



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**

**INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**

**INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR,**  
**MODALIDAD PRESENCIAL**

**TEMA:**

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PRODUCIDA POR  
BACTERIAS AISLADAS DE SUELO DE PÁRAMO DEL PARQUE  
NACIONAL CAYAMBE COCA”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de *Ingeniería en Biotecnología*

**Línea de investigación:** Producción industrial y tecnología sostenible

**AUTORA:**

MARIA ROSARIO QUIROZ CAMPOVERDE

**DIRECTOR:**

Ing. SANTIAGO ZARATE BACA. MSc.

**Ibarra, julio 2024**



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## DIRECCIÓN DE BIBLIOTECA

### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1727293035		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Quiroz Campoverde María Rosario		
DIRECCIÓN:	Sangolquí, Riofrio 4-22 y García Moreno		
EMAIL:	mrquirozc@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	-----	TELÉFONO MÓVIL:	0983609117

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PRODUCIDA POR BACTERIAS AISLADAS DE SUELO DE PÁRAMO DEL PARQUE NACIONAL CAYAMBE COCA
AUTOR (ES):	María Rosario Quiroz Campoverde
FECHA: DD/MM/AAAA	24/07/2024
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> GRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniería en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Santiago Zarate Blgo. Pedro Barba

### 2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 24 días del mes de julio de 2024

EL AUTOR:

María Rosario Quiroz Campoverde

**CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO  
DE INTERGRACIÓN CURRICULAR**

Ibarra, 24 de julio de 2024.

Santiago Zárate Baca

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.



MSc. Santiago Zárate Baca

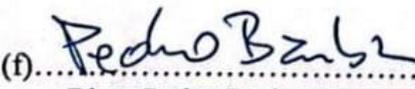
C.C.: 171897484-1

## APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PRODUCIDA POR BACTERIAS AISLADAS DE SUELO DE PÁRAMO DEL PARQUE NACIONAL CAYAMBE COCA" elaborado por María Rosario Quiroz Campoverde, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

(f)   
MSc. Santiago Zárate Baca

C.C.: 171897484-1

(f)   
Btga. Pedro Barba

C.C.: 171675118-3

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis padres, José Quiroz e Ilcia Campoverde, que son el pilar fundamental en mi vida para cada uno de mis logros, por su apoyo constante son la fuerza que me impulso en mi formación académica. Sus palabras de aliento y su fe inquebrantable en mis capacidades han sido el motor que me ha llevado a alcanzar este sueño. A mis hermanos José y Karina, por su apoyo en cada uno de mis logros, por las risas compartidas, las palabras de aliento y su fe inquebrantable en mí. Y por último a mis compañeros que comenzaron y terminaron conmigo la formación académica, por las enseñanzas compartidas, la solidaridad, el compañerismo, las risas y la ayuda recibida a lo largo de las clases y la tesis. Este momento marca la culminación de una trayectoria académica y personal, reflejando el esfuerzo conjunto de mi familia que me apoyo y cree en mis sueños.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mi querida familia, no hay palabras que puedan expresar la gratitud que siento por ustedes. Papá y mamá, su amor incondicional y su incansable apoyo me han permitido llegar hasta aquí. Sus sacrificios, su fe en mí y sus palabras de ánimo en los momentos más oscuros han sido el faro que me ha guiado. Este logro es tanto suyo como mío. A mis hermanos, por ser mis confidentes, mis amigos y mi mayor fuente de alegría. Gracias por estar siempre a mi lado, por creer en mí y por levantarme cada vez que caí. Sus risas han sido mi refugio. A mis amigos y colegas de la carrera de biotecnología, gracias por los momentos compartidos, por las noches de estudio, las desveladas, los trabajos en grupo, los desacuerdos y las lágrimas, su apoyo y amistad son unos de los mejores recuerdos que me dejó la universidad. Y, por último, a mi tutor, el Ing. Santiago Zárate, cuya paciencia, dedicación y vasto conocimiento han sido esenciales para la realización de esta tesis. Gracias por guiarme con sabiduría, por retarme a superar mis límites y por estar siempre dispuesto a ofrecer una palabra de aliento. Su pasión por la biotecnología ha sido una inspiración constante. Este logro es un reflejo de todos ustedes y de todo lo que hemos compartido.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>vi</b>
<b>Índice de Tablas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>x</b>
<b>Índice de Anexos</b> .....	<b>x</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>15</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
<i>1.1. Planteamiento del Problema</i> .....	<i>15</i>
<i>1.2. Justificación</i> .....	<i>16</i>
<i>1.3. Objetivos de la Investigación</i> .....	<i>17</i>
1.3.1. Objetivo General.....	17
1.3.2. Objetivos Específicos .....	17
<i>1.4. Pregunta Directriz</i> .....	<i>17</i>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>18</b>
<b>2. MARCO TEORICO</b> .....	<b>18</b>
2.1. <i>Páramo</i> .....	<i>18</i>
2.1.1. Generalidades .....	18
2.1.2. Parque Nacional Cayambe Coca.....	18
2.1.3. Suelo de páramo .....	19
2.2. <i>Actividad microbiana del suelo</i> .....	<i>20</i>
2.3. <i>Enzimas en el suelo</i> .....	<i>21</i>

2.4. <i>Enzimas</i> .....	22
2.4.1. Definición .....	22
2.4.2. Estructura enzimática.....	23
2.4.3. Clasificación y características generales .....	23
2.4.4. Enzima Ureasa .....	24
2.4.5. Enzima Fosfatasa .....	24
2.4.6. Enzima Lipasa .....	25
2.5. <i>Inmovilización de microorganismos</i> .....	25
2.5.1. Definición .....	25
2.5.2 Soporte inmovilizador .....	26
2.5.3. Tipos de inmovilización .....	27
2.5.4. Aplicación de las células inmovilizadas .....	32
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>34</b>
<b>3. MARCO METODOLOGICO</b> .....	<b>34</b>
3.1. <i>Descripción del Área de Estudio</i> .....	34
3.2. <i>Ejecución del Primero Específico</i> .....	34
3.2.1. Selección de la Cepa Inóculo.....	34
3.2.2. Determinación Primaria de la Actividad Enzimática .....	34
3.2.3. Producción de la Enzima Ureasa .....	35
3.2.4. Producción de la Enzima Fosfatasa .....	35
3.2.5. Producción de la Enzima Lipasa.....	36
3.2.6. Producción de la Enzima Arisulfatasa .....	36
3.2.7. Evaluación de los halos de hidrólisis enzimática .....	36
3.3. <i>Ejecución del segundo objetivo específico</i> .....	37
3.3.1. Preparación del inóculo líquido bacteriano .....	37
3.3.2. Pretratamiento de Placas y Tapas de 96 Pocillos.....	38
3.3.3. Medición de la curva de crecimiento .....	38
3.4. <i>Ejecución del Tercer Objetivo Específico</i> .....	38
3.4.1. Preparación del Consorcio Bacteriano.....	38

3.4.2. Preparación de los Soportes Inmovilizadores .....	39
3.4.3. Procedimiento de Inmovilización del Consorcio en los Soportes .....	39
3.4.4. Métodos analíticos para el conteo de células inmovilizadas .....	40
3.5. <i>Análisis Estadístico</i> .....	40
<b>CAPITULO IV</b> .....	<b>42</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>42</b>
4.1. <i>Pruebas de Actividad Enzimática</i> .....	42
4.1.1. Actividad Ureasa .....	42
4.1.2. Actividad Fosfatasa .....	44
4.1.3. Actividad Lipasa .....	47
4.1.4. Actividad Arilsulfatasa .....	50
4.2. <i>Cinética de Crecimiento de las cepas con mayor potencial enzimático</i> .....	51
4.3. <i>Inmovilización del Consorcio en sustratos orgánicos e inorgánicos</i> .....	56
<b>CAPITULO IV</b> .....	<b>60</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>60</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>61</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>62</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>78</b>

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Abundancia relativa de diferentes filos bacterianos en los suelos .....	20
<b>Tabla 2</b> Clasificación Enzimática General .....	24
<b>Tabla 3</b> Tipos de Inmovilización Celular .....	28
<b>Tabla 4</b> Aplicaciones de Células Inmovilizadas en Compuestos Contaminantes.....	32
<b>Tabla 5</b> Medios detección actividad enzimática .....	35

<b>Tabla 6</b> Pruebas Estadísticas Aplicadas en la Evaluación de la Actividad Enzimática .....	41
<b>Tabla 7</b> Parámetros Óptimos para la Expresión Lipídica en Bacterias del Páramo.....	50
<b>Tabla 8</b> Cepas Seleccionadas con Mayor Potencial Enzimático para Cinética Bacteriana ....	51
<b>Tabla 9</b> Cinética de Crecimiento Celular de las Cepas Bacterianas .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Actividades Enzimáticas Relacionada a los Ciclos Biogeoquímicos.....	22
<b>Figura 2</b> Tipos de Soportes Inmovilizadores .....	26
<b>Figura 3</b> Sustratos para el Soporte Inmovilizante .....	39
<b>Figura 4</b> Crecimiento del Halo de Hidrólisis en un tiempo de 12 horas.....	42
<b>Figura 5</b> Longitud del Halo de Hidrólisis de la Urea a las 12 horas.....	43
<b>Figura 6</b> Halo de Hidrólisis de la Enzima Fosfatasa a las 24 horas.....	45
<b>Figura 7</b> Halo de Hidrólisis de la Actividad Lipasa a las 24 y 48 horas.....	47
<b>Figura 8</b> Curva de Crecimiento de las Cepas con Mayor Potencial Enzimático .....	52
<b>Figura 9</b> Recuento de las Células de los Soportes Inmovilizados .....	57

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> Análisis de las Actividades Enzimáticas de las Cepas Bacterianas .....	78
<b>Anexo 2</b> Pruebas Enzimáticas de la Capacidad Hidrolítica de las Cepas Bacterianas .....	80
<b>Anexo 3</b> Pruebas Enzimáticas del Halo de Hidrólisis de las Cepas con Mayor Actividad .....	82
<b>Anexo 4</b> Cinética Bacteriana .....	83
<b>Anexo 5</b> Microscopia de Bacterias Seleccionadas para el Consorcio Inmovilizado en los Soportes, 40x.....	86
<b>Anexo 6</b> Evaluación de la Actividad Enzimática del Consorcio Inmovilizado en los Soportes .....	88

## RESUMEN

Los microorganismos del suelo son fuentes importantes de enzimas cuyas actividades desempeñan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos y funciones de la comunidad microbiana. Las enzimas microbianas han ganado interés por sus usos generalizados en la industria o el medio ambiente debido a su actividad catalítica, facilidad de producción y optimización. En el presente trabajo de investigación se plantea identificar el potencial enzimático de cepas bacterianas aisladas del páramo para su aplicación en la regeneración de suelos quemados. Las cepas aisladas son procedentes del proyecto “Consortio Alemán Ecuatoriano sobre biodiversidad” (BIOGEEC). La actividad enzimática se evaluó en medios de cultivo cromogénicos suplementados con sustratos específicos como úrea, lípidos, fosfatos y sulfatos. La actividad enzimática de las cepas bacterianas se evaluó mediante el diámetro del halo de hidrólisis en placas de agar de los medios específicos. Se analizó el crecimiento microbiano en el lector de microplacas de las cepas con mayor potencial enzimático. Para realizarlo, se inoculó cada cepa por separado en 10 mL de caldo nutriente a 37°C por 24 horas. Al finalizar este periodo se escaló en un biorreactor tipo batch de 30ml de caldo nutriente con un tiempo de operación de 24 horas a 150 rpm a 37°C. Finalmente, se diluyó el cultivo bacteriano líquido hasta una escala de 0.5 McFarland y se transfirieron 200 mL del cultivo diluido en cada pocillo de la placa. La medición se realizó en intervalos de 1 hora por 48 horas con agitación orbital de 60 s a 600nm a 37°C. Los microorganismos con mayor potencial enzimático se seleccionaron para la formación de un consorcio bacteriano, que se inmovilizó en cáscaras de café y zeolita. Las cepas aisladas del páramo presentaron actividades: ureasa, fosfatasa y lipasa. Sin embargo, no se evidencia la presencia de actividad arilsulfatasa. Por otro lado, las cepas bacterianas presentaron mayor hidrólisis del fósforo, esto se debe a que el pH del suelo y la materia orgánica favorecen la secreción de las fosfatasas. Además, la adaptación de comunidades microbianas a sustratos específicos puede aumentar la prevalencia de bacterias con capacidades metabólicas especiales, como la actividad lipolítica. Por otro parte, la dinámica del crecimiento microbiano varía significativamente entre diferentes especies bacterianas. Esta variabilidad se refleja en varios parámetros, los mejores estudiados son el tiempo de duplicación y la tasa específica de crecimiento de diferentes especies bacterianas. Finalmente, los sustratos inorgánicos son una alternativa eficiente en los procesos de

inmovilización de bacterias, sin embargo, las cascaras de café es una alternativa sostenible e igual de eficiente para inmovilización celular.

**Palabras clave:** actividad enzimática, bacteria, inmovilización, lipasa, ureasa, fosfatasa y arilsulfatasa

## ABSTRACT

Soil microorganisms are important sources of enzymes whose activities play a crucial role in biogeochemical cycles and microbial community functions. Microbial enzymes have gained interest for their widespread uses in industry and the environment due to their catalytic activity, ease of production, and optimization. This research aims to identify the enzymatic potential of bacterial strains isolated from the páramo for their application in the regeneration of burned soils. The isolated strains are from the "German-Ecuadorian Consortium on Biodiversity" (BIOGEEC) project. Enzymatic activity was evaluated in chromogenic culture media supplemented with specific substrates such as urea, lipids, phosphates, and sulfates. The enzymatic activity of the bacterial strains was assessed by the diameter of the hydrolysis halo on agar plates of the specific media. The microbial growth of the strains with the highest enzymatic potential was analyzed in a microplate reader. Each strain was separately inoculated in 10 mL of nutrient broth at 37°C for 24 hours. After this period, scaling was done in a batch-type bioreactor with 30 mL of nutrient broth, operating for 24 hours at 150 rpm at 37°C. The liquid bacterial culture was then diluted to a 0.5 McFarland scale, and 200 µL of the diluted culture was transferred to each well of the plate. Measurements were taken at 1-hour intervals for 48 hours with orbital shaking for 60 seconds at 600 nm at 37°C. The microorganisms with the highest enzymatic potential were selected to form a bacterial consortium, which was immobilized in coffee husks and zeolite. The isolated strains from the páramo showed urease, phosphatase, and lipase activities. However, arylsulfatase activity was not detected. The bacterial strains exhibited higher phosphorus hydrolysis, attributed to the soil pH and organic matter that favor phosphatase secretion. Additionally, the adaptation of microbial communities to specific substrates can increase the prevalence of bacteria with special metabolic capacities, such as lipolytic activity. Moreover, the dynamics of microbial growth vary significantly among different bacterial species. This variability is reflected in several parameters, with the most studied being the doubling time and specific growth rate of different bacterial species. Finally, inorganic substrates are an efficient alternative in bacterial immobilization processes; however, coffee husks are a sustainable and equally efficient alternative for cell immobilization.

**Keywords:** enzymatic activity, bacteria, immobilization, lipase, urease, phosphatase, and arylsulfatase

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Planteamiento del Problema

Los páramos andinos son considerados como uno de los ecosistemas más diversos, con suelos que presentan un alto contenido de nutrientes y microorganismos (Madrinán et al., 2013). La interacción entre la composición del suelo, los microorganismos y la actividad enzimática es importante para la acumulación de materia orgánica que es responsable de estas características (Brück et al., 2023). La fauna del suelo es reconocida como mediadora importante del ciclo biogeoquímico y de la dinámica comunitaria tanto trófica como no trófica (Wardle et al., 2004).

En los últimos años se registra una mayor destrucción y quema de este tipo de ecosistemas. La quema de los pastizales provoca superficies desnudas temporales, que son susceptibles a la descomposición estructural por la energía cinética de las gotas de lluvia o granizadas (Kato et al., 2009). Además, estas superficies desnudas ricas en carbono negro absorben la radiación solar, lo que favorece el secado irreversible y la repelencia al agua en la superficie del suelo (Whitman et al., 2019). Los regímenes globales de incendios han cambiado debido a la influencia humana en el uso de la tierra (Pressler et al., 2019), así como la quema antropogénica del páramo como una práctica común, que representa la forma más fácil de transformar los pastizales previos a la siembra de cultivos, la deforestación es la forma más rápida de apropiación ilegal y colonización de terrenos abandonados (Brück et al., 2023). La actividad humana de quema representa una amenaza frecuente para los páramos. Además, las condiciones ambientales actuales son propicias para el aumento de los incendios forestales, como el aumento de la caída de rayos y el cambio a una atmósfera más cálida y seca (Romps et al., 2014).

Los incendios forestales son disturbios que son devastadores para los ecosistemas, que pueden generar cambios drásticos, no sólo en la vegetación superficial de la zona sino también en la comunidad microbiana implicados en el ciclado de nutrientes (Whitman et al., 2019). Las poblaciones microbianas existentes en las capas superficiales del suelo se reducen, ya que los microorganismos son muy sensibles a los cambios de temperatura, humedad y nutrientes (Coyle et al., 2017). Las comunidades microbianas del suelo pueden verse afectadas por el

fuego, tanto directamente a través de la mortalidad durante la perturbación, como indirectamente a través de cambios físicos, químicos y biológicos en el suelo (Certini, 2005); tales cambios provocan la pérdida de materia orgánica por combustión y erosión, modificando la calidad de la materia orgánica mediante la adición de materia orgánica pirogénica, alterando la composición de la comunidad vegetal, pérdida de la estructura del suelo y aumento del pH, lo cuales tiene consecuencia para los microorganismos del suelo (Bird et al., 2015; González-Pérez et al., 2004). Al mismo tiempo, los incendios pueden alterar la dinámica de la red de nutrientes en el suelo y la capacidad de adaptación de las comunidades microbianas después de la perturbación (Pressler et al., 2019).

Dado que la biorremediación es un proceso muy lento, solo ciertas especies de bacterias y hongos han demostrado su capacidad como potentes degradadores de contaminantes. La limitación del crecimiento bacteriano está bajo la influencia de parámetros como el pH, la temperatura, el oxígeno, la estructura del suelo, la humedad y el nivel adecuado de nutrientes, la escasa biodisponibilidad de los contaminantes y la presencia de otros compuestos tóxicos (Karigar & Rao, 2011). Las bacterias como los hongos dependen de la participación de diferentes enzimas intracelulares y extracelulares, para la remediación de recalcitrantes, lignina y organocontaminantes (Vidali, 2001).

## **1.2. Justificación**

En Ecuador los páramos andinos son ecosistemas con alta diversidad microbiana. Los microorganismos endémicos del suelo andino han sido poco estudiados y caracterizados, el potencial que ofrecen estas especies se desconoce, por lo que es necesario conocer su potencial enzimático en la biorremediación de los suelos. En los últimos años los estudios se centran en conocer el potencial enzimáticos de los hongos, por lo tanto, es necesario, explorar en la actividad que ofrece otras especies (Brück et al., 2022).

Del mismo modo, los microorganismos del suelo, incluidos aquellos capaces de degradar compuestos poliaromáticos, son inhibidos por altas concentraciones de contaminantes orgánicos (García, Soto, & Simal, 2006). Por lo tanto, las comunidades microbianas en los suelos afectados por incendios forestales sufren una drástica reducción, lo que resulta en una menor reactividad biológica (Andreolli, Lampis, Brignoli, & Vallini, 2015).

De tal modo, la biorremediación implica una serie de reacciones, es decir, un complejo enzimático lo que muchas veces significa que se necesitan diferentes organismos para un resultado satisfactorio (Pereira & Freitas, 2012). Las condiciones ambientales adecuadas para

el rápido desarrollo de cada organismo son esenciales para una biorremediación efectiva. Los tratamientos con oxidasas e hidrolasas son pioneros en la biorremediación enzimática. Por lo tanto, la actividad enzimática proporciona una acción más rápida, homogénea y eficiente (Okino, Zanutto, Pereira, Fleuri, & Do Prado, 2019).

De modo que, la biorremediación enzimática empleando bacterias propias del páramo ecuatoriano, no implica la liberación de un organismo modificado genéticamente, esta técnica es rápida y poco invasiva a los suelos posteriores al incendio y representan posibles herramientas valiosas para aumentar la tasa y el alcance de la biodegradación de tales contaminantes, estimulando así una restauración más rápida del ecosistema. Además, un mayor conocimiento del papel de la actividad enzimática en el mantenimiento de la salud de los suelos facilitará la evaluación y valoración del estado de estos (Okino, Zanutto, Pereira, Fleuri, & Do Prado, 2019).

### **1.3. Objetivos de la Investigación**

#### ***1.3.1. Objetivo General***

Evaluar la actividad enzimática de bacterias aisladas del suelo de páramo del parque nacional Cayambe Coca para la regeneración de suelos quemados.

#### ***1.3.2. Objetivos Específicos***

- Determinar la actividad enzimática procedente de bacterias de suelo de páramo.
- Analizar la cinética de crecimiento de las cepas bacterianas con potencial enzimático.
- Establecer un soporte inmovilizante para la formación de agregados de consorcios bacterianos.

### **1.4. Pregunta Directriz**

¿Las bacterias aisladas del páramo prístino Cayambe Coca son capaces de producir enzimas que promuevan la regeneración de suelos?

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEORICO

#### 2.1. Páramo

##### 2.1.1. Generalidades

Los páramos son ecosistemas que poseen una gran biodiversidad, implicados en la regulación hídrica, captura de carbono, protección de los suelos, conservación de la biodiversidad, alta porosidad y permeabilidad (García, 2013). En el Ecuador, los páramos cubren el 7% del territorio nacional (Mena & Medina, 2000), y alrededor del 47% de los paisajes de páramo del mundo. Esta zona incluye 11 ecosistemas diferentes, los cuales han sido clasificados por el Ministerio del Ambiente del Ecuador según su flora y características ambientales (Chuncho & Chuncho, 2019). Lal (2017) menciona que la fuente de agua se debe principalmente a los suelos de los páramos que tienen una capacidad de regulación de los flujos de agua y permiten su aprovechamiento permanente.

Los páramos de los Andes ecuatorianos, clasifican en los páramos de la zona norte, caracterizados por una mayor actividad volcánica, y la zona sur, donde se encuentran rocas morfológicas erosionadas de antiguos volcanes que da lugar a distintos tipos de suelos. Estos ecosistemas se dividen en subpáramos, en la línea de árboles entre el bosque altoandino y el páramo 3200–3400 m, páramos arbustivos 3300–3900 m, páramos herbáceos 3400–4300 m y superpáramos por encima de los 4100 m, que se diferencian solo por la altitud creciente dentro del mismo páramo, pero presentan zonas de vegetación distintas (Peyre et al., 2021).

