,33	3	6	7
IAO3		1	4	5	5	7	9	IAO3	1	1	3	3	4	5
IIAO1						0,5	0,5	IIAO1						
IIAO2				1	2	3	4	IIAO2						



IIAO3		0,5	1	2	IIAO3
IIIAO1	2	2	3	5	IIIAO1
IIIAO2		0,5	0,5	0,5	IIIAO2
IIIAO3		0,5	3	3	IIIAO3
IIIAO4					IIIAO4

**ANEXO 8A. Pruebas de normalidad para los datos de actividad lipolítica cualitativa.**

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Tributirina	,894	129	,000
Oliva	,571	129	,000

**ANEXO 8B. Prueba no paramétrica Kruskal Wallis para la selección del mejor tratamiento.**

**Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV**

Variable	Mean Rank	Sample Size
Tributirina	158,5	129
Oliva	100,5	129
Total	129,5	258

Kruskal-Wallis Statistic 46.7085  
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0000

**ANEXO 8C. Prueba de homogeneidad de varianzas**

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Tributirina	16,000	42	86	,000
Oliva	.	42	.	.

**ANEXO 8D. Subconjuntos homogéneos**

Cepa	Subconjunto para alfa = 0.05											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
IGT1	,0000											
IIGT2	,0000											
IIIGT3	,0000											
OAT1	,0000											
OAT2	,0000											
OAT3	,0000											
OAO1	,0000											
IAO1	,0000											
IGO1	,0000											
IIGO1	,0000											
IIIGO2	,0000											
OAO5	,1667											
IIAO2		,5000										
IIIAO3		,5000										
IIIGO5			1,0000									
IIIGT2				2,0000								
IIIAO1				2,0000								
IIGT1					3,0000							
IIAT2					3,0000							
IIITAT3					3,0000							
IAO3					3,0000							
IIIAO4					3,0000							
IIIGT1						4,0000						

IAT3						4,0000						
IIAT3						4,0000						
OAO3						4,0000						
IAO2						4,0000						
IIAO3						4,0000						
IAT1							5,0000					
IIAT1							5,0000					
IIAT4							5,0000					
IIIAT2							5,0000					
OAO4							5,0000					
IIIAO2							5,0000					
IIIAT1								6,0000				
OAO2								6,0000				
IIIGO3								6,0000				
IAT2									7,0000			
IIAT5									7,0000			
IIAO1										9,0000		
IIIGO2											10,0000	
IIIGO1											10,0000	
IAT4												11,0000
Sig.	,991	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