##### 2.1.2. Parque Nacional Cayambe Coca

El Parque Nacional Cayambe Coca, es una reserva ecológica localizada al noroeste de Ecuador, abarca una superficie de 408.287 hectáreas, distribuida en cuatro provincias de Pichincha, Imbabura, Napo y Sucumbíos (Adamaforest, 2011). Este parque destaca por su impresionante rango altitudinal, que va desde los 600 hasta los 5790 metros sobre el nivel del mar, albergando diversos ecosistemas como bosques nublados, páramos, humedales y glaciares (Ministerio del Ambiente y Agua, 2020).

El área protegida está conformada por distintos sistemas ecológicos. El 59.9 % es húmedo, incluyendo toda el área norte de Parque, zonas de alta montaña y los ecosistemas que

bordean el cauce de los ríos Papallacta y Quijos, mientras que el 38.4 % del territorio del área protegida es hiperhúmedo, correspondiente al área del volcán Reventador hasta Lumbaqui, el tramo Papallacta - Baeza, así como los alrededores del volcán Cayambe y el Cerro Saraurco (MAE, 2013)

Además de su riqueza natural, el Parque Nacional Cayambe-Coca es crucial para la hidrografía de la región, siendo la fuente de importantes ríos como el Coca y el Aguarico, y numerosas lagunas glaciares (MA3, 2013). Estos cuerpos de agua son esenciales tanto para los ecosistemas locales como para el suministro de agua a las comunidades circundantes.

El Parque alberga una gran diversidad de fauna como: oso de anteojos, puma, jaguar, tapir andino/amazónico, cóndor, venados, además de una gran variedad de aves estacionarias y aves migratorias. Asimismo, a flora representativa incluye pajonales, almohadillas, orquídeas, ña de gato, sunfo, sangre de drago, guayusa, especies de plantas medicinales, entre otras (Ministerio del Ambiente y Agua, 2020). En conjunto, el Parque Nacional Cayambe-Coca es un ejemplo notable de la interconexión entre biodiversidad, cultura y conservación en Ecuador.

### ***2.1.3. Suelo de páramo***

Los suelos andinos evolucionan en relación con la baja temperatura, la alta humedad del suelo y la disponibilidad de nutrientes (Lal, 2017). Estos suelos son considerados una "esponja" que mejora la retención de agua y amortigua el flujo de agua río abajo, son provenientes de erupciones volcánicas de la Cordillera de los Andes, se caracterizan por su humedad, alto contenido de humus, acidez considerable y color pardo oscuro o negro (Podwojewski, 1999). En el páramo, la descomposición de la materia orgánica se lleva a cabo a tasas muy bajas, debido a las bajas temperaturas y a la alta humedad, por lo cual es un medio natural poco antropizado (Podwojewski & Poulenard, 2004).

En Ecuador, los suelos de páramo pertenecen a Andosoles mólicos o hísticos caracterizados por su color marrón oscuro o negro y su alto contenido en carbono orgánico del suelo en la capa superior del suelo dependiendo de la cobertura vegetal (García et al., 2019), alcanzando niveles de más del 20% en sitios más húmedos; lo que lleva a la formación de complejos organometálicos con hierro y aluminio liberados a través del material volcánico desgastado (Hall et al., 2017).

## 2.2. Actividad microbiana del suelo

El suelo es el hábitat natural de innumerables microorganismos y otras formas de vida que representan numerosos géneros y especies. La actividad microbiana refleja procesos microbiológicos de los microorganismos del suelo que incluyen bacterias y hongos en diferentes proporciones según el sistema del suelo (Dominy & Haynes, 2002). En los sistemas naturales los microorganismos son un factor importante en el ciclo eficiente de los nutrientes, el crecimiento de las plantas y la descomposición biológica de la materia orgánica (Spaccini et al., 2002)

Los organismos varían de un suelo a otro y están influenciados por el contenido de materia orgánica del suelo, la textura, pH, humedad, temperatura, aireación y otros factores (Chen et al., 2003). Las bacterias son los microorganismos más abundantes en el suelo y se encuentran entre 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> por gramo de suelo. Los actinomicetos son el segundo microorganismo del suelo más común con recuentos de 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> por gramo de suelo, seguidos por hongos y algas en el rango de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>/g y 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup>/g (Ashton & Macintosh, 2002). Las formas que prosperan en un microambiente particular son las que mejor se adaptan a las condiciones ambientales (McLean & Parkinson, 1997). Estos organismos son particularmente comunes en las capas superficiales del suelo, donde se alimentan de grandes cantidades de alimentos orgánicos en forma de material de raíces muertas (Hayat et al., 2010).

**Tabla 1**

*Abundancia relativa de diferentes filos bacterianos en los suelos*

<b>Filotipos</b>	<b>Abundancia relativa (%)</b>
Proteobacteria	27
Actinobacteria	14
Acidobacteria	14
Plantomycetos	4
Chloroflexi	8
Verrucomicrobia	2
Firmicuts	6
Bacteroidetes	4
Armatimonadetes	1

Gemmatimonadetes	4
Nitrospira	15
Chlamydiae	1

*Nota.* Adaptado de Wang et al., 2017,

La comunidad microbiana es el componente funcional más importante de la biota del suelo, ya que juega un papel importante en el flujo de la energía, la transformación de nutrientes y el ciclaje de elementos en el ambiente (Yusuf Bello et al., 2021). Las plantas utilizan los nutrientes inorgánicos, y dependen de los microorganismos del suelo para mineralizar los nutrientes orgánicos para su crecimiento y desarrollo. Los microorganismos del suelo también procesan la hojarasca y los residuos de las plantas para convertirlos en materia orgánica, lo que mejora la calidad del suelo al aumentar la agregación y aireación del suelo (Chen et al., 2003).

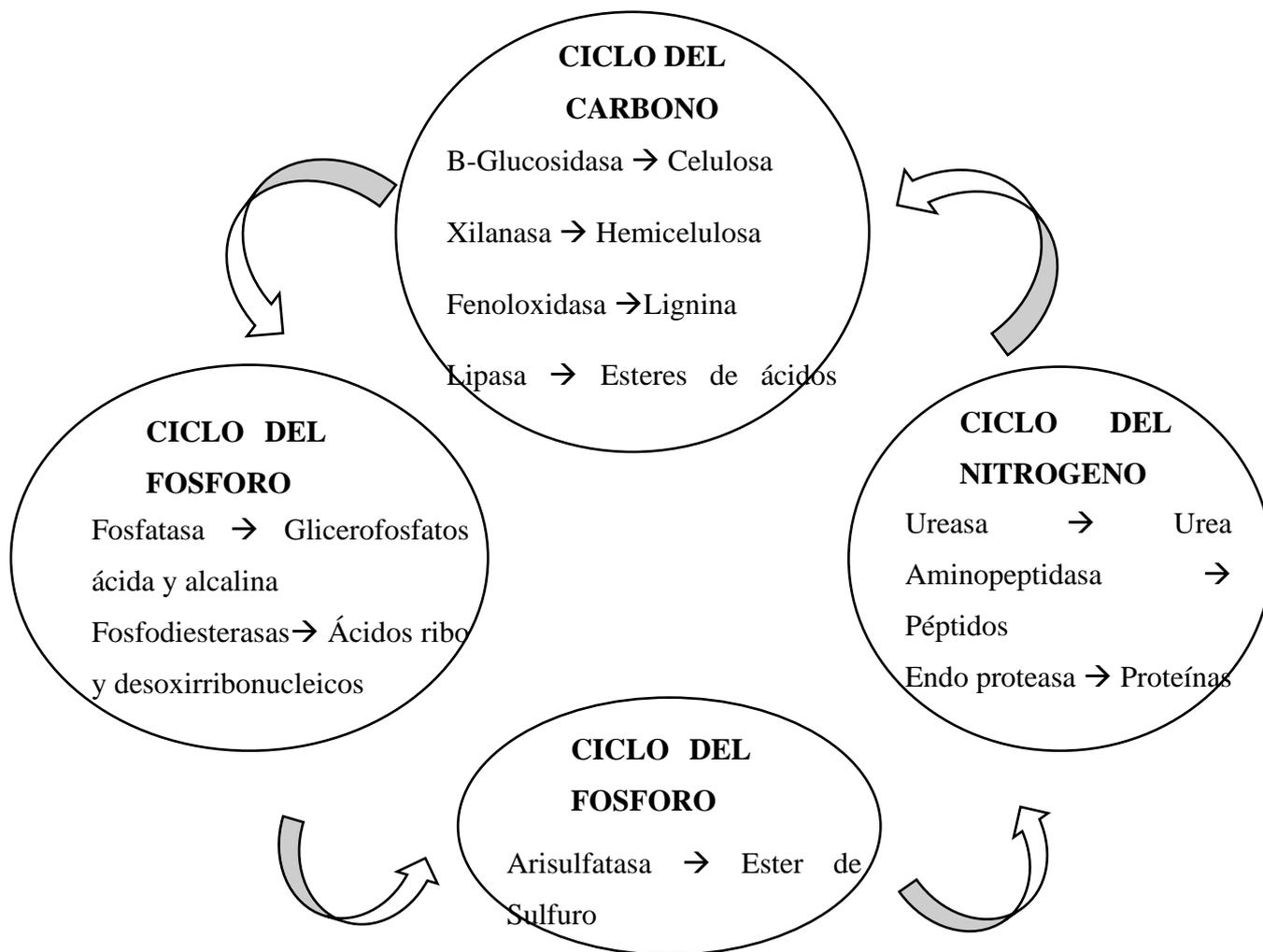
### **2.3. Enzimas en el suelo**

Las enzimas del suelo tienen una alta capacidad catalítica y regulan varias reacciones importantes para los ciclos microbianos, el ciclo de nutrientes, la estabilización de la estructura del suelo y la formación de materia orgánica del suelo (Nivitha & Vimalan, 2022). Las actividades de las enzimas extracelulares del suelo fluctúan según las estaciones, las ubicaciones y la profundidad del suelo (Mir et al., 2023).

Las enzimas del suelo se dividen funcionalmente como enzimas de adquisición de carbono (C), que digieren los polisacáridos, enzimas de adquisición de nitrógeno (N) que descomponen urea, proteínas y quitina, enzimas de adquisición de fósforo (P) que liberan P inorgánico de compuestos orgánicos de que contiene P y enzimas oxidativas que descomponen sustratos difícilmente degradables (Sinsabaugh et al., 2008).

**Figura 1**

*Actividades Enzimáticas Relacionada a los Ciclos Biogeoquímicos*



Nota. Adaptado de Noinville et al., (2004)

## 2.4. Enzimas

### 2.4.1. Definición

Las enzimas son catalizadores biológicos, que impulsan enzimas son proteínas cuyo papel fundamental es catalizar las reacciones químicas en los sistemas vivos; actúan sobre sustratos específicos transformándolos en productos necesarios para los ciclos biológicos. Los organismos y las plantas liberan enzimas al suelo por secreción y por lisis celular después de su muerte; un bajo porcentaje de estas proteínas quedan inmovilizadas y estabilizadas en

interacción con los diferentes componentes de la fase sólida del suelo, como las arcillas, moléculas orgánicas y minerales (Noinville et al., 2004). Las enzimas son relativamente resistentes a los procesos, por lo que es difícil extraerlas del suelo y se estudian indirectamente midiendo su actividad, y expresándolas en cantidad de producto final por tiempo de incubación y gramo de suelo (Coyle et al., 2017).

#### ***2.4.2. Estructura enzimática***

La estructura enzimática se caracteriza por una organización tridimensional específica que permite a las enzimas catalizar reacciones bioquímicas con alta precisión. Generalmente, una enzima está formada por una o más cadenas polipeptídicas que se pliegan en una configuración tridimensional única (Bibi et al., 2018). Esta estructura incluye un sitio activo, donde se une el sustrato y se realiza la reacción química, y una serie de regiones estructurales que estabilizan el sitio activo y facilitan la interacción con otros componentes del sistema. Coyle et al., (2017) menciona que la forma y el entorno del sitio activo son fundamentales para la especificidad y eficacia de la enzima, permitiéndole reconocer y transformar moléculas específicas de manera eficiente. Además, algunas enzimas requieren cofactores, como iones metálicos o coenzimas, que se integran en su estructura para facilitar la catálisis.

#### ***2.4.3. Clasificación y características generales***

Las enzimas se agrupan en seis clases principales: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Las oxidorreductasas catalizan reacciones de oxidación-reducción, mientras que las transferasas transfieren grupos químicos de una molécula (Whitman et al., 2019). Las hidrolasas realizan la hidrólisis de enlaces químicos, y las liasas catalizan la ruptura de enlaces sin la adición de agua. Las isomerasas facilitan la reordenación de átomos dentro de una molécula, y las ligasas unen dos moléculas mediante la formación de enlaces covalentes, típicamente usando energía proveniente de ATP (Karigar & Rao 2011). Esta clasificación se puede observar en la tabla 2 aún más mediante subclases que consideran aspectos adicionales como el tipo de enlace químico, el grupo químico transferido, y el cofactor de catálisis.

**Tabla 2***Clasificación Enzimática General*

<b>Enzima</b>	<b>Clase</b>	<b>Tipo de Reacción</b>
<b>Oxido-reductasas</b>	1	Oxidación y reducción
<b>Transferasas</b>	2	Transferencia de átomos/grupos
<b>Hidrolasas</b>	3	Hidrólisis
<b>Liasas</b>	4	Liasas
<b>Isomerasas</b>	5	Isomerasas
<b>Ligasas</b>	6	Ligasas

*Nota.* Karigar & Rao (2011).

**2.4.4. Enzima Ureasa**

La ureasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de la urea en CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> con un mecanismo de reacción basado en la formación de carbamato como intermediario. La enzima está ampliamente distribuida en la naturaleza y se origina a partir de bacterias, levaduras, hongos, algas, desechos animales y plantas, y su expresión está bajo regulación de N (Machuca et al., 2015). La síntesis de la enzima se previene cuando las células crecen en presencia de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fuente preferida de N (Mir et al., 2023). Los estudios de la actividad ureasa en el suelo han sido de gran interés a lo largo de los años y se han utilizado como un indicador de la calidad del suelo, debido al papel de la ureasa en la regulación del suministro de N a las plantas después de la fertilización con urea.

**2.4.5. Enzima Fosfatasa**

Las fosfatasas o fosfomonoesterasas son las enzimas hidrolíticas que escinden el enlace éster entre el grupo fosfato y el residuo orgánico de los fosfatos orgánicos. En función del pH óptimo para la actividad, las fosfatasas son de dos tipos: ácidas y alcalinas. Las fosfatasas ácidas muestran una actividad máxima a un pH ácido de alrededor de 6, mientras que las fosfatasas alcalinas muestran una actividad máxima a un pH alcalino de alrededor de 11 (Dotaniya et al., 2019).

#### **2.4.6. Enzima Lipasa**

Las lipasas y las esterasas de colesterol se distinguen de las fosfolipasas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster acilo de fosfolípidos altamente anfipáticos y de las carboxilesterasas que hidrolizan ésteres polares solubles en agua (Brockman, 2013). Los sustratos de lipasa naturales típicos incluyen, en orden de anfipaticidad, ésteres de colesterol, triacilgliceroles, ésteres de cera, diacilgliceroles y ésteres monoacídicos de glicerol. Debido a que los sustratos de lipasa tienden a ser aceitosos y sólo débilmente anfipáticos, residen principalmente en una fase oleosa en masa con preferencia a la fase acuosa o, es decir, una fase superficial monomolecular que separa las fases oleosa y acuosa en masa (Brockman, 2013).

#### **2.4.7 Enzima Arilsulfatasa**

La arilsulfatasa es la enzima que cataliza la hidrólisis del éster de sulfato orgánico. Las arilsulfatasas son secretadas principalmente por bacterias al ambiente externo como respuesta a la limitación de azufre, su expresión en diferentes sistemas de suelo a menudo se correlaciona con la biomasa microbiana y la tasa de inmovilización de S. La liberación de sulfato a partir de ésteres de sulfato solubles e insolubles en el suelo se ve afectada por diversos factores ambientales, como la contaminación por metales pesado (Utobo, 2015).

### **2.5. Inmovilización de microorganismos**

#### **2.5.1. Definición**

La inmovilización es el confinamiento físico o incapacitación del movimiento de una molécula en un pequeño espacio limitado por la unión a una estructura sólida, con el fin de limitar la libre migración. La inmovilización es viable para células vegetales, animales, microorganismos y enzimas (Bayat et al., 2015)

La inmovilización celular permite reducir la fase de crecimiento no productivo, ya que la alta densidad celular de las células inmovilizadas mejora el rendimiento del producto y la eficiencia volumétrica de los biorreactores. La inmovilización permite a los microorganismos adquirir una estabilidad frente a las agresiones ambientales: pH, temperatura, sales, disolventes orgánicos, sustratos y productos inhibidores (Zhu, 2007).

Górecka y Jastrzębska (2011); Junter & Jouenne (2004) mencionan que la inmovilización de las células surgió como una alternativa a la inmovilización enzimática, ya

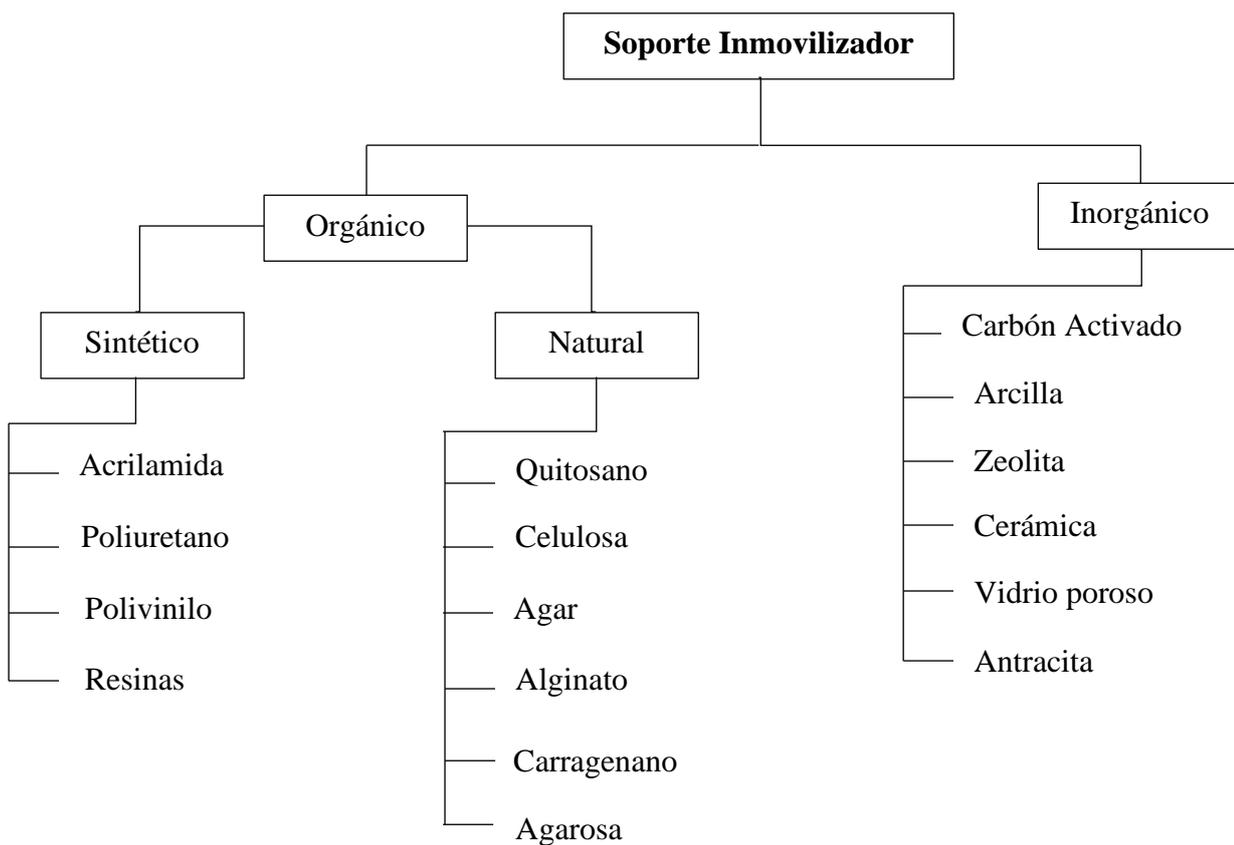
que los microorganismos con enzimas específicas pueden usarse como portadores de las actividades enzimáticas requeridas.

### 2.5.2 Soporte inmovilizador

El soporte para la inmovilización celular permite el intercambio de sustratos, productos e inhibidores. El soporte debe ser económico, estable, reutilizable, alta retención de biomasa, unión mínima de otros organismos, preferiblemente de bajo costo y no tóxico (Stolarzewicz et al., 2010).

**Figura 2**

*Tipos de Soportes Inmovilizadores*



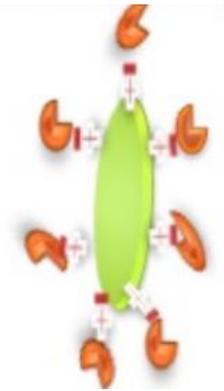
<sup>a</sup>Berillo et al. (2021). <sup>b</sup>Silveira et al. (2013)

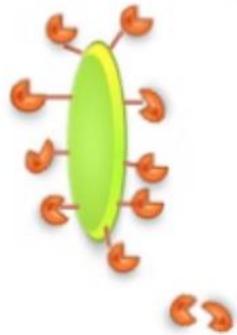
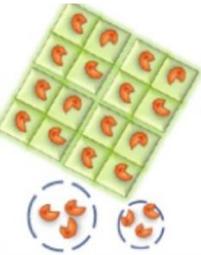
Los soportes de inmovilización se dividen habitualmente en dos grupos principales: orgánicos e inorgánicos Grafico 2. Los materiales orgánicos son más abundantes que los soportes inorgánicos, pero suelen ser muy sensibles a la presión o al pH. Los vehículos poliméricos orgánicos son más abundantes que los vehículos inorgánicos y pueden ser vehículos poliméricos naturales y sintéticos. Por otro lado, los soportes inorgánicos son totalmente inertes, resistentes a la temperatura, el pH, los productos químicos, la degradación microbiana y también al aplastamiento o la abrasión (Lu & Toy, 2009). Los vehículos poliméricos orgánicos son más abundantes que los vehículos inorgánicos y pueden ser vehículos poliméricos naturales y sintéticos.

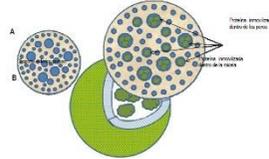
### ***2.5.3. Tipos de inmovilización***

La inmovilización de células microbianas en procesos biológicos puede ocurrir como un mediante un proceso artificial o un fenómeno natural. Se han utilizado muchas formas diferentes de inmovilización celular, incluidas la adsorción, la unión covalente, el atrapamiento y la encapsulación.

**Tabla 3***Tipos de Inmovilización Celular*

<b>Método de inmovilización</b>	<b>Descripción</b>	<b>Soporte inmovilizador</b>	<b>Fuerza Vinculante</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Ilustración</b>
<b>Absorción</b>	Esta técnica implica el transporte de las células desde la fase masiva a la superficie del soporte, seguido de la adhesión de las células y la posterior colonización de la superficie del soporte	-Soportes inorgánicos (zeolita, arena, ladrillo poroso, perlas de vidrio, arcilla, cerámica, resinas de intercambio iónico)  -Soportes orgánicos (celulosa, carbón activado, quitosano)	Fuerzas débiles que incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos y fuerzas de Van Der Waals	-Simple y fácil  -Estimula el metabolismo microbiano  -Protege a la célula de agentes desfavorables  -Preservar su actividad fisiológica  -Contacto directo entre los nutrientes y las células inmovilizadas	-Alta tasa de fuga de la matriz debido a interacciones débiles	

		-Soporte compuesto plásticos				
<b>Enlace covalente</b>	Se basa en la formación de enlaces covalentes entre un soporte activo y las células en presencia de un agente aglutinante	-Soportes inorgánicos (zeolita, arena, ladrillo poroso, perlas de vidrio, arcilla, cerámica, resinas de intercambio iónico)	Unión química entre los grupos funcionales de la célula y del soporte	Estabilidad de los enlaces formados impide la liberación de la molécula al medio ambiente	-No es apta para células debido a la toxicidad de los agentes de acoplamiento -Pérdida de actividad celular	
<b>Atrapamiento</b>	Esta técnica crea una barrera protectora alrededor de las células, atrapándolas en una matriz de soporte o dentro de fibras	-Alginato -Carragenano -Colágeno -Poliacrilamida - Gelatina -Caucho de silicona -Poliuretano	Incorporación de la célula dentro de un gel o un polímero	-Protección del biocatalizador de condiciones extremas	-Fuga de células -Limitaciones de difusión -Abrasión del material de soporte durante el uso -Baja capacidad de carga	

<b>Método de inmovilización</b>	<b>Descripción</b>	<b>SopORTE inmovilizador</b>	<b>Fuerza Vinculante</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Ilustración</b>
		-Alcohol polivinílico con grupos estirilpiridio				
<b>Encapsulación</b>	Este método envuelve los componentes biológicos dentro de diversas formas de membranas esféricas semipermeables con una permeabilidad controlada selectiva, permite flotar libremente dentro del espacio central	-Alginato -Quitosano -Maltodextrina - Celulosa -Poli-L-lisina (PLL) -Acetato de polivinilo (PVA) -Gelatina -Ácido bórico	Tamaño del poro adecuado de la membrana en sintonía con el tamaño del material del núcleo	-Acceso limitado al interior de la microcápsula, protegiendo de las condiciones ambientales  -No se requieren modificaciones químicas del material del núcleo, por lo que la actividad permanece intacta  -Es adecuada para microorganismos,	-Control muy estricto del tamaño de los poros  -No disponible para biocatalizadores con un tamaño similar a su producto de reacción, ya que provocaría una fuga de ambos.	

---

células vivas y  
sistemas  
multienzimáticos

---

<sup>a</sup>Górecka y Jastrzębska (2011). <sup>b</sup>Stolarzewicz et al. (2010).

#### 2.5.4. Aplicación de las células inmovilizadas

Los diferentes métodos de inmovilización afectarán el rendimiento celular y también pueden afectar la cantidad de células viables y, por lo tanto, la eficiencia del proceso de biocatalítico o de biorremediación (Plieva et al., 2007).

Bayat et al. (2015) menciona que la tolerancia de las células inmovilizadas en condiciones difíciles mejoró principalmente debido a una mejor modificación de la membrana celular. Las células inmovilizadas se caracterizan por una mejor eficiencia de biodegradación que las células libres.

La alta eficacia de la inmovilización celular sobre el material de inmovilización y la alta afinidad entre el material de inmovilización hidrófobo y los sustratos, resultó una degradación excelente. El aumento de la disponibilidad de sustratos para las células y la mejor interacción entre los sustratos y las células inmovilizadas condujeron de forma sinérgica al desarrollo de altas tasas de degradación (Bayat et al., 2015).

Las células inmovilizadas se utilizan en la biodegradación de otros compuestos. En la tabla son algunas de las células inmovilizadas para la degradación de contaminantes.

**Tabla 4**

*Aplicaciones de Células Inmovilizadas en Compuestos Contaminantes*

<b>Contaminante</b>	<b>Transportista</b>	<b>Microorganismos</b>	<b>Referencia</b>
Hidrocarburos de petróleo	Poliuretano	<i>Rhodococcus sp.</i> F92	(Quek et al., 2006)
Gasóleo	Alcohol de polivinilo	Bacterias degradantes de hidrocarburos	(Cunningham et al., 2004)
Hexadecano	Aserrín de pino	<i>Rhodococcus ruber</i>	(Podorozhko et al., 2008)
Benceno, tolueno y o-xileno	Fibra/polímero de agave posconsumo	<i>Pseudomonas putida</i>	(Robledo et al., 2011)
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Bagazo	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	(Mohammadi & Nasernejad, 2009)
Fenantreno	Tallo de papaya	<i>Mycoplana sp.</i> MVMB2	(Lakshmi et al., 2012)

Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Materiales lignocelulósicos	<i>Bjerkandera adusta</i> SM46	(Andriani & Tachibana, 2016)
Etilbencina	Alginato, agar, poliacrilamida	<i>Pseudomonas fluorescens-CS2</i>	(Parameswarappa et al., 2007)
Fenol	Alcohol polivinílico	<i>Acinetobacter</i> sp. cepa PD12	(Wang et al., 2007)
Fenol, tricloroetano	Quitosano	<i>Pseudomonas putida</i> BCRc14349	(Chen et al., 2007)
2,4,6-triclorofenol	Gel de k-carragenano	Consorcio microbiano	(Gardin & Pauss, 2001)
Petróleo crudo	Poliuretano	<i>Yarrowia lipolytica</i>	(Oh et al., 2000)
Petróleo crudo	Quitina y Quitosano	<i>Rhodococcus corynebacterioides QBT0</i>	(Gentili et al., 2006)

## CAPÍTULO II

### 3. MARCO METODOLOGICO

En el presente capítulo se describe los procesos empleados en el desarrollo de la investigación de las cepas del páramo Cayambe Coca previamente aisladas. Además, se describe los protocolos para la determinación de la actividad enzimática, la cinética bacteriana de las cepas con mayor potencial enzimática y la inmovilización del consorcio bacteriano.

#### **3.1. Descripción del Área de Estudio**

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Aplicada perteneciente a la carrera de Ingeniería en Biotecnología ubicado en las instalaciones de la Universidad Técnica del Norte en el campus San Vicente de Paúl (0°20'49.3"N 78°06'51.2"W) provincia de Imbabura, cantón Ibarra, parroquia El Sagrario.

#### **3.2. Ejecución del Primero Específico**

##### ***3.2.1. Selección de la Cepa Inóculo***

Las cepas bacterianas son procedentes del proyecto “Consortio Alemán Ecuatoriano sobre biodiversidad” (BIO\_GEEC). En la investigación se evaluó la actividad enzimática de 78 cepas bacterianas.

##### ***3.2.2. Determinación Primaria de la Actividad Enzimática***

Las cepas bacterianas aisladas se sometieron a pruebas rápidas en medios cromogénicos (Tabla 5) para determinar la capacidad para producir enzimas hidrolíticas como ureasa, fosfatasa, lipasa y arilsulfatasa. A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, se estrió la superficie del medio en el pico de flauta. Se incubó los tubos a 37° C de 1 a 7 días dependiendo de la actividad enzimática y se visualizó el cambio de color.

**Tabla 5***Medios detección actividad enzimática*

<b>Actividad enzimática</b>	<b>Medio Agar</b>	<b>Color Detección Actividad</b>	
		<b>Presencia</b>	<b>Ausencia</b>
Ureasa	Urea Agar Base, Christensen	Fucsia	Amarillo
Fosfatasa	Fenolftaleína fosfato Agar	Rosado	Translucido
Lipasa	Rojo Fenol Agar	Rosado	Anaranjado
Arilsulfatasa	Wayne Sulfatasa Agar Base	Rojo	Rosa paliso

**3.2.3. Producción de la Enzima Ureasa**

Se analizó la actividad ureasa utilizando el medio Urea Agar Base, Christensen (HiMedia). Se pesó 24 g y se disolvió en 950 ml de agua destilada, el medio se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, se enfrió el medio a 45°C y finalmente se añadió 50 ml de urea estéril al 40%. El medio se dispense en tubo estériles y se dejó solidificar. Se sembró las cepas bacterianas estriando la superficie del medio en pico de flauta y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Los microorganismos que hidrolizan la urea lentamente pueden requerir hasta 72 horas de incubación. Los aislados bacterianos fueron comparados con *Proteus mirabilis* utilizada como cepa control. La producción de ureasa se indica por un cambio de tonalidad en el medio. El color amarillo indica una prueba negativa y un color fucsia, morada o rosa representa una prueba positiva.

**3.2.4. Producción de la Enzima Fosfatasa**

La actividad fosfatasa en las cepas bacterianas se determinó utilizando el medio Fenolftaleína Fosfatasa Agar (HiMedia). Se disolvió en 100 mL de agua destilada estéril 28 gr del medio previamente esterilizado por Radiación Ultravioleta (UV) por 20 min en la cabina de bioseguridad. Se agito y calentó el medio hasta que se disuelva completamente, y se dispense en tubos estériles. Se sembró las cepas bacterianas estriando la superficie del medio, incubando a 37 °C durante 24 horas. Los aislados bacterianos fueron comparados con *Staphylococcus aureus* utilizada como cepa control. Después de la incubación se agregó un álcali (Hidróxido de Sodio 1M) a este medio, la fenolftaleína liberada da un color rosado brillante indicando una prueba positiva, mientras que la ausencia de cambio de color indica una prueba negativa.

### **3.2.5. Producción de la Enzima Lipasa**

Se analizaron las cepas bacterianas aisladas del suelo de páramo, para determinar la actividad lipasa se utilizó el medio rojo fenol agar. El medio se preparó con 5 g/L de peptona, 3 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de CaCl<sub>2</sub>, 15 g/L de agar, se ajustó el pH a 7,4 con NaOH 0,1 M, se esterilizó durante 15 minutos en autoclave a 15 Lb de presión a 121°C, se dejó enfriar el medio a 60°C se añadió 10 ml/l de colorante rojo fenol estéril y 10 ml/l de aceite de oliva estéril. Se sembró los cultivos y se incubó a 37°C durante 48 h. Al cabo de las 48 horas se realizó una valoración basada en el cambio de tonalidad del medio. Los aislados bacterianos fueron comparados con *Bacillus Subtilis* utilizada como cepa control. El color anaranjado indico una prueba negativa, y el color rosado una prueba positiva.

### **3.2.6. Producción de la Enzima Arisulfatasa**

Se analizó la actividad arisulfatasa de las bacterias aisladas de suelo de páramo utilizando el medio Wayne Sulfatasa Agar Base (HiMedia). Se peso 20.71 gr del medio y se disolvió 1000 mL de en agua destilada, se añadió 10 mL de Glicerol al 99%, el medio se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, se dejó solidificar el medio. Se sembró las cepas bacterianas estriando la superficie del medio en el pico de flauta y se incubaron por 7 días a 37 °C. Al cabo del periodo de incubación se añadió 1 mL de Carbonato de sodio 2M y observo el cambio de color de rosa pálido a rojo intenso. La falta de cambio de color indica una reacción negativa.

### **3.2.7. Evaluación de los halos de hidrólisis enzimática**

#### **3.2.7.1. Preparación del inóculo líquido bacteriano**

Las cepas se cultivaron en caldo nutriente estéril. Se inóculo cada cepa bacteriana en 10 mL de caldo nutriente y se incubo a 37 ° C. Posterior a las 24 horas de inoculación, se midió la turbidez del inóculo bacteriano ajustando la concentración bacteriana del tubo a 5 en la escala de McFarland.

#### **3.2.7.2. Actividad ureasa**

La actividad enzimática ureasa se evidenció por la formación de halo de hidrólisis y se cuantifico en milímetros (mm) el cambio de color en el medio de cultivo. En placas agar Urea Base Christensen, se perforó el agar con una medida de 5mm de diámetro y se cargó los pocillos

con 20 uL del inóculo líquido bacteriano, de control positivo *Proteus mirabilis* y de control negativo caldo nutriente estéril, las cepas se incubaron a 37°C por 24 horas.

#### **3.2.7.3. Actividad fosfatasa**

La actividad ureasa se evidenció por la formación de halo de hidrólisis y se cuantificó en milímetros (mm) el cambio de color en el medio de cultivo. En placas Fenolftaleína Fosfatasa Agar, se perforó el agar con una medida de 5mm de diámetro y se cargó los pocillos con 20 uL del inóculo líquido bacteriano, de control positivo *Staphylococcus aureus* y de control negativo caldo nutriente estéril, las cepas se incubaron a 37°C. Al cabo de las 24 horas se añadió Hidróxido de Sodio 1M.

#### **3.2.7.4. Actividad lipasa**

La actividad lipídica se evidenció por la formación de halo de hidrólisis y se cuantificó en milímetros (mm) el cambio de color en el medio de cultivo. En placas Rojo Fenol Agar, se perforó el agar con una medida de 5mm de diámetro y se cargó los pocillos con 20 uL del inóculo líquido bacteriano, de control positivo *Bacillus Subtilis* y de control negativo caldo nutriente estéril, las cepas se incubaron a 37°C por 48 horas.

#### **3.2.7.5. Actividad arilsulfatasa**

La reacción enzimática arilsulfatasa se evidenció por la formación de halo de hidrólisis y se cuantificó en milímetros (mm) el cambio de color en el medio de cultivo. En placas Wayne Sulfatasa Agar, se perforó el agar con una medida de 5mm de diámetro y se cargó los pocillos con 20 uL del inóculo líquido bacteriano, de control negativo caldo nutriente estéril y se incubó a 37°C. Después de los 7 días de incubación, se añadió Carbonato de Sodio 2M.

### **3.3. Ejecución del segundo objetivo específico**

Se evaluó el crecimiento bacteriano con el lector de microplacas BK-EL10C Elisa. Este método utiliza la densidad óptica (OD).

#### **3.3.1. Preparación del inóculo líquido bacteriano**

Las cepas bacterianas con mayor potencial enzimático MP7, MP46, MP20, QP20, MA7, MA46, MA47 y QA4 se cultivaron en caldo nutriente estéril. Se inoculó cada cepa en 10 mL de caldo nutriente y se incubó a 37 ° C con agitación orbital a 150 rpm. Posterior a las 24 horas de incubación, los tubos de cultivo líquido se escalaron a matraces Erlenmeyer de 30

mL de caldo nutriente estéril y se incubaron a 37°C con agitación orbital de 150 rpm durante 24 horas.

### ***3.3.2. Pretratamiento de Placas y Tapas de 96 Pocillos.***

La placa de 96 pocillos y la tapa se esterilizó con etanol al 96%, en la tapa se colocó 10 mL de la solución, mientras que en cada pocillo se colocó 400ul de la solución, se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Posterior al tiempo de incubación, se desechó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente dentro de la cabina de bioseguridad con luz ultravioleta (UV) durante 30 min.

### ***3.3.3. Medición de la curva de crecimiento***

Se diluyó el inóculo bacteriano preparado en 10 mL de caldo nutriente estéril ajustando la concentración bacteriana del tubo a 0.5 en la escala de McFarland. Se dispensó 200 uL del cultivo diluido bacteriano en los pocillos de la placas y caldo nutriente estéril como blanco. Las curvas de crecimiento de las cepas se tomaron cada hora durante 48 horas. Las muestras fueron evaluadas en el lector de microplacas con una longitud de onda de 600nm y una agitación orbital de 0.60 s a una temperatura de 37°C.

## **3.4. Ejecución del Tercer Objetivo Específico**

Formación del consorcio bacteriano e inmovilización en dos soportes orgánico e inorgánico.

### ***3.4.1. Preparación del Consorcio Bacteriano***

Los microorganismos con mayor potencial enzimático se seleccionaron para el consorcio bacteriano, se cultivaron por separado en tubos con 10 ml de caldo nutriente y se incubaron a las mismas condiciones por 24 horas a 37°C. Luego se transfirió el precultivo a 30ml caldo nutriente fresco a 37°C y velocidad de agitación de 150 rpm por 24 h. Después de la incubación se mezclaron proporciones iguales de cada cepa en concentraciones iguales (C. Wang et al., 2019).

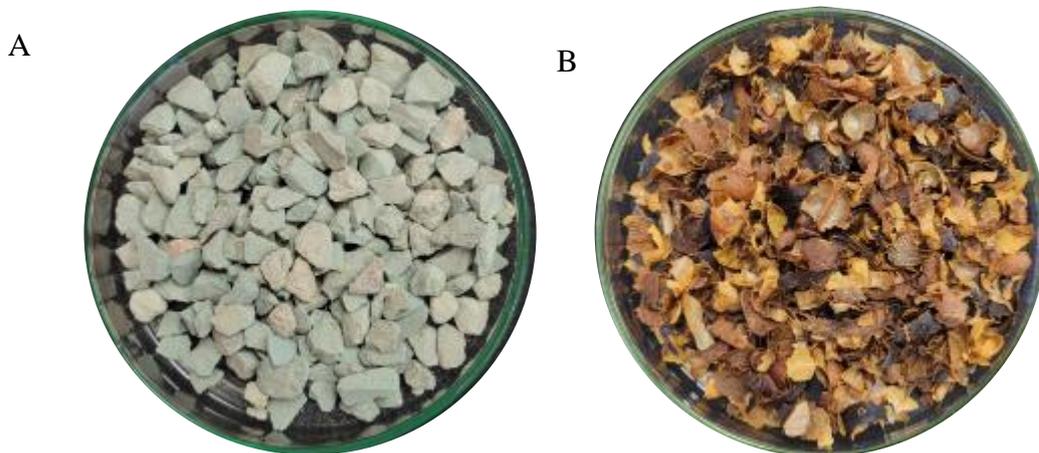
### **3.4.2. Preparación de los Soportes Inmovilizadores**

#### **3.4.2.1. Tratamiento de la Cáscara de Café**

Las cascaras de café se lavaron tres veces con abundante agua y se remojaron en una solución de NaOH al 2% durante 30 min, se retiraron las muestras y se lavaron repetidamente con agua destilada hasta que el nivel de pH este cercano al neutro. Se esterilizaron las cascaras de café a 121°C por 15 min. Los sustratos esterilizados se conservaron a temperatura ambiente en recipientes esterilizados y sellados sin humedad. Posteriormente, los trozos de cascaras se secaron en la estufa a 50°C por 6 horas (Figura XA).

### **Figura 3**

*Sustratos para el Soporte Inmovilizante*



*Nota.* A. Zeolita estilizada B. Cascaras de café esterilizadas

#### **3.4.2.2. Tratamiento Zeolita**

La zeolita se activó sumergiéndola en HCl al 1% y se agitó en un agitador rotatorio durante 30 minutos. Posteriormente, se drenó el ácido y las rocas se empaparon en NaOH al 1% y se agitaron en un agitador rotatorio durante 30 minutos. Se drenó el álcali y se enjuagaron las rocas con agua destilada. El pH de la zeolita se ajustó a neutro. La roca porosa activada se secó en un horno a 60°C durante 4 horas (Darmayati et al., 2021)

### **3.4.3. Procedimiento de Inmovilización del Consorcio en los Soportes**

El consorcio antes de la inmovilización fue cultivado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio caldo nutriente y se incubó a 37°C con agitación constante

de 150 rpm durante 24h. Después de la incubación el consorcio bacteriano, se ajustó con caldo nutriente estéril a una concentración de 1 en la escala de McFarland.

La inmovilización se realizó en matraces de 250ml que contenían 100ml de caldo nutriente diluido cuatro veces. Esto es importante porque una alta densidad de células puede dificultar la inmovilización uniforme y puede provocar la agregación celular (Laothamteep et al., 2022). Se fijaron los soportes mediante absorción física, 20gr de soporte con una suspensión celular de 100ml de consorcio bacteriano por 24h a 30°C con una agitación de 100 rpm. Después de la incubación se decantó el sobrenadante y el soporte se separó de la suspensión celular. Las células inmovilizadas en los sustratos se reposaron en un soporte con una malla estéril (Nhu et al., 2016).

#### ***3.4.4. Métodos analíticos para el conteo de células inmovilizadas***

El recuento del consorcio bacteriano en la muestra líquida se determinó mediante el método de vertido en placa con medio agar nutriente. El recuento de bacterias en el soporte se determinó homogeneizando la cascara de café con agua destilada estéril en un mortero y la zeolita se pulverizó por acción mecánica con material estéril en una bandeja de aluminio esterilizada y agua destilada estéril. Luego se realizó una dilución en serie en agua destilada estéril y las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  se inocularon en agar nutriente. Para cada muestra, se utilizaron 2 réplicas de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  (Darmayati et al., 2021).

#### **3.5. Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos de los ensayos enzimáticos fueron procesados en el programa estadístico Infostat versión 2020. Las actividades enzimáticas evaluadas son: ureasa, fosfatasa, lipasa y arilsulfatasa, de las cuales se evaluó el diámetro del halo de hidrólisis de los diferentes sustratos enzimáticos y se aplicó pruebas estadísticas con un nivel de significación del 5% de acuerdo con los datos Tabla 7.

**Tabla 6***Pruebas Estadísticas Aplicadas en la Evaluación de la Actividad Enzimática*

<b>Actividad enzimática</b>	<b>Prueba estadística (Paramétrica/ No Paramétrica)</b>	<b>Pruebas Post Hoc</b>
Ureasa	ANOVA bloques (paramétrica)	Tukey
Lipasa	T- student pareada (paramétrica)	Ninguna
Fosfatasa	Kruskall Wallis (no paramétrica)	Mann-Whitney

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos en los ensayos descritos en el apartado de marco metodológico desde la evaluación de la actividad enzimática de las cepas aisladas del Parque Nacional Cayambe-Coca, la cinética bacteriana de cepas con mayor potencial enzimático y la formación del consorcio bacteriano con su inmovilización en dos soportes uno orgánico e inorgánico.

#### 4.1. Pruebas de Actividad Enzimática

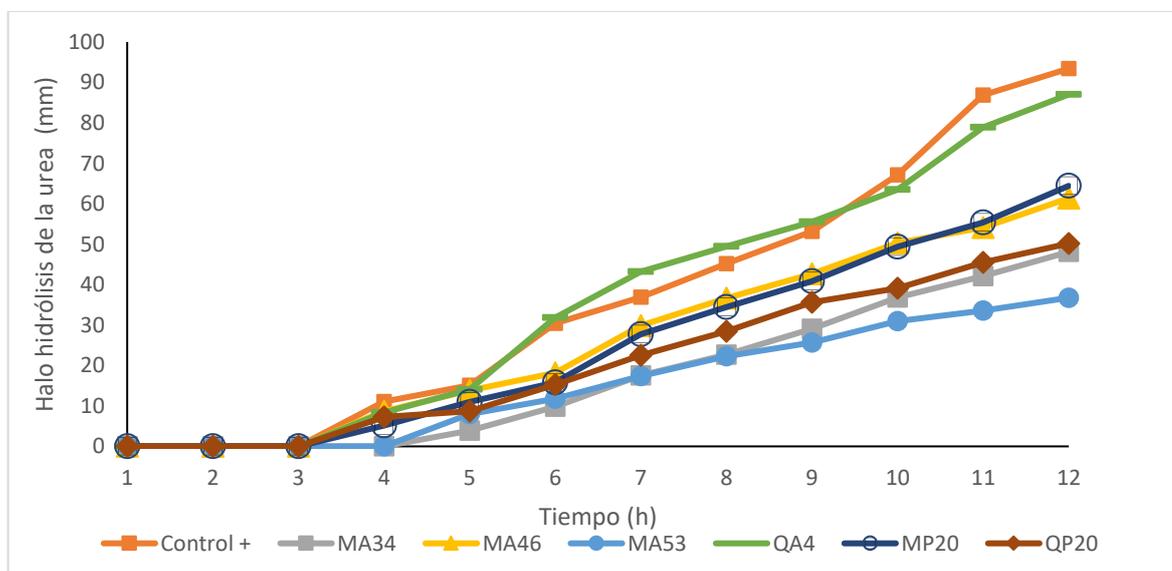
La capacidad de secretar enzimas hidrolíticas extracelulares de las cepas previamente aisladas se evaluó en un período de 7 días. Se obtuvo que el 13.3% de las cepas bacterianas hidrolizan la urea, el 45.3% presenta actividad fosfatasa y el 24% presente actividad lipídica. Mientras que, ninguna cepa mostró actividad arilsulfatasa.

##### 4.1.1. Actividad Ureasa

Las cepas aisladas mostraron un cambio de color a violeta, indicando la hidrólisis de la urea para las cepas: MA34, MA46, MA53, QA4, MP20 Y QP2. En la figura 4, se pudo observar que la actividad aumentó con el pasar del tiempo alcanzando su pico máximo a las 12 horas.

**Figura 4**

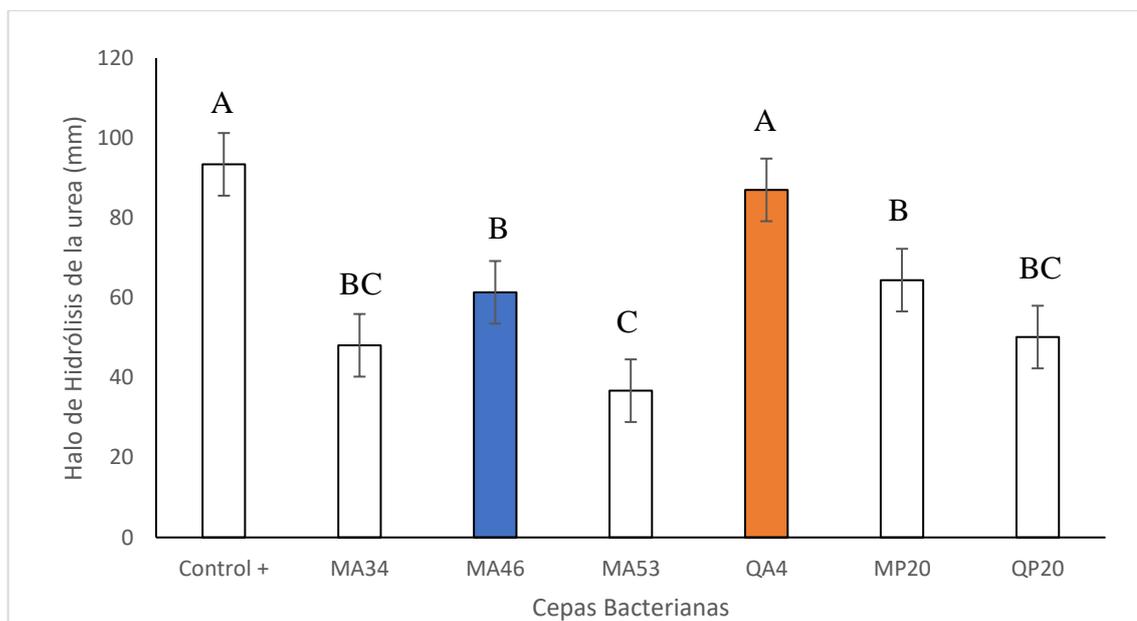
*Crecimiento del Halo de Hidrólisis en un tiempo de 12 horas*



A las 12 horas de evaluación se encontraron diferencias significativas ( $F= 35.6$ ;  $gl= 6$ ,  $12$ ;  $p < 0.01$ ) cuando las cepas fueron comparadas entre ellas (figura 5). El crecimiento del halo de hidrólisis aumento constantemente con el pasar de las horas, lo que indica una tasa constante de hidrólisis de urea a las 12 primeras horas. Como se observa en la Figura 5, el análisis de Tukey al 5% muestra que el mejor halo de hidrólisis fue QA4 con un diámetro de 87 mm, similar al control positivo (*Proteus mirabilis*) con un diámetro 93.40 mm de halo hidrolítico, lo que demuestra que son estadísticamente iguales, lo que sugiere que se produce una cantidad similar de enzimas ureasa. Por el contrario, la cepa MA53 con un diámetro de halo 36.74 mm está ubicado en el último rango de significancia, lo que indica una menor producción de la enzima. Las barras de error muestran la variabilidad de los datos. Cepas como MA34 y MA53 tienen desviaciones estándar más pequeñas, indicando datos más consistentes, mientras que otras cepas como QA4 muestran mayor variabilidad.

**Figura 5**

*Longitud del Halo de Hidrólisis de la Urea a las 12 horas*



Mekonnen et al. (2021) menciona que los microorganismos capaces de hidrolizar la urea comprendían entre el 17 y el 30% de los microorganismos aerobios, microaerófilos y anaeróbicos aislados de sus muestras de suelo. En la investigación las cepas que exhiben actividad ureasa son el 13.3%, que demuestra que la cantidad de bacterias ureolíticas presente en el suelo de páramo se encuentran en el rango establecido.

Como lo expone Baddam et al. (2016) la actividad de la urea influye en la tasa de introducción de los nutrientes nitrogenados en el suelo y se puede usar como indicador de la ganancia o pérdida de nitrógeno. Dado que la actividad de la ureasa se puede utilizar para evaluar eficazmente los cambios en la calidad del suelo, ya que su actividad aumenta con la fertilización orgánica y disminuye con la labranza del suelo.

La ureasa microbiana existe en el suelo en dos formas diferentes. Intracelularmente, asociado directamente con microorganismos ureolíticos, o extracelularmente, después de ser liberado de las células (Burbank et al., 2012). Las bacterias ureolíticas aumentan el pH mediante la hidrólisis de la urea, liberando sustancias poliméricas extracelulares aumentando la alcalinidad del entorno circundante, lo que provoca la precipitación de minerales (Bibi et al., 2018). Los estudios actualmente de la precipitación de carbonato por microorganismos se centran en las hidrólisis de la urea mediante la enzima ureasa. La urea se hidroliza intracelularmente en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). El ácido carbónico se disocia y produce iones carbonato ( $\text{CO}_3$ ), los iones de carbonato reaccionarían con los iones de calcio (de  $\text{CaCl}_2$ ) y precipitan el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) a un pH más alto (Kaur et al., 2012). La precipitación de estos minerales provoca cambios en las propiedades geológicas que ayudan a mejorar la calidad del suelo.

Las cepas con alta actividad ureasa, pueden ser potencialmente útiles en aplicaciones agrícolas para mejorar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo mediante la descomposición de urea. Esto podría mejorar la fertilidad del suelo y la eficiencia del uso de fertilizantes. Estas cepas podrían usarse en procesos de biorremediación mediante lixiviación, tratamiento de urea de aguas residuales, taponamiento de formaciones geológicas para mejorar la recuperación de petróleo, captura en fase sólida de contaminantes inorgánicos y otras fisuras de medios porosos Jimenez et al. (2007), Bundeleva et al. (2012) y Arias et al. (2017).

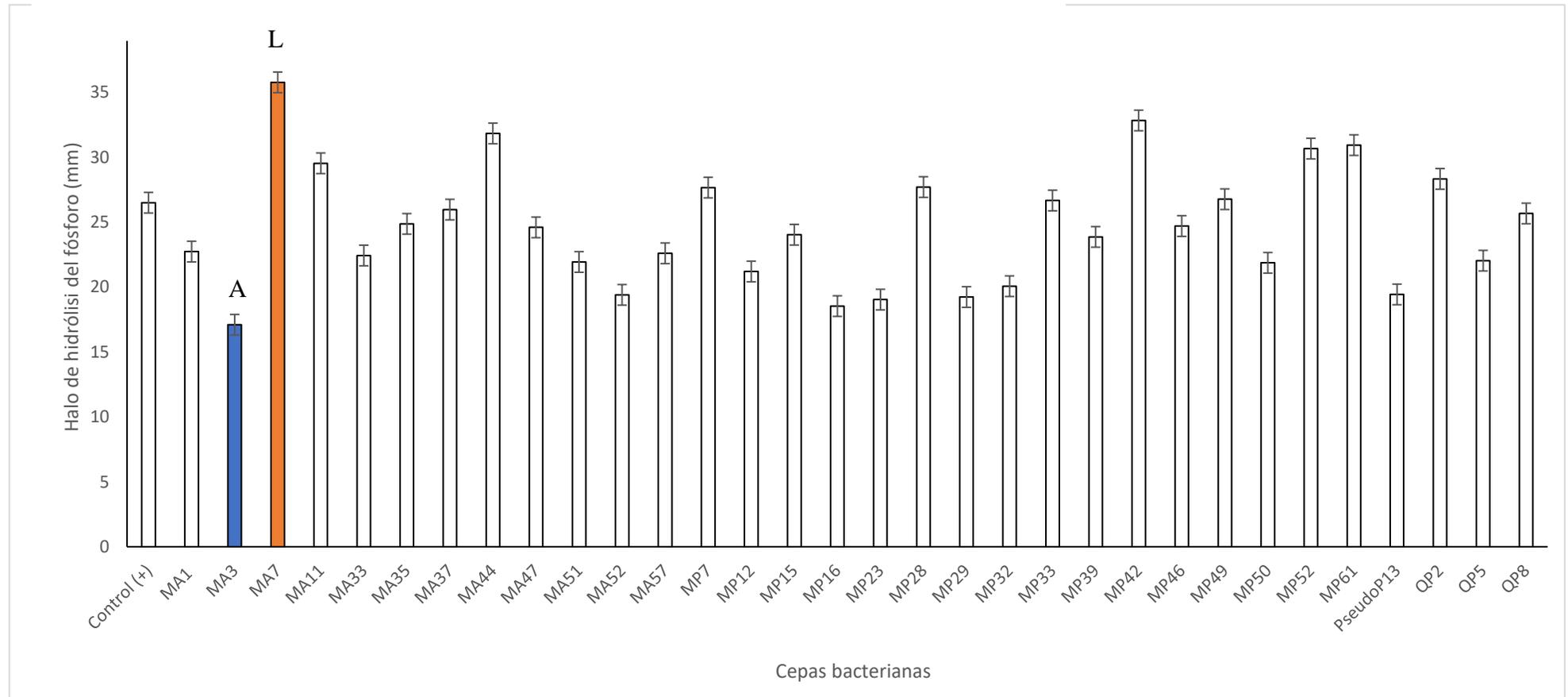
#### ***4.1.2. Actividad Fosfatasa***

La actividad fosfatasa se identificó en las placas de Fenolftaleína fosfatasa agar por el cambio de color a rosa al añadir Hidróxido de Sodio 1M, lo que indica la secreción de la enzima fosfatasa. De las 78 cepas bacterias, 32 dieron positivo a las 24 horas de evaluación, encontrando diferencias significativas ( $H = 80.72$ ;  $gl=32$ ;  $p < 0.01$ ) entre las cepas; lo que sugiere que algunas cepas tienen una capacidad significativamente mayor para liberar fósforo

que otras. La cepa MA7 (figura 5) mostró un mayor halo de hidrólisis fosfórico de 35.8 mm, en comparación a la cepa MA3 con un menor halo de 17.1 mm.

**Figura 6**

*Halo de Hidrólisis de la Enzima Fosfatasa a las 24 horas*



En la figura 6 se puede evidenciar que 32 cepas bacterianas presentar actividad fosfatasa, siendo una de las actividades con mayor presencia de aislados bacterianos del páramo. Además, al realizar la prueba post hoc al 5% se demostró que MA3 tiene el rango más bajo en comparación a las demás cepas bacterianas y presenta diferencias significativas con MA7, siendo la cepa con mayor actividad fosfatasa. Por otro lado, las cepas MP15, MP46 y MA47 no presentan diferencias significativas en los halos de hidrólisis.

Los suelos de páramo suelen ser ácidos, lo que puede influir en la solubilización de suelos ácidos pueden producir fosfatasas adaptadas a estas condiciones ácidas para mejorar la disponibilidad de fósforo. Los suelos de páramo a menudo tienen bajos niveles de fósforo disponible debido a su alta acidez y la tendencia del fósforo a formar compuestos insolubles.

Las fosfatasas juegan un papel esencial en la mineralización del fósforo orgánico, cuando existe una limitación de fósforo en el suelo, las raíces de las plantas y los microorganismos aumentan la secreción de fosfatasas para impulsar la solubilización de fosfato (Sardans & Peñuelas, 2005). Las fosfatasas se activan cuando la disponibilidad de P del suelo es baja. Por lo tanto, la secreción y el aumento de la actividad son la forma en que algunos microbios y plantas responden a la acidez del suelo y la deficiencia de fósforo (Ndabankulu et al., 2022). Dodor & Tabatabai (2003) señala que las fosfatasas se pueden inhibir en suelos modificados orgánicamente, mientras que la fertilización mineral aumenta esta actividad enzimática.

Los resultados obtenidos en la investigación demostraron una alta variabilidad en la actividad fosfatasa, lo que podría reflejar adaptaciones específicas de las cepas a sus respectivos entornos o condiciones experimentales. Cepas con alta actividad fosfatasa podrían estar mejor adaptadas para entornos con bajos niveles de fósforo, mientras que las cepas con baja actividad podrían no tener el mismo potencial para solubilizar fósforo.

Los suelos de páramos conocidos por su alto contenido de materia orgánica proporcionan una rica fuente de nutrientes y compuestos orgánicos que pueden ser transformados por las fosfatasas (Y. Mir et al., 2023). La alta concentración de materia orgánica en estos suelos de páramo significa que hay una mayor cantidad de sustratos para que las fosfatasas actúen, lo que puede resultar en una mayor actividad enzimática (Uwituze et al., 2022), concordando con los resultados obtenidos, siendo la fosfatasa la actividad enzimática con mayor prevalencia de las cepas bacterianas aisladas.

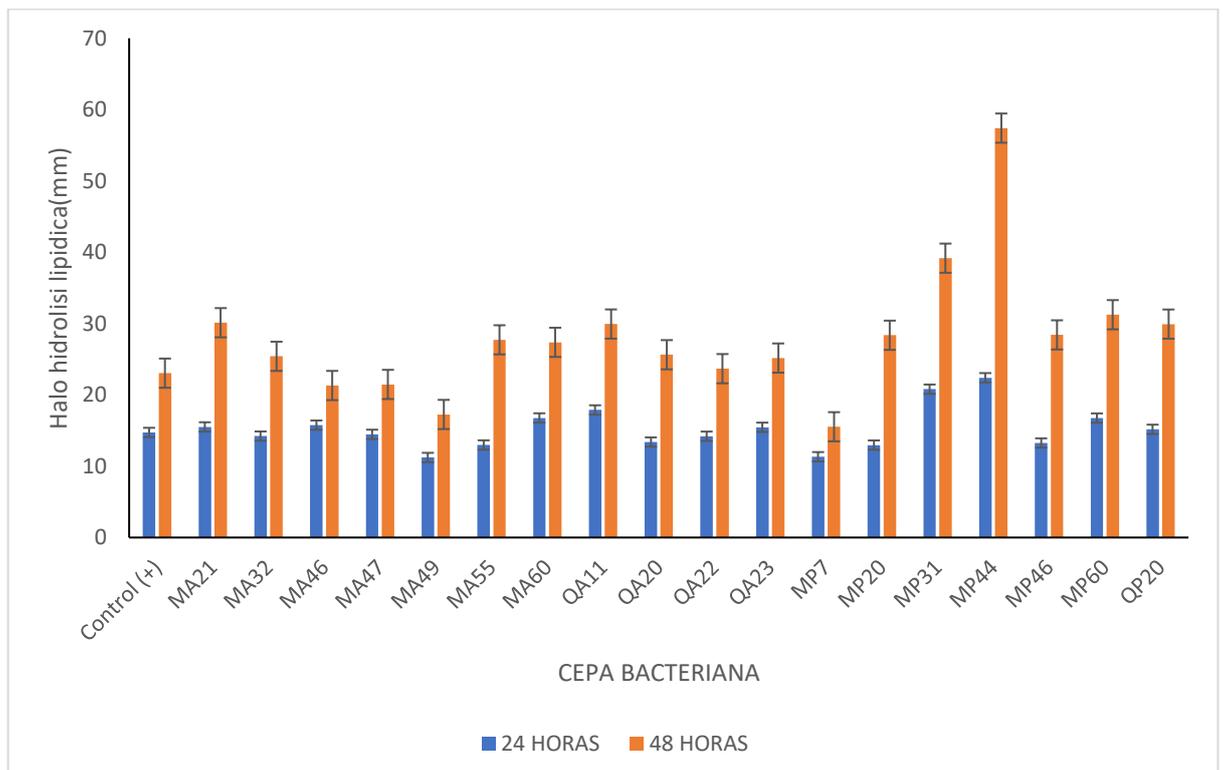
Las aplicaciones potenciales de las cepas con alta actividad fosfatasa podrían ser útiles en aplicaciones agrícolas y biotecnológicas para mejorar la disponibilidad de fósforo en suelos deficientes. Estas cepas podrían ser utilizadas como biofertilizantes para aumentar la fertilidad del suelo (Park et al., 2022) y a su vez, un indicador de la humedad de suelo de los páramos. Sardans & Peñuelas (2005) reportaron cuando la humedad del suelo se redujo en un 21%, hubo una reducción del 31-40% en la actividad de la fosfatasa ácida.

#### 4.1.3. Actividad Lipasa

La actividad lipasa fue identificada utilizando Rojo Fenol Agar adecuado para los productores de lipasa. Las cepas productoras de lipasa se identificaron por la formación de halos de color rosados alrededor de las colonias cuando las placas de aceite de oliva y rojo fenol se incubaron a 37°C, indicando la hidrólisis de lípidos para las cepas: MA21, MA32, MA46, MA55, MA60, QA11, QA20, QA22, QA23, MP7, MP20, MP31, MP44, MP46, MP60 Y QP20 (Figura 7) a las 48 horas de evaluación. La cepa MP44 mostró mayor actividad lipasa con un halo de hidrólisis de lípidos de 57.40 mm, mientras que la cepa MP7 mostró un menor diámetro de halo de hidrólisis 15.53 mm a las 48 horas.

**Figura 7**

*Halo de Hidrólisis de la Actividad Lipasa a las 24 y 48 horas*



La figura 7 se evaluó la actividad lipasa, las cepas bacterianas evaluadas mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $T=-8.20$ ;  $p<0.01$ ;  $gl=18$ ) en los halos de hidrólisis lipídica a las 24 y 48 horas, esto significa que se evidencia un cambio en la actividad enzimática de las cepas bacterianas con el tiempo. El valor t negativo sugiere que la actividad lipasa a las 48 horas es mayor que a las 24 horas, lo que puede implicar que las bacterias incrementan su producción de lipasa con el tiempo bajo las condiciones experimentales utilizadas. Los resultados del estudio podrían sugerir que la producción de lipasa es inducida o aumentada con el tiempo en respuesta a las condiciones del medio, lo que podría ser útil para optimizar la producción de lipasa en aplicaciones industriales.

Las lipasas son enzimas hidrolíticas que catalizan la hidrólisis del triacilglicerol. Se obtienen de diferentes fuentes, siendo las bacterias una de ellas y se encuentran en casi todos los hábitats (Ilesanmi et al., 2020). En los suelos de páramo, donde la materia orgánica es rica en compuestos lipídicos debido a la vegetación única y los residuos orgánicos, la actividad lipasa facilita la descomposición de estos compuestos, transformándolos en nutrientes más accesibles. La descomposición de la materia orgánica y la formación de humus contribuyen al secuestro de carbono en el suelo. Los suelos de páramo actúan como sumideros de carbono, y la actividad lipasa desempeña un papel en la estabilización de carbono en el suelo,

La capacidad de los microorganismos para producir enzimas está influenciada por condiciones ambientales como la temperatura y el pH (Sharma et al., 2001). En las investigaciones informan que el enriquecimiento de muestras ambientales con un sustrato de interés expone a los microorganismos bajo una presión de selección, aquí la “supervivencia del más fuerte” tiene lugar en diferentes condiciones físicas, químicas y nutricionales (Li et al., 2009). La adaptación de comunidades microbianas naturales y complejas a condiciones específicas, en este caso a degradación de aceite de oliva, puede aumentar la prevalencia de las cepas bacterianas con capacidades metabólicas especiales, como la actividad lipolítica.

El carbono es un factor principal para la expresión de la actividad lipasa. El efecto de diferentes fuentes de carbono mostró una mayor actividad en el sustrato lipídico, siendo el aceite de oliva la fuente de carbono con la mayor actividad lipasa (Soleymani et al., 2017). Las placas de detección conformadas por aceite de oliva son una fuente de ácido graso de cadena larga, que favorecen la producción de lipasas a diferentes bacterias (Gupta et al., 2004), como el género *Bacillus*, conocido para la producción de lipasa debido a su capacidad para secretar una gran cantidad de enzima en su espacio extracelular. Estudios previos de Almeida & Bravo (2024)

reportan que los códigos QA20, QA22, QA23, MA49, MA21, MA32 y MA55 pertenecen al género *Bacillus* sp. Como lo expone Ali et al. (2023) los géneros bacterianos más importantes que se han investigado para la producción de lipasas incluyen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* y *Archomobacter*.

Además, de la fuente de carbono el tipo de fuente de nitrógeno en el medio también influye en la detección de la actividad lipídica, generalmente el nitrógeno orgánico es preferido, tales como la peptona y el extracto de levadura, que se han utilizado como fuente de nitrógeno en las placas de detección lipídica. Sharma et al. (2002) informó sobre la estimulación en la producción de lipasa de *Bacillus* sp en presencia de cloruro de calcio. A parte de los diversos componentes químicos de un medio, los parámetros fisiológicos como el pH, la temperatura, la agitación y el período de incubación desempeñan un papel importante al influir en la hidrólisis de sustratos. La expresión de la actividad lipasa en las cepas bacterianas es un proceso que está altamente influenciado por las condiciones ambientales y nutricionales del medio de cultivo. En la tabla 7 se puede evidenciar los parámetros óptimos para la expresión de la actividad lipasa en las cepas aisladas del páramo. El pH inicial del medio de crecimiento es importante para la producción de lipasa. En gran medida, las bacterias prefieren un pH de alrededor de 7 para un mejor crecimiento y producción de la enzima, como en el caso de *Bacillus* sp, *Acinetobacter* sp. y *Burkholderia* sp. Por otro lado, en la investigación se incubó a una temperatura de 37°C. Kanwar, (2002) expone que la temperatura óptima para la producción de lipasa corresponde a la temperatura de crecimiento del respectivo microorganismo; por lo que, se ha observado que las lipasas se producen mejor en un rango de temperatura de 20 a 45 °C (Kanwar, 2002). Los períodos de incubación que van desde unas pocas horas hasta varios días, que son los más adecuados para la producción máxima de lipasa por parte de las bacterias. Un período de incubación de 12 h fue óptimo para la producción de lipasa por *A. calcoaceticus* y *Bacillus* sp. y 16 h para *B. thermocatenulatus* (Gupta et al., 2004). Por otro parte, Willerding et al. (2011) presentaron que el índice de actividad lipídica a diferentes temperaturas y horas, siendo 48 horas las mejores a 35°C y 24 horas a 45°C. Por lo mismo, en el estudio se trabajó con un periodo de 48 horas.

**Tabla 7**

*Parámetros Óptimos para la Expresión Lipídica en Bacterias del Páramo*

<b>Parámetros</b>	<b>Valor</b>
pH del medio	7
Incubación horas	48
Temperatura óptima	37°C
Sustrato	Aceite oliva

Varias cepas bacterianas de diferentes entornos, como, glaciares, fuentes hidrotermales, efluentes industriales, sedimentos, y suelo, han mostrado la capacidad de producir enzimas lipasas (Yasin et al., 2021). Las cepas bacterias aisladas de suelos de páramo, debido a su variabilidad de expresión lipídica puede ser usadas principalmente en la formulación de detergentes, degradación de biopelículas, producción de biodiésel y biorremediación. La temperatura es el factor principal que influye en el crecimiento y la fisiología de los microorganismos utilizados para producir productos deseados como las lipasas (Verma et al., 2012). Estas enzimas en procesos de biorremediación desempeñan un papel clave en la remediación enzimológica de suelos contaminados, mientras que las lipasas adaptadas al frío tienen un gran potencial en el campo del tratamiento de aguas residuales.

#### **4.1.4. Actividad Arilsulfatasa**

Sin embargo, los microorganismos aislados del páramo no presentaron actividad arilsulfatasa. En los resultados ninguna cepa mostró un cambio de color al añadir carbonato de sodio, lo que sugiere la ausencia de la actividad. La actividad Arilsulfatasa es un indicador de la mineralización del azufre en los suelos y juega un papel importante en el ciclo del azufre. Las bacterias secretan la enzima al medio ambiente en respuesta a la limitación de S, Kunito et al. (2022) menciona que los microorganismos tienden a producir arilsulfatasa cuando la concentración de sulfato es baja en el suelo. Además, esto sugiere que la producción de arilsulfatasa por microorganismos del suelo es probablemente un mecanismo de respuesta para adaptarse a una menor disponibilidad de sulfato. Chen et al., (2019), mencionan que el pH del suelo es uno factores directos que controlan la actividad arilsulfatasa, produciendo la máxima actividad a un pH de 6,2 que sugiere, que los suelo a un pH alrededor de 6,2 tiene concentraciones más altas de la enzima, por lo tanto, la comunidad microbiana produce la

mayor cantidad de enzimas arilsulfatasa a este pH. Sin embargo, los suelos de páramo son ácidos con un pH menor a 5, condiciones que no óptimos para la producción de la enzima arilsulfatasa (Podwojewski & Poulénard, 2000).

#### 4.2. Cinética de Crecimiento de las cepas con mayor potencial enzimático

La cinética de crecimiento permite el monitoreo continuo y en tiempo real del crecimiento microbiano a lo largo del tiempo. Esto proporciona una visión más completa del patrón de crecimiento, desde la fase lag hasta la fase exponencial y la fase estacionaria (Krishnamurthi et al., 2021).

**Tabla 8**

*Cepas Seleccionadas con Mayor Potencial Enzimático para Cinética Bacteriana*

<b>Cepa Bacteriana</b>	<b>Actividad Enzimática</b>
MP7	Ureasa Lipasa Fosfatasa
MP46	Lipasa Fosfatasa
MP20	Ureasa Lipasa
QP20	Ureasa Lipasa
MA7	Fosfatasa
MA46	Ureasa Lipasa
MA47	Lipasa Fosfatasa
QA4	Ureasa

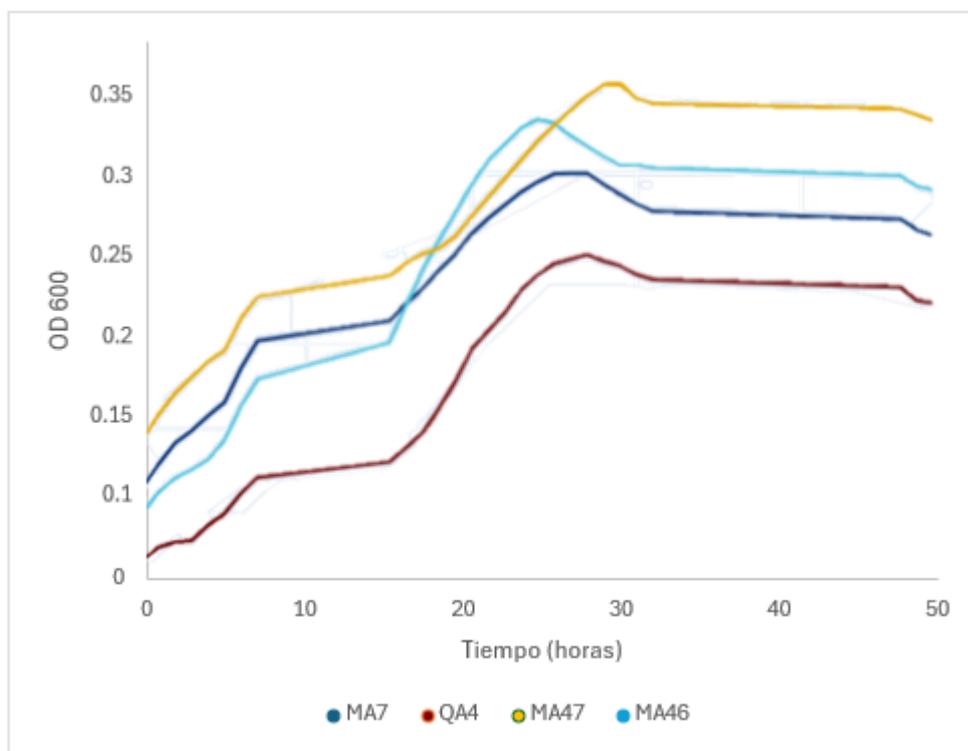
Al analizar la cinética de las cepas con actividad enzimática (tabla 8). Se identificaron tres fases de crecimiento bacteriano como se muestra en la Figura 7. Las cepas seleccionadas experimentan la fase de latencia durante las primeras 15 horas, durante esta fase permite que

las células se adaptan a las nuevas condiciones al inducir la expresión de genes necesarios para el crecimiento en el nuevo entorno (Rolfe et al., 2012). La fase exponencial presento un periodo de 15 horas aproximadamente, alcanzando la máxima concentración celular a las 30 horas de crecimiento. La tercera fase, conocida como fase estacionaria con una duración de 18 horas aproximadamente, a partir de las 30 horas de crecimiento (Figura 8A). Las bacterias de la figura 8B experimentaron un periodo de latencia alrededor de las 8 horas, pasando a un crecimiento rápido en la fase exponencial, con un tiempo de duración de 17 horas, a un crecimiento lento en la fase estacionaria a partir de las 25 horas de crecimiento. Como lo expresan Juška et al. (2006) el patrón de crecimiento microbiano difiere de un organismo a otro debido a varios factores, como el período de incubación, la naturaleza y la composición de los nutrientes del medio en el que se cultivó el organismo. Además, el caldo de nutrientes que se utilizó en este estudio también era un tipo de medio simple, por lo que los nutrientes contenidos son mínimos, lo que también contribuye al alargamiento de la fase de retraso, que es la fase de adaptación (Moreno et al., 2020).

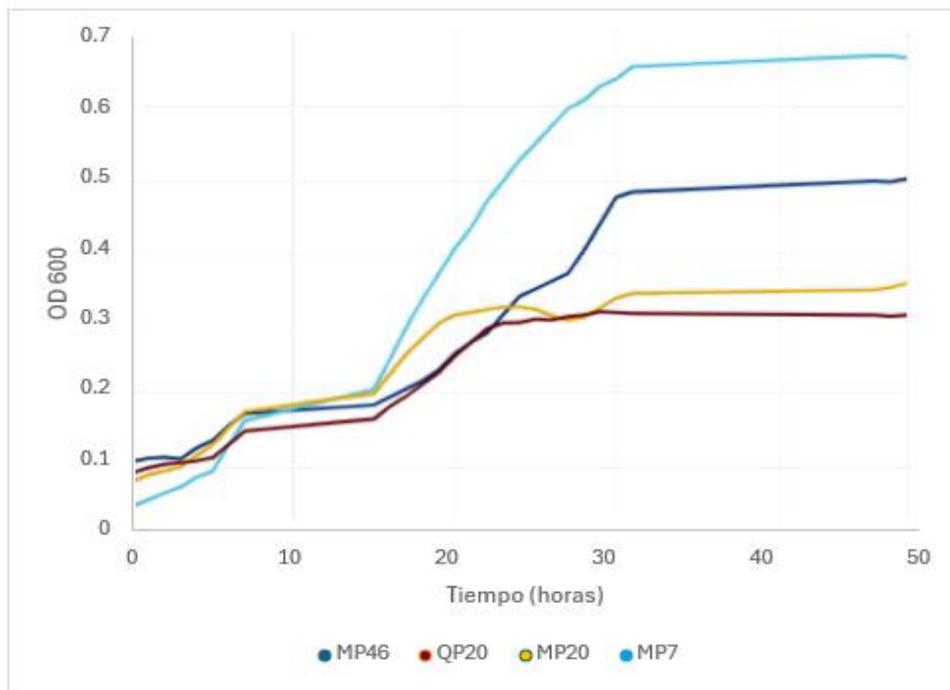
### Figura 8

*Curva de Crecimiento de las Cepas con Mayor Potencial Enzimático*

A)



B)



*Nota.* Graficas suavizada con el programa Dashing Growth Curves A. Curva de crecimiento de las cepas Gram negativas MP7, MP46, MP20 Y QP20 B. Curva de crecimiento de las cepas Gram positivas MA7, MA46, MA47 Y QA4.

La dinámica del crecimiento microbiano varía significativamente entre diferentes especies bacterianas. Esta variabilidad se refleja en varios parámetros, los mejores estudiados son el tiempo de duplicación y la tasa específica de crecimiento de diferentes especies bacterianas. De hecho, existe tal variación entre cepas relacionadas que subyace a la adaptación de cepas específicas a sus entornos (Hilau et al., 2022).

Al analizar la cinética de las bacterias con mayor potencial enzimático, se identificaron que las tasas de crecimiento varían entre las diferentes bacterias (Tabla 9). Incluso en condiciones óptimas de nutrientes y en ausencia de competencia, las especies variarán en sus tasas máximas de crecimiento en función de su capacidad para sintetizar rápidamente componentes celulares y replicar sus genomas (Lauro et al., 2009).

**Tabla 9***Cinética de Crecimiento Celular de las Cepas Bacterianas*

Cepa	Modelo	Tasa específica de crecimiento (h <sup>-1</sup> )	Tiempo de duplicación (h)	R <sup>2</sup>	Valor t	p
MP7	$y = 2.54x - 3.27$	2.54	0.39	0.88	9.33	<0.01
MP20	$y = 2.29x - 2.88$	2.29	0.43	0.95	9.72	<0.01
MP46	$y = 1.45x - 2.53$	1.45	0.68	0.78	8.93	<0.01
QP20	$y = 1.44x - 2.55$	1.44	0.69	0.89	5.64	<0.01
MA7	$y = 1.27x - 2.27$	1.27	0.79	0.66	4.48	0,0001
MA46	$y = 1.58x - 2.46$	1.58	0.63	0.89	6.23	0,0002
MA47	$y = 0.83x - 1.99$	0.83	1.20	0.62	9.56	<0.01
QA4	$y = 1.39x - 2.77$	1.39	0.72	0.87	16.82	<0.01

En la tabla 9, el coeficiente  $R^2$  registra valores menores a 0.9 para las cepas MP7, QP20, MA46, MA7, QA4, MA47 y MAP46, que puede significar que menos del 90% de la variabilidad en los datos puede ser explicados por el modelo. Esto no necesariamente implica que el modelo no sea útil, pero sugiere que hay factores adicionales o variabilidad no capturadas por el modelo; siendo la falta de control de temperatura en el lector de microplacas un variable que pudo afectar la cinética de crecimiento. Heerden et al., (2017) señala que cada especie bacteriana tiene una temperatura óptima de crecimiento, si la temperatura durante la incubación no se mantiene constante y óptima, la tasa de crecimiento puede variar significativamente.

La evaluación de la cinética de crecimiento de la cepa MA7 ( $T=4.48$ ;  $p<0.01$ ) y MP46 ( $T=16.82$ ;  $p<0.01$ ) durante 48 horas, demuestra una diferencia notable en el crecimiento de las cepas bajo las condiciones evaluadas. Además, entre las fases del crecimiento: lag, exponencial y estacionaria; los resultados sugieren que hay diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre estas fases. A pesar, de la falta de control de temperatura, la alta significancia estadística sugiere que las diferencias observadas son consistentes y robustas.

Las tasas de crecimiento específicas van desde  $0.83 \text{ h}^{-1}$  a  $2.54 \text{ h}^{-1}$  en los microorganismos con mayor potencial enzimático (tabla 9). Las comunidades bacterianas en un volumen de suelo pueden experimentar un amplio espectro de tasas de crecimiento (Borer & Or, 2022). El microorganismo con mayor tasa específica de crecimiento fue MP7, siendo unas de las bacterias con menor tamaño  $< 4.6 \text{ um}$ , (Anexo 5) (Kirchman, 2016) menciona que la teoría metabólica de la ecología predice que las tasas de crecimiento serán más altas para los organismos más pequeños de la biosfera.

Los tiempos de duplicación de las cepas bacterianas del páramo van desde los 0.39 a 1.20 (h). Las cepas con tiempos de duplicación cortos poseen mecanismos que les permiten mantener una alta actividad metabólica y rápida reproducción, aprovechando los recursos rápidamente; estas cepas se pueden implementar en procesos industriales que requieren rápida producción de biomasa o metabolitos específicos. Mientras que, las cepas con tiempos de duplicación largos pueden ser más eficientes en la utilización de recursos limitados, exhibiendo estrategias de crecimiento más sostenibles a largo plazo, siendo útiles en procesos que requieren estabilidad a largo plazo y eficiencia en la utilización de recursos. (Gibson et al., 2018). En las investigaciones de Borer & Or, (2022) exponen que las procariotas varían con tiempos de duplicación que van desde los 10 minutos para organismos criados en laboratorio hasta días para microorganismos oligotróficos.

Tradicionalmente, las mediciones de la curva de crecimiento se realizan midiendo la absorbancia de las bacterias, que está relacionada con el número de células, en cubetas a una longitud de onda de 600 nm con intervalos de 8 horas. Las versiones recientes aprovechan la automatización y las mediciones paralelas para lograr una mejor resolución temporal y un mayor rendimiento (Heerden et al., 2017). Además, los lectores de microplacas con placas de 96 pocillos han resultado cada vez más útiles para controlar el crecimiento de microorganismos (Stevenson et al., 2016)

### **4.3. Inmovilización del Consorcio en sustratos orgánicos e inorgánicos**

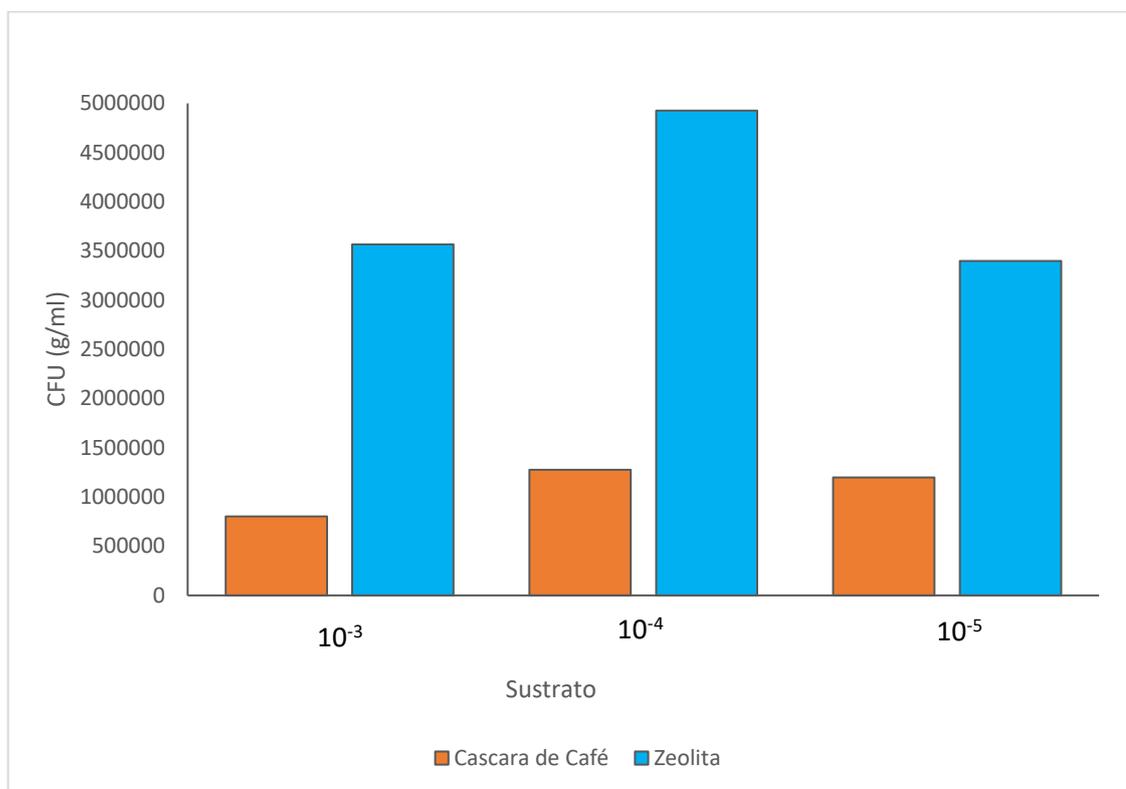
Para evaluar la inmovilización del consorcio bacteriano, se consideró la supervivencia microbiana y la actividad enzimática, después del proceso de inmovilización en los soportes orgánico e inorgánico. La supervivencia celular es una medida importante para evaluar la efectividad de la inmovilización bacteriana. Sin embargo, medir solo la supervivencia no garantiza que las bacterias estén realmente inmovilizadas en los soportes, ya que las células vivas podrían estar presentes en el medio sin estar adheridas al soporte. Por lo tanto, la microscopía electrónica permite la visualización directa de las células bacterianas adheridas a los soportes, proporcionando evidencia visual de la inmovilización. A través de la microscopía electrónica, se puede confirmar si las bacterias están verdaderamente inmovilizadas en los soportes orgánicos e inorgánicos. De tal manera, los resultados sobre la supervivencia celular pueden no reflejar completamente la eficiencia de la inmovilización.

Las células inmovilizadas es una herramienta que protege la viabilidad bacteriana contra condiciones ambientales extremas y previene la pérdida de células libres durante la biorremediación (Dzionic et al., 2016). Esta técnica reduce los costos operativos de la biorremediación y es un enfoque amigable con el medio ambiente, considerado la principal ventaja de los tratamientos biológicos.

La selección del material portador es vital en el curso del proceso de inmovilización, ya que controla la actividad metabólica, proporciona estabilidad operativa, protege de un entorno externo agresivo y peligroso y, por lo tanto, ayuda a lograr una biodegradación más eficiente (Suo et al., 2008)

## Figura 9

### Recuento de las Células de los Soportes Inmovilizados



En la figura 9 se puede evidenciar que la biomasa microbioma adherida en el soporte inmovilizador de la zeolita es mayor que en la cascara de café, esto sucede debido a que las zeolitas incluyen una gran cantidad de grupos Si-OH que desempeñan un papel clave en el proceso de adsorción. Djukić et al. (2013) mencionan que la superficie de la zeolita puede adsorber biopolímeros como proteínas, ácidos nucleicos, ARN y ADN de manera selectiva, por lo tanto, las zeolitas son capaces de adherir microorganismos en sus superficies y pueden usarse como un portador eficiente en el proceso de inmovilización de biomasa.

La zeolita son materiales inorgánicos que son resistentes a la degradación microbiana y son un portador ideal para la inmovilización debido a sus diversas estructuras de poros, propiedades superficiales ajustables, excelente estabilidad térmica, costo relativamente (Zhang et al., 2021)

Según Macario et al. (2007) las zeolitas tienen propiedades hidrofóbicas, carácter ácido o básico y resistencia química y mecánica. Además, las células bacterianas producen exopolisacáridos que pueden tener un papel protector en condiciones desfavorables y actuar

como adhesivos para interacciones con diversos sustratos y también como promotores de la agregación celular y la formación de biopelículas (Kubota et al., 2008), (Djukić et al., 2013).

Los resultados evidencian, una menor adhesión de los microorganismos al soporte orgánico. Sin embargo Cassidy et al. (1996) expone que, en el proceso de inmovilización de bacterias, los organismos prefieren los portadores orgánicos sobre los portadores inorgánicos. Esto se debe, a la disponibilidad, compuestos biodegradables, no tóxicos y generalmente tienen una mayor capacidad de absorción en comparación con los portadores inorgánicos y la presencia de grupos funcionales de amplio espectro en la superficie de las matrices orgánicas, lo que proporciona una mejor adición en la capacidad de absorción.

La cascara de café constituida principalmente por celulosa y lignina, contiene celulosa que exhibe características importantes para la inmovilización de enzimas, tales como biocompatibilidad, comportamiento anfipático y químicamente inerte bajo condiciones fisiológicas (Liu & Chen, 2016), lo que permite mejorar la unión de las bacterias con la matriz de soporte. A pesar del uso generalizado de portadores naturales, todavía hay algunas desventajas importantes asociadas con ellos, como la disrupción de partículas debido a la alta concentración bacteriana y la producción excesiva de gas, la baja estabilidad mecánica y química, la alta tasa de contaminación y pérdida de adhesividad durante el almacenamiento en un largo período de tiempo de 20 a 25 días (Cassidy et al., 1996)

Microorganismos inmovilizados en un medio que contiene polímero orgánico, se verán inducidas a sintetizar y secretar enzimas extracelulares requeridas para hidrolizar el polímero. A medida que la enzima actúa sobre el polímero, conduce a la hidrolización del polímero y a una mayor producción de sustratos utilizables, en el caso de los polímeros naturales, la hidrolización conduce a un aumento en la cantidad de sustrato por encima de la propia matriz (Saez et al., 2012).

La actividad enzimática del consorcio inmovilizado en los soportes fue una respuesta positiva para las reacciones enzimáticas ureasa, lipasa y fosfatasa. Las células bacterianas al inmovilizarse presentan limitaciones de las enzimas inmovilizadas, dado que, la cinética rápida de las enzimas nativas se reduce drásticamente cuando se inmovilizan debido a las restricciones de difusión, lo que hace que la enzima inmovilizada sea más baja su tasa de reacción (Basso & Serban, 2019). Sin embargo, el consorcio mantiene su capacidad catalítica para las actividades enzimáticas identificadas.

La inmovilización de las cepas bacterias en sustratos orgánicos e inorgánicos para la recuperación de los suelos, se debe al factor de sostenibilidad. La cascara de café se aprovecha el residuo, que podría ser desechado o subutilizado, reduciendo el impacto ambiental asociado con su eliminación. Además, contiene compuestos orgánicos que pueden servir como nutrientes adicionales para las bacterias inmovilizadas, lo que a su vez mejora el crecimiento y actividad en el proceso de biorremediación. En lo que se refiere al sustrato inorgánico, la zeolita es una opción más sostenible en comparación con materiales sintéticos, ya que puede ser reutilizada, reduciendo la necesidad de materiales nuevos y minimizando los residuos. El uso de los sustratos en la biorremediación contribuye a prácticas ambientales responsables.

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES

- Las cepas aisladas del páramo Nacional Cayambe-Coca presentaron actividades: ureasa, fosfatasa y lipasa. Sin embargo, no se evidencia la presencia de actividad arilsulfatasa, esto puede ser debido a los parámetros físicos de los suelos de páramo, siendo el pH un factor directo que afecte la actividad.
- Al evaluar la actividad enzimática de los aislados bacterianos del páramo, seis bacterias presentaron actividad ureasa, treinta y dos actividades fosfatasa y dieciocho actividades lipasa; siendo la actividad fosfatasa la que se evidencio en mayor cantidad en las cepas.
- Al análisis la cinética bacteriana de las cepas asiladas se encontró cepas de crecimiento lento, mientras que otras son de crecimiento mucho más rápido. Estas diferencias en las tasas de crecimiento son importantes para seleccionar cepas que puedan proliferar eficientemente en diferentes condiciones, contribuyendo de manera efectiva a la formación de un consorcio bacteriano.
- En el proceso de inmovilización de las cepas bacterianas, las características físicas de la zeolita permiten una mejor adhesión de las bacterias en su superficie y pueden usarse como un portador eficiente en el proceso de inmovilización de biomasa, sin embargo, las cascaras de café es una alternativa sostenible e igual de eficiente para inmovilización celular.

## RECOMENDACIONES

- Ampliar el estudio utilizando sustratos específicos como Tween 20, Tween80 y tributirina, en diferentes rangos de temperatura, pH y tiempo de incubación, con el fin de evidenciar la capacidad de las cepas para producir los diferentes tipos de lipasas.
- Identificación molecular de las cepas bacterianas con mayor potencial enzimático.
- Controlar que la temperatura de incubación sea constante y adecuada para las cepas bacterianas en estudio y el uso de un programa automatizado como GEN5 para la toma de muestras en intervalos de tiempos más cortos.
- El uso del microscopio electrónico para la verificación del proceso de inmovilización y la conservación del microorganismo inmovilizado mediante procesos de liofilización o temperaturas bajas que no afecten el metabolismo de los microorganismos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adetunji, A., Lewu, F., Mulidzi, R., & Ncube, B. (2017). The biological activities of α-glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(3), 794–807. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000300018>
- Adamaforest, M. d. (2015). Estudio de Límites del Parque Nacional Cayambe-Coca. Caracterización del uso del suelo en 8 áreas prioritarias. Quito, Ecuador
- Ali, S., Khan, S., Hamayun, M., & Lee, I. (2023). The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. *Microorganisms*, 11(2), 510. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510>
- Andreolli, M., Lampis, S., Brignoli, P., & Vallini, G. (2015). Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: a comparative study. *Journal of Environmental Management*, 121-131.
- Andriani, A., & Tachibana, S. (2016). Lignocellulosic materials as solid support agents for *Bjerkandera adusta* SM46 to enhance polycyclic aromatic hydrocarbon degradation on sea sand and sea water media. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 8, 310-320. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.011>
- Arias, D., Cisternas, L., & Rivas, M. (2017). Biomineralization of calcium and magnesium crystals from seawater by halotolerant bacteria isolated from Atacama Salar (Chile). *Desalination*, 405, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2016.11.027>
- Ashton, E. C., & Macintosh, D. J. (2002). Preliminary assessment of the plant diversity and community ecology of the Sematan mangrove forest, Sarawak, Malaysia. *Forest Ecology and Management*, 166(1–3), 111–129. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00673-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00673-9)
- Baddam, R., Reddy, G. B., Raczkowski, C., & Cyrus, J. S. (2016). Activity of soil enzymes in constructed wetlands treated with swine wastewater. *Ecological Engineering*, 91, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.021>
- Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>

- Bayat, Z., Hassanshahian, M., & Cappello, S. (2015). Immobilization of Microbes for Bioremediation of Crude Oil Polluted Environments: A Mini Review. *Open Microbiol J.*, 31(9), 48–54.
- Bayat, Z., Hassanshahian, M., & Cappello, S. (2015). Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: A mini review. *PubMed*, 9, 48-54. <https://doi.org/10.2174/1874285801509010048>
- Berillo, D., Al-Jwaid, A., & Caplin, J. (2021). Polymeric Materials Used for Immobilisation of Bacteria for the Bioremediation of Contaminants in Water. *Polymers*, 13(7), 1073. <https://doi.org/10.3390/polym13071073>
- Bibi, S., Oualha, M., Ashfaq, M. Y., Suleiman, M. T., & Zouari, N. (2018). Isolation, differentiation, and biodiversity of ureolytic bacteria of Qatari soil and their potential in microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. *RSC Advances*, 8(11), 5854–5863. <https://doi.org/10.1039/C7RA12758H>
- Bird, M. I., Wynn, J. G., Saiz, G., Wurster, C. M., & McBeath, A. (2015). The Pyrogenic Carbon Cycle. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 43(1), 273–298. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-060614-105038>
- Borer, B., & Or, D. (2022). Bacterial age distribution in soil – Generational gaps in adjacent hot and cold spots. *PLOS Computational Biology*, 18(2), e1009857. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009857>
- Brockman, H. L. (2013). Lipases. En Elsevier eBooks (pp. 729-732). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378630-2.00118-3>
- Brück, S. A., Contato, A. G., Gamboa-Trujillo, P., de Oliveira, T. B., Cereia, M., & de Moraes Polizeli, M. de L. T. (2022). Prospection of Psychrotrophic Filamentous Fungi Isolated from the High Andean Páramo Region of Northern Ecuador: Enzymatic Activity and Molecular Identification. *Microorganisms*, 10(2), 282. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020282>
- Brück, S. A., Torres, B. D. M., & de Moraes Polizeli, M. de L. T. (2023). The Ecuadorian páramo in danger: What we know and what might be learned from northern wetlands. *Global Ecology and Conservation*, 47. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02639>

- Bundeleva, I., Shirokova, L., Bénézeth, P., Pokrovsky, O., Kompantseva, E., & Balor, S. (2012). Calcium carbonate precipitation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Chemical Geology*, 291, 116–131. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2011.10.003>
- Burbank, M. B., Weaver, T. J., Williams, B. C., & Crawford, R. L. (2012). Urease Activity of Ureolytic Bacteria Isolated from Six Soils in which Calcite was Precipitated by Indigenous Bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 29(4), 389–395. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.575913>
- CAI, S., DENG, K., TANG, J., SUN, R., LU, H., LI, J., WU, Y., & XU, R. (2021). Characterization of extracellular phosphatase activities in periphytic biofilm from paddy field. *Pedosphere*, 31(1), 116–124. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60061-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60061-3)
- Cassidy, M., Lee, H., & Trevors, J. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(2), 79–101. <https://doi.org/10.1007/BF01570068>
- Certini, G. (2005). Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia*, 143(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1788-8>
- Chen, G., Zhu, H., & Zhang, Y. (2003). Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Research in Microbiology*, 154(6), 393–398. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00082-2)
- Chen, H., Liu, J., Li, D., Xiao, K., & Wang, K. (2019). Controls on soil arylsulfatase activity at a regional scale. *European Journal of Soil Biology*, 90, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2018.11.001>
- Chen, Y., Lin, T., Huang, C., Lin, J., & Hsieh, F. (2007). Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal Of Hazardous Materials*, 148(3), 660-670. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.03.030>
- Cheng, Y., Narayanan, M., Shi, X., Chen, X., Li, Z., & Ma, Y. (2023). Phosphate-solubilizing bacteria: Their agroecological function and optimistic application for enhancing agro-productivity. *Science of The Total Environment*, 901, 166468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166468>

- Chuncho, C., & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *Revista Indígena Bosque Latitud Cero*, 71-83.
- Cordova, M., Carrillo, G., Crespo, P., Wilcox, B., & Célleri, R. (2015). Evaluation of the Penman-Monteith (FAO 56 PM) Method for Calculating Reference Evapotranspiration Using Limited Data. *International Mountain Society*, 230-239. doi: <https://doi.org/10.1659/MRD-JOURNAL-D-14-0024.1>
- Coyle, D. R., Nagendra, U. J., Taylor, M. K., Campbell, J. H., Cunard, C. E., Joslin, A. H., Mundepi, A., Phillips, C. A., & Callahan, M. A. (2017). Soil fauna responses to natural disturbances, invasive species, and global climate change: Current state of the science and a call to action. *Soil Biology and Biochemistry*, 110, 116–133. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.03.008>
- Cunningham, C., Ivshina, I., Lozinsky, V., Kuyukina, & Philp, J. (2004). Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(2-3), 167-174. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.03.005>
- Darmayati, Y., Wiranata, Y., Afianti, N. F., & Manurung, B. (2021). Comparison of Viability and Efficacy of an Immobilized Bacterial Consortium in Four Different Carriers to Degrade Oil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 789(1), 012016. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/789/1/012016>
- DeLong, J., Okie, J., Moses, M., Sibly, R., & Brown, J. (2010). Shifts in metabolic scaling, production, and efficiency across major evolutionary transitions of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29), 12941–12945. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007783107>
- Djukić, A., Mojović, L., Jokić, B., Nikolić, S., & Pejin, J. (2013). Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. *Bioresource Technology*, 135, 454–458. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.066>
- Dodor, D., & Tabatabai, M. (2003). Effect of cropping systems on phosphatases in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166(1), 7–13. <https://doi.org/10.1002/jpln.200390016>
- Dominy, C., & Haynes, R. (2002). Influence of agricultural land management on organic matter content, microbial activity, and aggregate stability in the profiles of two Oxisols.

- Biology and Fertility of Soils, 36(4), 298–305. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0542-9>
- Dotaniya, M. L., Aparna, K., Dotaniya, C. K., Singh, M., & Regar, K. L. (2019). Role of soil enzymes in sustainable crop production. En Elsevier eBooks (pp. 569-589). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00033-5>
- Dzionic, A., Wojcieszynska, D., & Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.003>
- García, H. (2013). Valoración de los bienes y servicios ambientales provistos por el Páramo de Santurbán. *Centro de Investigación Económica y Social*, 81.
- García, M., Soto, B., & Simal, J. (2006). Evolution of the concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in burnt woodland soils. *Environ. Sci. Technol.*, 759-763. <http://dx.doi.org/10.1021/es051803v>
- García, V., Márquez, C., Isenhardt, T., Rodríguez, M., Crespo, S., & Cifuentes, A. (2019). Evaluating the conservation state of the páramo ecosystem: An object-based image analysis and CART algorithm approach for central Ecuador. *Heliyon*, 5(10), e02701. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02701>
- Gardin, H., & Pauss, A. (2001).  $\kappa$ -carrageenan/gelatin gel beads for the co-immobilization of aerobic and anaerobic microbial communities degrading 2,4,6-trichlorophenol under air-limited conditions. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 56(3-4), 517-523. <https://doi.org/10.1007/s002530000581>
- Gennadiev, A., & Tsibart, A. (2013). Pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of reserved and anthropogenically modified areas: factors and features of accumulation. *Eurasian Soil Sci*, 48, 28-36. <http://dx.doi.org/10.1134/S106422931301002X>
- Gentili, A., Cubitto, M., Ferrero, M., & Rodríguez, M. (2006). Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57(4), 222-228. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.02.009>
- Ghazala, I., Haddar, A., Ben, M., & Ellouz, S. (2016). Screening and Molecular Identification of New Microbial Strains for Production of Enzymes of Biotechnological Interest.

- Brazilian archives of Biology and Technology, 59. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150152>
- Gianfreda, L., & Rao, M. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 339-354. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.05.006>
- Gibson, B., Wilson, D., Feil, E., & Eyre, A. (2018). The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1880), 20180789. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0789>
- González-Pérez, J. A., González-Vila, F. J., Almendros, G., & Knicker, H. (2004). The effect of fire on soil organic matter—a review. *Environment International*, 30(6), 855–870. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.003>
- Górecka, E., & Jastrzębska, M. (2011). Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology And Food Science*, 75(1), 65-86.
- Gouma, S., Fragoeiro, S., Bastos, A., & Magan, N. (2014). Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. En S. Das, *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (págs. 301-319). London: Elsevier Inc.
- Groboillot, A., Boadi, D. K., Poncelet, D., & Neufeld, R. J. (1994). Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14(2), 75-107. <https://doi.org/10.3109/07388559409086963>
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification, and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763–781. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>
- Hall, M., Mothes, P., Samaniego, P., Militzer, A., Beate, B., Ramón, P., & Robin, C. (2017). Antisana volcano: A representative andesitic volcano of the eastern cordillera of Ecuador: Petrography, chemistry, tephra and glacial stratigraphy. *Journal Of South American Earth Sciences*, 73, 50-64. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2016.11.005>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579–598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>

- Heerden, J., Kempe, H., Doerr, A., Maarleveld, T., Nordholt, N., & Bruggeman, F. (2017). Statistics and simulation of growth of single bacterial cells: illustrations with *B. subtilis* and *E. coli*. *Scientific Reports*, 7(1), 16094. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15895-4>
- Hilau, S., Katz, S., Wasserman, T., Hershberg, R., & Savir, Y. (2022). Density-dependent effects are the main determinants of variation in growth dynamics between closely related bacterial strains. *PLOS Computational Biology*, 18(10), e1010565. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010565>
- Hossain, T. J., Chowdhury, S. I., Mozumder, H. A., Chowdhury, M. N. A., Ali, F., Rahman, N., & Dey, S. (2020). Hydrolytic Exoenzymes Produced by Bacteria Isolated and Identified from the Gastrointestinal Tract of Bombay Duck. *Frontiers in Microbiology*, 11(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02097>
- Hou, C. T., & Shimada, Y. (2009). Lipases. En Elsevier eBooks (pp. 385-392). <https://doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00153-x>
- Hsu, C., Chu, Y., Argin-Soysal, S., Hahm, T., & Lo, Y. M. (2006). Effects of surface characteristics and xanthan polymers on the immobilization of *Xanthomonas campestris* to fibrous matrices. *Journal of Food Science*, 69(9), E441-E448. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09928.x>
- Ilesanmi, O. I., Adekunle, A. E., Omolaiye, J. A., Olorode, E. M., & Ogunkanmi, A. L. (2020). Isolation, optimization, and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. *Scientific African*, 8, e00279. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00279>
- Ilesanmi, O., Adekunle, A., Omolaiye, J., Olorode, E., & Ogunkanmi, A. (2020). Isolation, optimization, and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. *Scientific African*, 8, e00279. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00279>
- Jack, T. R., & Zajic, J. E. (2005). The immobilization of whole cells. En Springer eBooks (pp. 125-145). <https://doi.org/10.1007/bfb0008744>
- Jimenez, C., Rodriguez, C., Piñar, G., Carrillo, F., Rodriguez, M., & Gonzalez, M. (2007). Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate

- precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere*, 68(10), 1929–1936. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.044>
- Junter, G.-A., & Jouenne, T. (2004). Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... or the cart before the horse. *Biotechnology Advances*, 22(8), 633–658. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.06.003>
- Juška, A., Gedminienė, G., & Ivanec, R. (2006). Growth of microbial populations. Mathematical modeling, laboratory exercises, and model-based data analysis. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 34(6), 417–422. <https://doi.org/10.1002/bmb.2006.494034062669>
- Kanwar, L. (2002). Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource Technology*, 84(3), 207–211. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00061-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00061-5)
- Karigar, C. S., & Rao, S. S. (2011). Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research*, 2011, 1–11. <https://doi.org/10.4061/2011/805187>
- Kato, H., Onda, Y., Tanaka, Y., & Asano, M. (2009). Field measurement of infiltration rate using an oscillating nozzle rainfall simulator in the cold, semiarid grassland of Mongolia. *CATENA*, 76(3), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2008.11.003>
- Kaur, N., Sudhakara, M., & Mukherjee, A. (2012). Biofilm and Microbial Applications in Biomineralized Concrete. In *Advanced Topics in Biomineralization*. InTech. <https://doi.org/10.5772/31124>
- Kirchman, D. (2016). Growth Rates of Microbes in the Oceans. *Annual Review of Marine Science*, 8(1), 285–309. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-122414-033938>
- Krishnamurthi, V., Niyonshuti, I., Chen, J., & Wang, Y. (2021). A new analysis method for evaluating bacterial growth with microplate readers. *PLOS ONE*, 16(1), e0245205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245205>
- Kubota, M., Nakabayashi, T., Matsumoto, Y., Shiomi, T., Yamada, Y., Ino, K., Yamanokuchi, H., Matsui, M., Tsunoda, T., Mizukami, F., & Sakaguchi, K. (2008). Selective adsorption of bacterial cells onto zeolites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 64(1), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.01.012>

- Kumar, B. (2010). Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. *Trends in Biotechnology*, 28, 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.11.006>
- Kunito, T., Kurita, H., Kumori, M., Sakaguchi, K., Nishizawa, S., Fujita, K., Moro, H., Sawada, K., Miyabara, Y., Toda, H., Nagaoka, K., & Ishikawa, Y. (2022). Microbial synthesis of arylsulfatase depends on the soluble and adsorbed sulfate concentration in soils. *European Journal of Soil Biology*, 111, 103418. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2022.103418>
- Lakshmi, M., Muthukumar, K., & Velan, M. (2012). Immobilization of *Mycoplana* sp. MVMB2 Isolated from Petroleum Contaminated Soil onto Papaya Stem (*Carica papaya* L.) and Its Application on Degradation of Phenanthrene. *Clean*, 40(8), 870-877. <https://doi.org/10.1002/clen.201100639>
- Laothamteep, N., Naloka, K., & Pinyakong, O. (2022). Bioaugmentation with zeolite-immobilized bacterial consortium OPK results in a bacterial community shift and enhances the bioremediation of crude oil-polluted marine sandy soil microcosms. *Environmental Pollution*, 292, 118309. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118309>
- Lauro, F., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T., Egan, S., Rice, S., DeMaere, M., Ting, L., Ertan, H., Johnson, J., Ferriera, S., Lapidus, A., Anderson, I., Kyrpides, N., Munk, A., Detter, C., Han, C. S., Brown, M., Robb, F., ... Cavicchioli, R. (2009). The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15527–15533. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903507106>
- Lázaro, J. (2015). *Actividad enzimática en suelos contaminados por metales pesados y sus implicaciones como indicadores de calidad*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Liu, Y., & Chen, J. (2016). Enzyme immobilization on cellulose matrixes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 31(6), 553–567. <https://doi.org/10.1177/0883911516637377>
- Lu, J., & Toy, P. H. (2009). Organic polymer supports for synthesis and for reagent and catalyst immobilization. *Chemical Reviews*, 109(2), 815-838. <https://doi.org/10.1021/cr8004444>

- Lu, J., & Toy, P. H. (2009). Organic Polymer Supports for Synthesis and for Reagent and Catalyst Immobilization. *Chemical Reviews*, 109(2), 815–838. <https://doi.org/10.1021/cr8004444>
- Macario, A., Giordano, G., Setti, L., Parise, A., Campelo, J., Marinas, J., & Luna, D. (2007). Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free system. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25(2–4), 328–335. <https://doi.org/10.1080/10242420701444256>
- Madriñán, S., Cortés, A. J., & Richardson, J. E. (2013). Páramo is the world's fastest evolving and coolest biodiversity hotspot. *Frontiers in Genetics*, 4. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00192>
- MAE. (2013). Sistema de clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental. Quito, Pichincha, Ecuador: Subsecretaría de Patrimonio Natural.
- McLean, M. A., & Parkinson, D. (1997). Soil impacts of the epigeic earthworm *Dendrobaena octaedra* on organic matter and microbial activity in lodgepole pine forest. *Canadian Journal of Forest Research*, 27(12), 1907–1913. <https://doi.org/10.1139/x97-165>
- Mekonnen, E., Kebede, A., Nigussie, A., Kebede, G., & Tafesse, M. (2021). Isolation and Characterization of Urease-Producing Soil Bacteria. *International Journal of Microbiology*, 2021, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2021/8888641>
- Mena, P., & Hofstede, R. (2006). Los páramos ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 91-109.
- Mena, P., & Medina, G. (2000). Los suelos del páramo (E. G. de T. en P. del Ecuador, Ed.; Serie Para).
- Ministerio de Ambiente y Agua. 2020. Plan de Manejo del Parque Nacional Cayambe Coca. Quito – Ecuador.
- Mir, Y. H., Ganie, M. A., Shah, T. I., Bangroo, S. A., Mir, S. A., Shah, A. M., Wani, F. J., Qin, A., & Rahman, S. U. (2023). Soil microbial and enzyme activities in different land use systems of the Northwestern Himalayas. *PeerJ*, 11, e15993. <https://doi.org/10.7717/peerj.15993>

- Mir, Y., Ganie, M., Shah, T., Bangroo, S., Mir, S., Shah, A., Wani, F., Qin, A., & Rahman, S. (2023). Soil microbial and enzyme activities in different land use systems of the Northwestern Himalayas. *PeerJ*, 11, e15993. <https://doi.org/10.7717/peerj.15993>
- Mohammadi, A., & Nasernejad, B. (2009). Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. *Journal Of Hazardous Materials*, 161(1), 534-537. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.132>
- Moreno, S., Kiviet, D., Vulin, C., Schlegel, S., Schlegel, K., Van, G., & Ackermann, M. (2020). Wide lag time distributions break a trade-off between reproduction and survival in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(31), 18729–18736. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003331117>
- Ndabankulu, K., Egbewale, S., Tsvuura, Z., & Magadlela, A. (2022). Soil microbes and associated extracellular enzymes largely impact nutrient bioavailability in acidic and nutrient poor grassland ecosystem soils. *Scientific Reports*, 12(1), 12601. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16949-y>
- Nhu, L., Hong, T., & Viet, V. (2016). Immobilization of *Saccharomyces Cerevisiae* cells on water hyacinth stem pieces and application to repeated batch fermentation for ethanol production. *Songklanakarin Journal of Science and Technology (SJST)*, 38(3), 333–341.
- Nivitha, G., & Vimalan, B. (2022). Role of Soil Enzymes in Maintaining Soil Health. *Biotica Research Today*, 4(5), 300–301.
- Noinville, S., Revault, M., Quiquampoix, H., & Baron, M. (2004). Structural effects of drying and rehydration for enzymes in soils: A kinetics-FTIR analysis of A-chymotrypsin adsorbed on montmorillonite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273(2), 414-425. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.01.067>
- Ogawa, J., & Shimizu, S. (2002). Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 367-375.
- Oh, Y., Maeng, J., & Kim, S. (2000). Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 54(3), 418-423. <https://doi.org/10.1007/s002530000384>

- Parameswarappa, S., Karigar, C., & Nagenahalli, M. (2007). Degradation of ethylbenzene by free and immobilized *Pseudomonas fluorescens*-CS2. *Biodegradation*, 19(1), 137-144. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9121-y>
- Park, J., & Chang, H. N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, 18(4), 303-319. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(00\)00040-9](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(00)00040-9)
- Park, Y., Solhtalab, M., Thongsomboon, W., & Aristilde, L. (2022). Strategies of organic phosphorus recycling by soil bacteria: acquisition, metabolism, and regulation. *Environmental Microbiology Reports*, 14(1), 3–24. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13040>
- Peyre, G., Osorio, D., François, R., & Anthelme, F. (2021). Mapping the páramo land-cover in the Northern Andes. *International Journal Of Remote Sensing*, 42(20), 7777-7797. <https://doi.org/10.1080/01431161.2021.1964709>
- Plieva, F. M., Galaev, I. Yu., & Mattiasson, B. (2007). Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. *Journal of Separation Science*, 30(11), 1657–1671. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700127>
- Podwojewski, P. (1999). Los suelos de las altas tierras andinas: Los páramos del Ecuador. *Sociedad Ecuatorina de las ciencias del suelo*, 9-14.
- Podwojewski, P., & Poulenard, J. (2000). Los SUELOS DE LOS PÁRAMOS DEL ECUADOR.
- Podwojewski, P., & Poulenard, J. (2004). Páramos Soils. New York: *Encyclopedia of Soil Science*.
- Podorozhko, E., Lozinsky, V., Ivshina, I., Kuyukina, M., Krivorutchko, A., Philp, J., & Cunningham, C. (2008). Hydrophobised sawdust as a carrier for immobilisation of the hydrocarbon-oxidizing bacterium *Rhodococcus ruber*. *Bioresource Technology*, 99(6), 2001-2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.024>
- Pressler, Y., Cotrufo, F., & Moore, J. (2018). Belowground community responses to fire: meta-analysis reveals contrasting responses of soil microorganisms and mesofauna. *Oikos*, 128, 309-327.

- Pressler, Y., Moore, J. C., & Cotrufo, M. F. (2019). Belowground community responses to fire: meta-analysis reveals contrasting responses of soil microorganisms and mesofauna. *Oikos*, 128(3), 309–327. <https://doi.org/10.1111/oik.05738>
- Quek, E., Ting, Y., & Tan, H. (2006). sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. *Bioresource Technology*, 97(1), 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.031>
- Robledo, J., Ramírez, D., Pérez, A., Gómez, C., González, O., Ramos, J., & González, R. (2011). Benzene, toluene, and o-xylene degradation by free and immobilized *P. putida* F1 of postconsumer agave-fiber/polymer foamed composites. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(3), 539-546. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.12.011>
- Rolfe, M., Rice, C., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A., Alston, M., Stringer, M., Betts, R., Baranyi, J., Peck, M., & Hinton, J. (2012). Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*, 194(3), 686–701. <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
- Romps, D. M., Seeley, J. T., Vollaro, D., & Molinari, J. (2014). Projected increase in lightning strikes in the United States due to global warming. *Science*, 346(6211), 851–854. <https://doi.org/10.1126/science.1259100>
- Saez, J., Benimeli, C., & Amoroso, M. (2012). Lindane removal by pure and mixed cultures of immobilized actinobacteria. *Chemosphere*, 89(8), 982–987. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.06.057>
- Sardans, J., & Peñuelas, J. (2005). Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. Forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.004>
- Sarma, S. J., & Pakshirajan, K. (2011). Surfactant aided biodegradation of pyrene using immobilized cells of *Mycobacterium frederiksbergense*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.09.004>
- Schaechter, M., Williamson, J., Hood, J., & Koch, A. (1962). Growth, Cell, and Nuclear Divisions in some Bacteria. *Journal of General Microbiology*, 29(3), 421–434. <https://doi.org/10.1099/00221287-29-3-421>

- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627–662. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00086-6)
- Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Jolly, R., Gupta, L., & Gupta, J. (2002). Production of an extracellular alkaline lipase from a new *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. *Indian Journal of Microbiology*, 42, 49–54.
- Shimizu, S., Ogawa, J., Kataoka, M., & Kobayashi, M. (1997). Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnology*, 45-87. doi:10.1007/BFb0103302
- Silveira, S., Martins, C., Cidrão, L., & Tédde, S. (2013). Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 12(28), 4412–4418. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2677>
- Sinsabaugh, R. L., Lauber, C. L., Weintraub, M. N., Ahmed, B., Allison, S. D., Crenshaw, C., Contosta, A. R., Cusack, D., Frey, S., Gallo, M. E., Gartner, T. B., Hobbie, S. E., Holland, K., Keeler, B. L., Powers, J. S., Stursova, M., Takacs-Vesbach, C., Waldrop, M. P., Wallenstein, M. D., ... Zeglin, L. H. (2008). Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters*, 11(11), 1252–1264. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x>
- Soleymani, S., Alizadeh, H., Mohammadian, H., Rabbani, E., Moazen, F., Sadeghi, H., Samsam, Z., Etemadifar, Z., & Rabbani, M. (2017). Efficient Media for High Lipase Production: One Variable at a Time Approach. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 9(2), 82–86.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Mbagwu, J. S. C., Zena Teshale, A., & Igwe, C. A. (2002). Influence of the addition of organic residues on carbohydrate content and structural stability of some highland soils in Ethiopia. *Soil Use and Management*, 18(4), 404–411. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2002.tb00259.x>
- Stevenson, K., McVey, A., Clark, I., Swain, P., & Pilizota, T. (2016). General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*, 6(1), 38828. <https://doi.org/10.1038/srep38828>

- Stolarzewicz, I., Bialecka, E., Majewska, E., & Krzyczkowska, J. (2010). Immobilization of Yeast on Polymeric Supports. *Chemical And Biochemical Engineering Quarterly*, 25(1), 135-144.
- Suo, Z., Avci, R., Yang, X., & Pascual, D. (2008). Efficient Immobilization and Patterning of Live Bacterial Cells. *Langmuir*, 24(8), 4161–4167. <https://doi.org/10.1021/la7038653>
- Trelles, J. A., & Rivero, C. W. (2013). Whole cell entrapment techniques. En *Methods in molecular biology* (pp. 365-374). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_24)
- Uwituze, Y., Nyiraneza, J., Fraser, T. D., Dessureaut, J., Ziadi, N., & Lafond, J. (2022). Carbon, Nitrogen, Phosphorus, and Extracellular Soil Enzyme Responses to Different Land Use. *Frontiers in Soil Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.814554>
- Verma, M., Sharma, S., Rani, V., & Saini, R. (2021). Screening of Microbial Enzymes and Their Potential Applications in the Bioremediation Process. *Microbial Products for Health, Environment and Agriculture*, 31, 359–378. Obtenido de [https://doi.org/10.1007/978-981-16-1947-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-16-1947-2_16)
- Verma, N., Thakur, S., & Bhatt, A. (2012). Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(8), 88–92.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163–1172. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>
- Wang, C., Gu, L., Ge, S., Liu, X., Zhang, X., & Chen, X. (2019). Remediation potential of immobilized bacterial consortium with biochar as carrier in pyrene-Cr(VI) co-contaminated soil. *Environmental Technology*, 40(18), 2345–2353. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1441328>
- Wang, R., Zhang, H., Sun, L., Qi, G., Chen, S., & Zhao, X. (2017). Microbial community composition is related to soil biological and chemical properties and bacterial wilt outbreak. *Scientific Reports*, 7(1), 343. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00472-6>
- Wang, Y., Tian, Y., Han, B., Zhao, H., Bi, J., & Cai, B. (2007). Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12. *Journal Of Environmental Sciences/Journal Of Environmental Sciences*, 19(2), 222-225. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(07\)60036-9](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(07)60036-9)

- Wardle, D. A., Bardgett, R. D., Klironomos, J. N., Setälä, H., van der Putten, W. H., & Wall, D. H. (2004). Ecological Linkages Between Aboveground and Belowground Biota. *Science*, 304(5677), 1629–1633. <https://doi.org/10.1126/science.1094875>
- Whitman, T., Whitman, E., Woolet, J., Flannigan, M. D., Thompson, D. K., & Parisien, M.-A. (2019). Soil bacterial and fungal response to wildfires in the Canadian boreal forest across a burn severity gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107571>
- Whitman, T., Whitman, E., Woolet, J., Flannigan, M., Thompson, D., & Parisien, M. (2019). Soil bacterial and fungal response to wildfires in the Canadian boreal forest across a burn severity gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107571>
- Willerding, A., Oliveira, L., Moreira, F., Germano, M., & Chagas, A. (2011). Lipase Activity among Bacteria Isolated from Amazonian Soils. *Enzyme Research*, 2011, 1–5. <https://doi.org/10.4061/2011/720194>
- Yasin, M., Ali, Y., Ahmad, K., Ghani, A., Amanat, K., Basheir, M., Faheem, M., Hussain, S., Ahmad, B., Hussain, A., & Bokhari, S. (2021). Alkaline lipase production by novel meso-tolerant psychrophilic *Exiguobacterium* sp. strain (AMBL-20) isolated from glacier of northeastern Pakistan. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1309–1320. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02133-1>
- Zhang, H., Jiang, Z., Xia, Q., & Zhou, D. (2021). Progress and perspective of enzyme immobilization on zeolite crystal materials. *Biochemical Engineering Journal*, 172, 108033. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108033>
- Zhu, Y. (2007). Immobilized Cell Fermentation for Production of Chemicals and Fuels. In *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 373–396). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50015-3>

## ANEXOS

### Anexo 1

#### *Análisis de las Actividades Enzimáticas de las Cepas Bacterianas*

a)

Código	UREASA	LIPASA	FOSFATASA	SULFATASA
	Screening 1 (+/-)	Screening 1 (+/-)	Screening 1 (+/-)	Screening 1 (+/-)
MA1	-	-	+	-
MA3	-	-	+	-
MA7	-	-	+	-
MA11	-	-	+	-
MA16	-	-	-	-
MA21	-	+	-	-
MA32	-	+	-	-
MA33	-	-	+	-
MA34	+	-	+	-
MA35	-	-	+	-
MA37	-	-	+	-
MA44	-	-	+	-
MA46	+	+	-	-
MA47	-	+	+	-
MA48	-	-	-	-
MA49	-	+	-	-
MA50	-	-	-	-
MA51	-	-	+	-
MA52	-	-	+	-
MA53	+	-	-	-
MA54	-	-	-	-
MA55	-	+	-	-
MA57	-	-	+	-
MA60	-	+	-	-
QA2	-	-	-	-
QA4	+	-	-	-
QA9	-	-	-	-
QA10	+	-	-	-
QA11	-	+	-	-
QA12	-	-	-	-
QA13	-	-	-	-
QA20	-	+	-	-
QA21	-	-	-	-
QA22	-	+	-	-
QA23	-	+	-	-

Nota: + presencia de actividad enzimática, (-) ausencia de actividad enzimática

b)

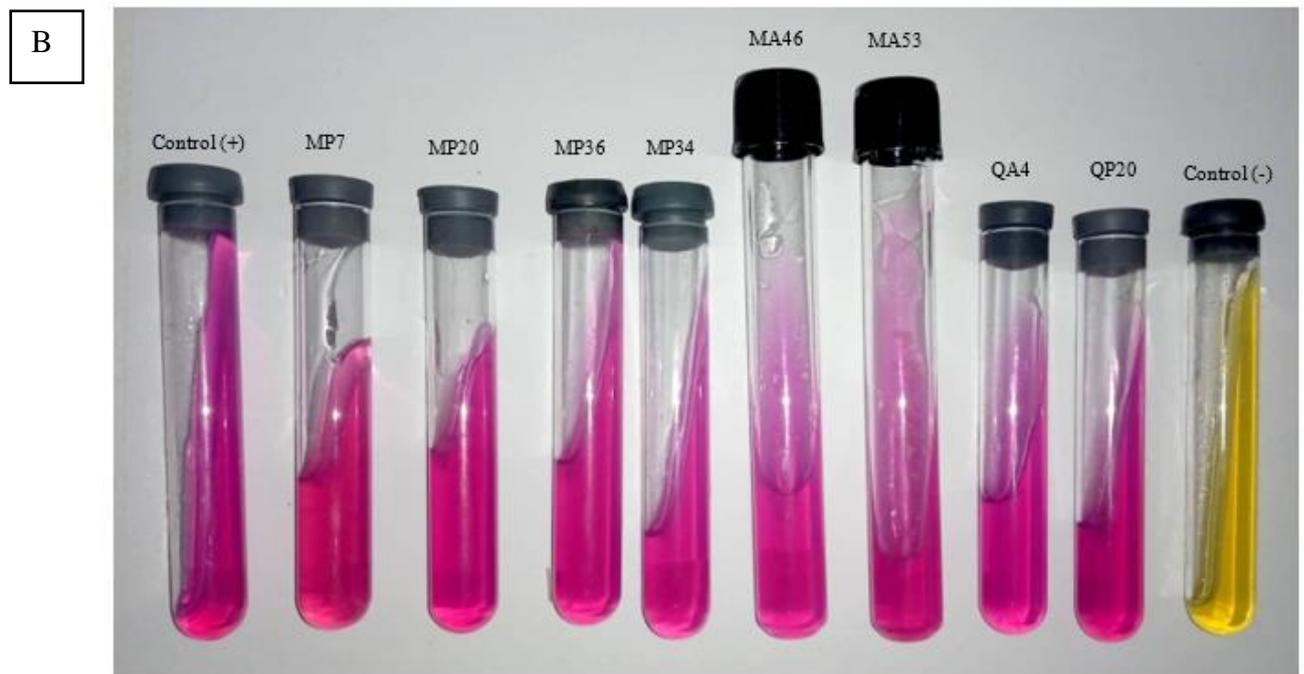
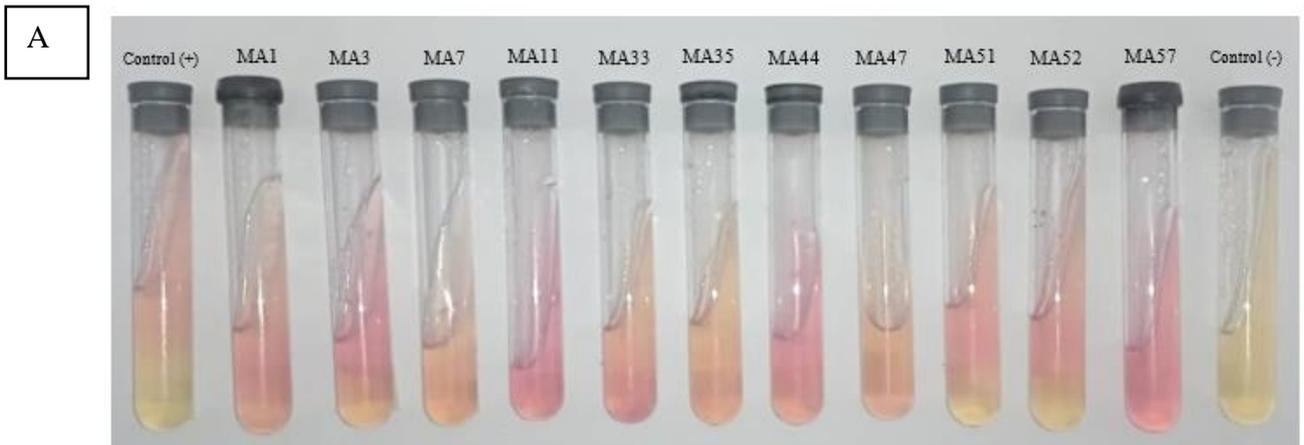
Código	UREASA	LIPASA	FOSFATASA	SULFATASA
	Screening 1 (+/-)	Screening 2 (+/-)	Screening 1 (+/-)	Screening 1 (+/-)
MP5	-	-	-	-
MP7	+	+	+	-
MP12	-	-	+	-
MP14	-	-	-	-
MP15	-	-	+	-
MP16	-	-	+	-
MP19	-	-	-	-
MP20	+	+	-	-
MP23	-	-	+	-
MP24	-	-	-	-
MP25	-	-	-	-
MP26	-	-	-	-
MP28	-	-	+	-
MP29	-	-	+	-
MP30	-	-	-	-
MP31	+	+	-	-
MP32	-	-	+	-
MP33	-	-	+	-
MP34	-	-	-	-
MP36	+	-	-	-
MP37	-	-	-	-
MP38	-	-	-	-
MP39	-	-	+	-
MP42	-	-	+	-
MP44	-	+	-	-
MP46	-	+	+	-
MP47	-	-	-	-
MP48	-	-	-	-
MP49	-	-	+	-
MP50	-	-	+	-
MP52	-	-	+	-
MP60	-	+	-	-
MP61	-	-	+	-
PseudoP1 3	-	-	+	-
QP2	-	-	+	-
QP4	-	-	-	-
QP5	-	-	+	-
QP8	-	-	+	-

QP10	-	-	-	-
QP20	+	+	-	-

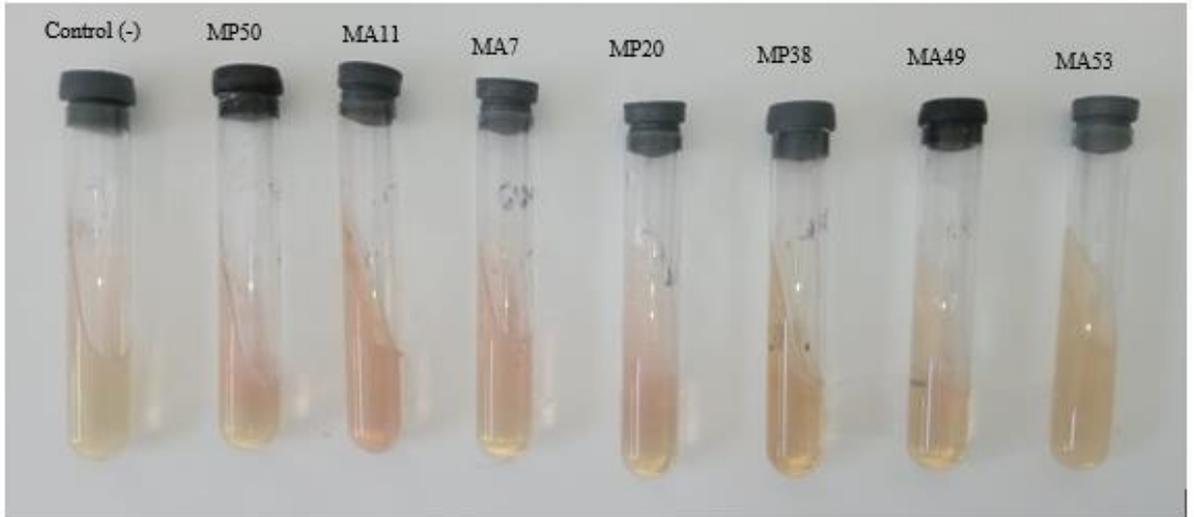
*Nota:* + presencia de actividad enzimática, (-) ausencia de actividad enzimática

b) **Anexo 2**

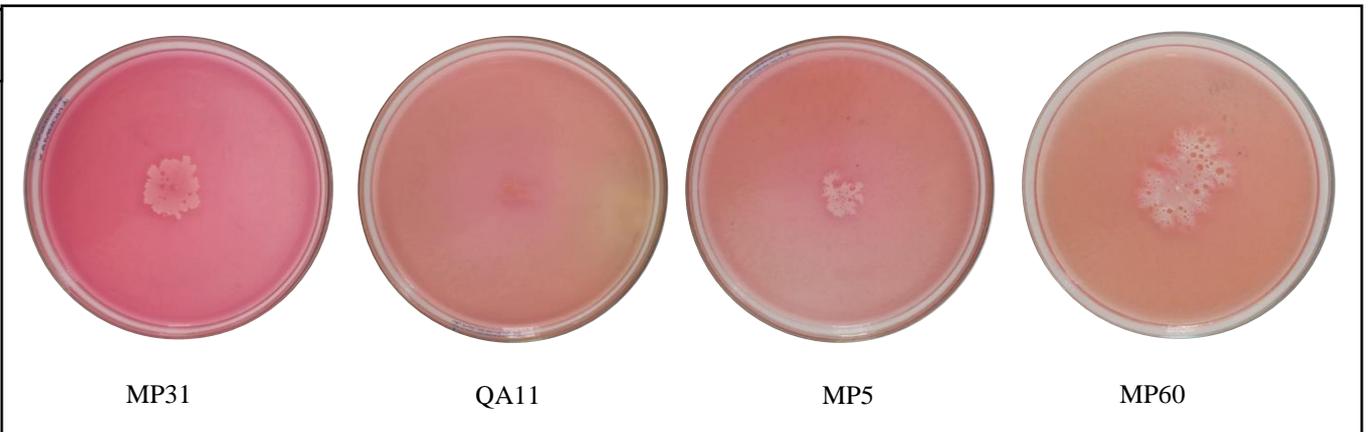
*Pruebas Enzimáticas de la Capacidad Hidrolítica de las Cepas Bacterianas*



C



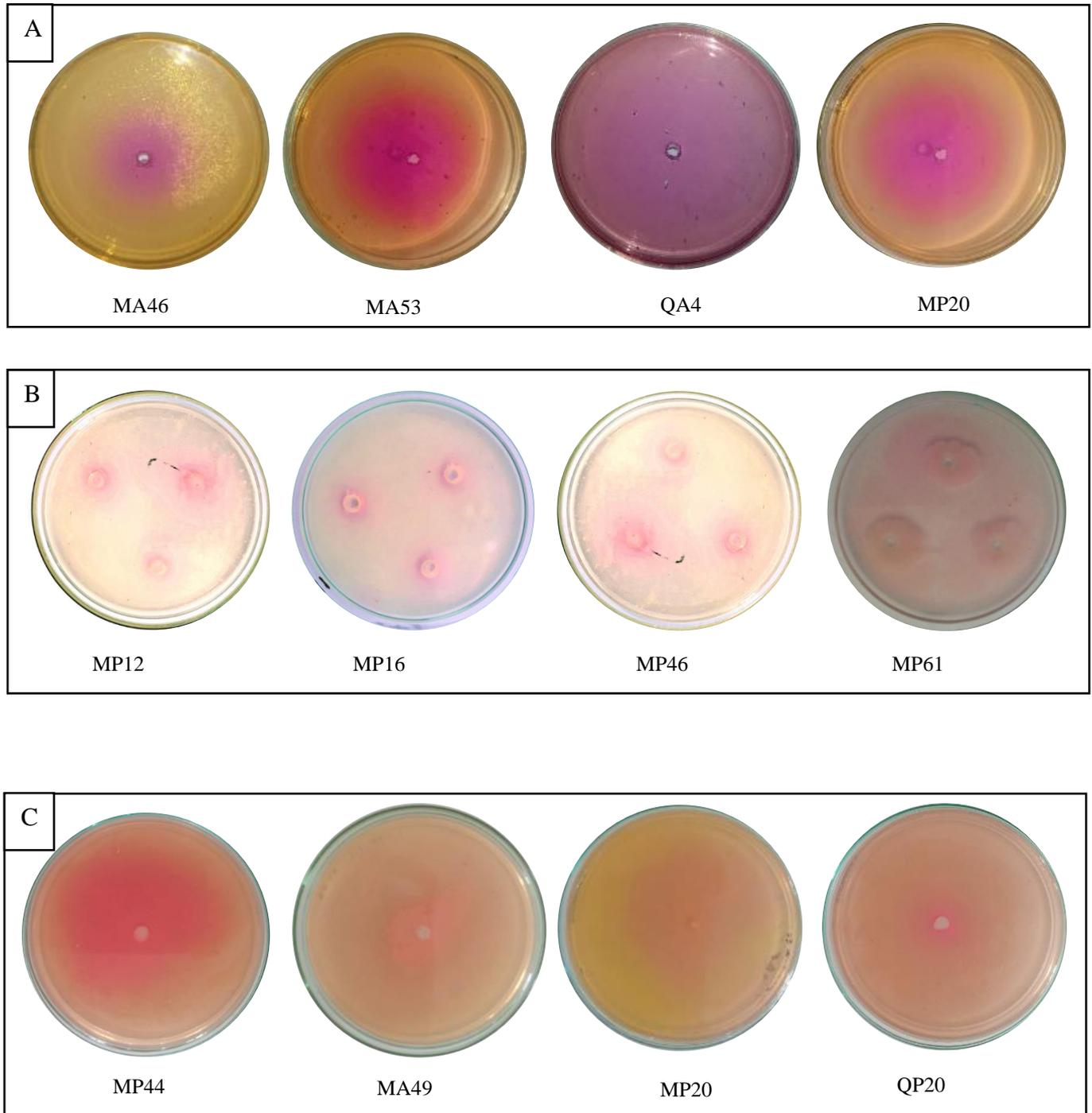
D



*Nota.* A. Prueba de actividad fosfatasa con hidróxido de sodio como indicador, B. Prueba de actividad ureasa, C. Prueba de actividad sulfatasa con Carbonato de Sodio como indicador y D. Prueba de actividad lipídica con rojo fenol como indicador. El cambio de tonalidad a rosado/fucsia/morado indica la presencia de la actividad.

### Anexo 3

#### Pruebas Enzimáticas del Halo de Hidrólisis de las Cepas con Mayor Actividad

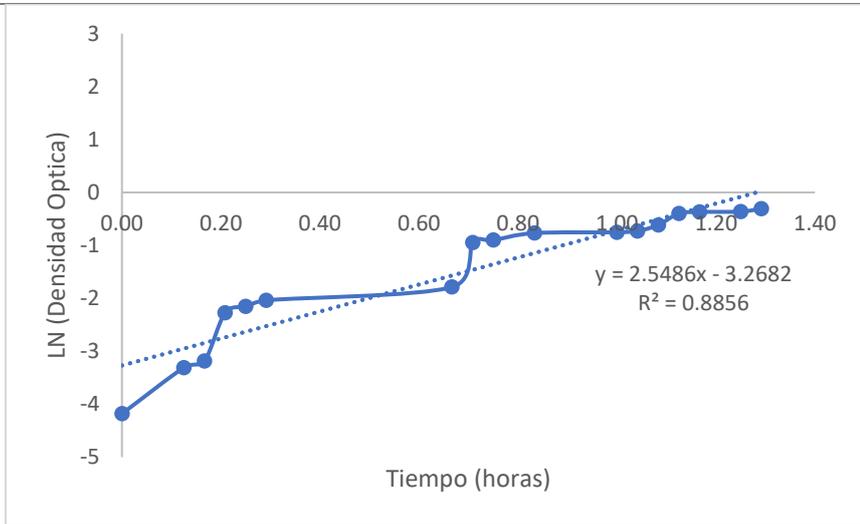


*Nota.* Prueba medición del halo de hidrólisis de la urea, B. Prueba medición del halo de hidrólisis del fosforo y C. Prueba de medición del halo de hidrólisis lipídica. El cambio de tonalidad a rosado/fucsia/morado indica la presencia de la actividad.

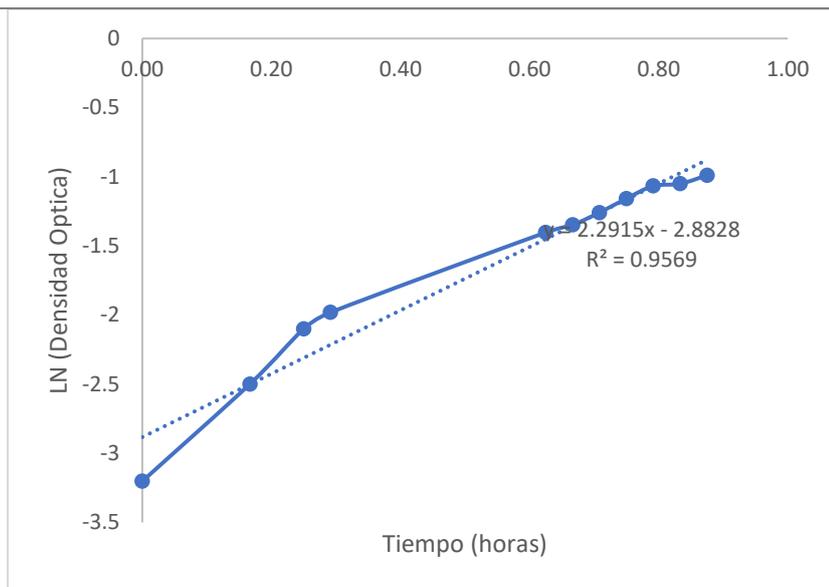
## Anexo 4

Grafico de la fase exponencial de crecimiento de las cepas bacterianas

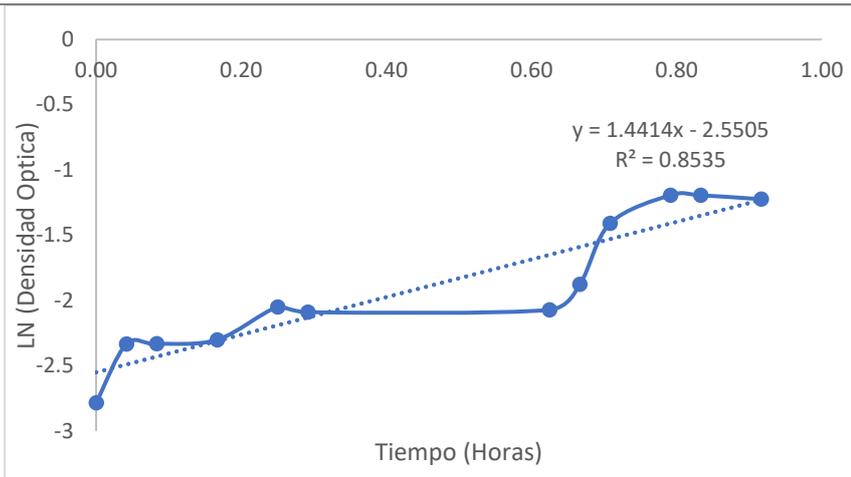
### MP7



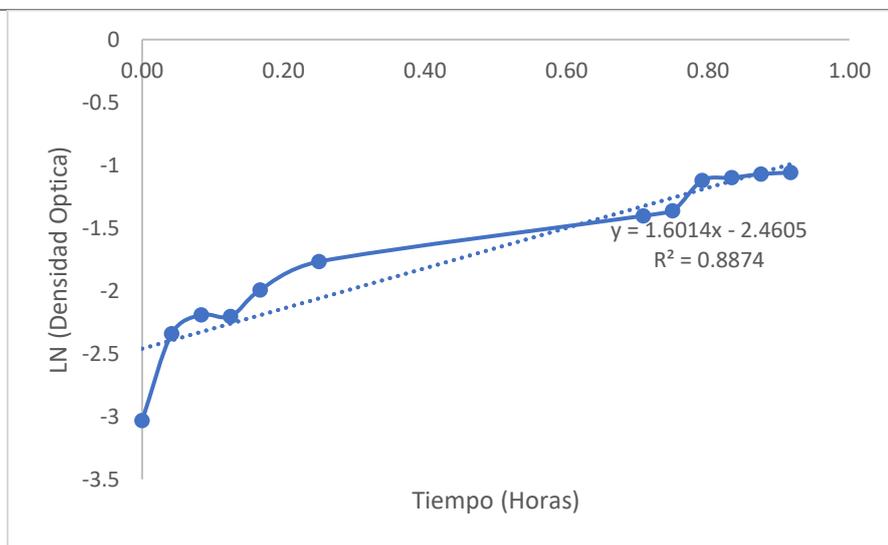
### MP20



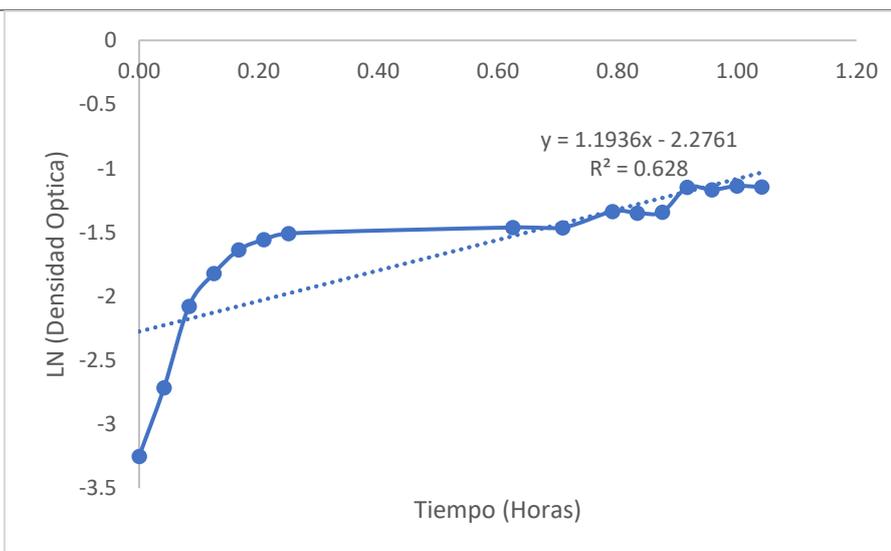
**QP20**



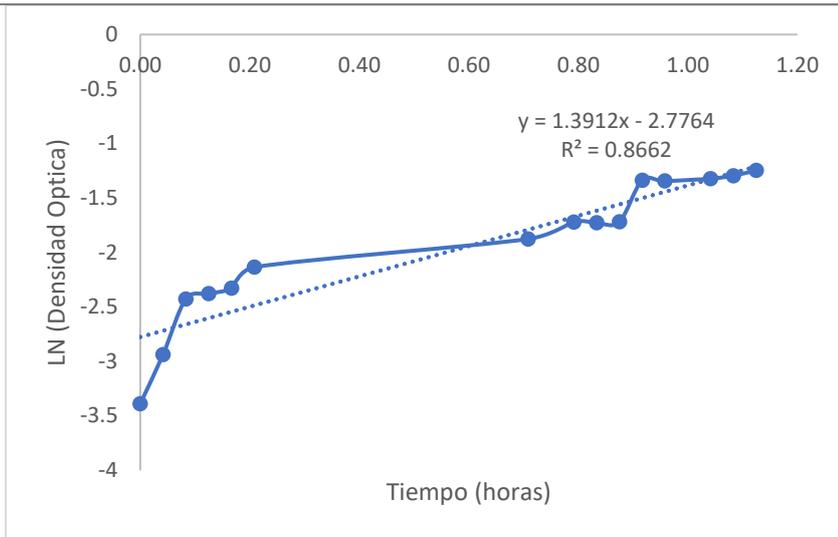
**MA46**



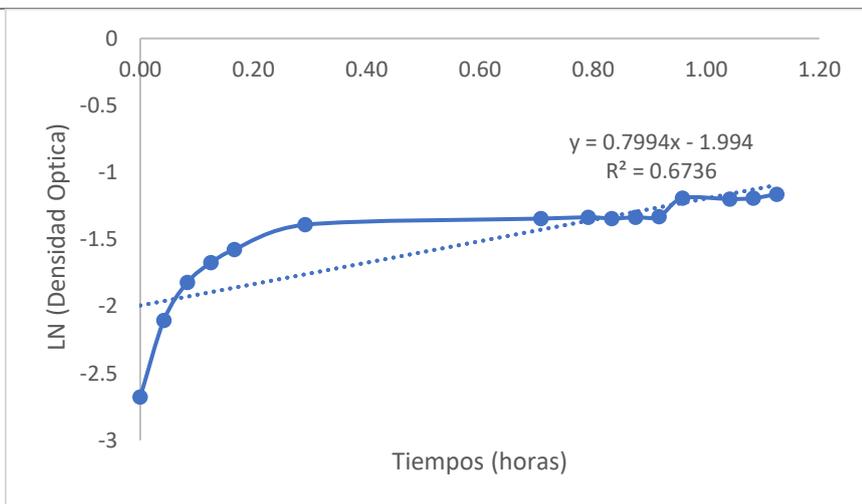
**MA7**



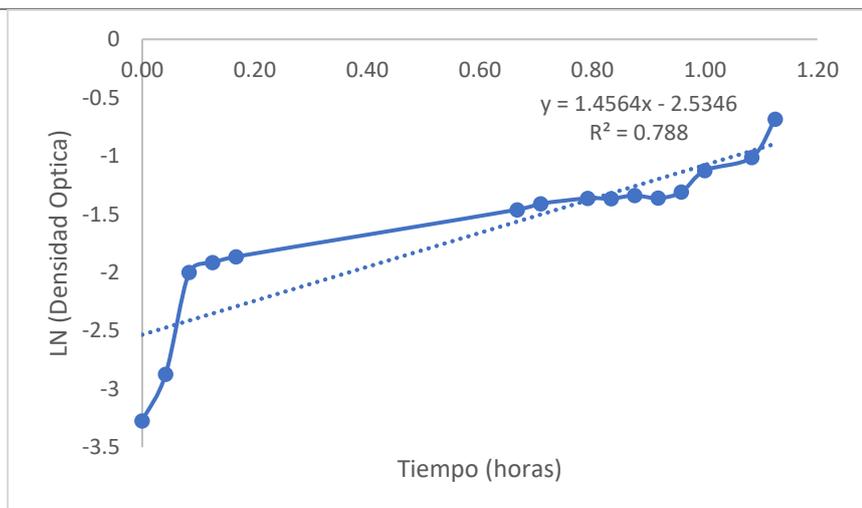
### QA4



### MA47

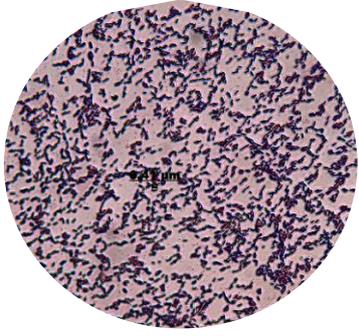
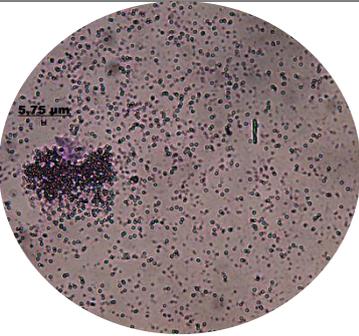
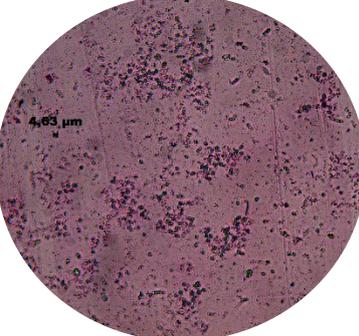


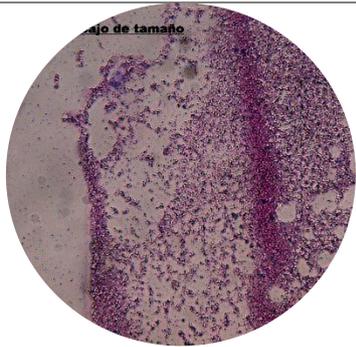
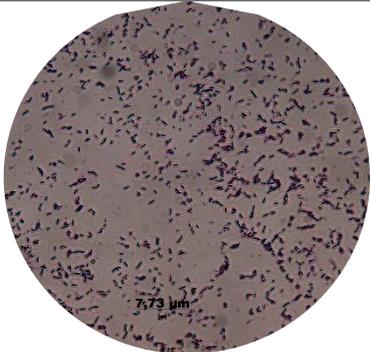
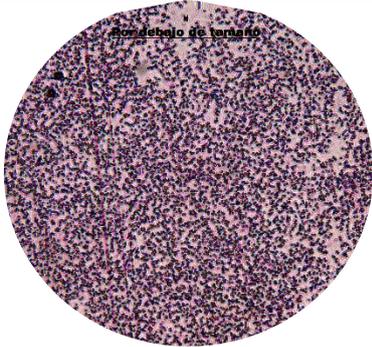
### MP46



## Anexo 5

### *Microscopia de Bacterias Seleccionadas para el Consorcio Inmovilizado en los Soportes, 40x*

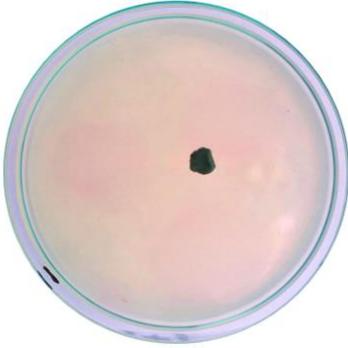
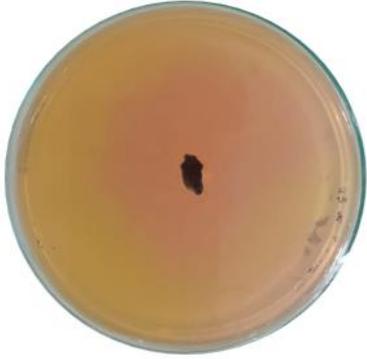
Código	Tinción	Tamaño	Microscopia
QA4	Gram positivas	6,41 $\mu\text{m}$	
MA7	Gram positivas	15,7 $\mu\text{m}$	
MA46	Gram positivas	5,75 $\mu\text{m}$	
MA47	Gram positivas	4,63 $\mu\text{m}$	

MP7	Gram negativas	Por debajo del tamaño <4,6 $\mu\text{m}$	
MP20	Gram negativas	7,73 $\mu\text{m}$	
MP46	Gram negativas	Por debajo del tamaño <4,6 $\mu\text{m}$	
QP20	Gram negativas	Por debajo del tamaño <4,6 $\mu\text{m}$	

*Nota.* Morfología de cultivos seleccionados con mejor actividad enzimática del conjunto bacteriano inicial observados en lente óptico 40,

## Anexo 6

### *Evaluación de la Actividad Enzimática del Consorcio Inmovilizado en los Soportes*

Actividad enzimática	Soporte	
	Zeolita	Cascara
Ureasa		
Fosfatasa		
Lipasa		

**Nota.** Los halos alrededor del sustrato con tonalidad rosa indican la presencia positiva de hidrólisis para los sustratos específicos para cada actividad.

NOMBRE DEL TRABAJO

**QUIROZ ROSARIO- escrito final V2.docx**

AUTOR

**ROSARIO QUIROZ**

RECUENTO DE PALABRAS

**18072 Words**

RECUENTO DE CARACTERES

**103906 Characters**

RECUENTO DE PÁGINAS

**86 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**10.5MB**

FECHA DE ENTREGA

**Jul 23, 2024 11:07 PM GMT-5**

FECHA DEL INFORME

**Jul 23, 2024 11:09 PM GMT-5**

### ● 10% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 9% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 6% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

### ● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Fuentes excluidas manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)
- Bloques de texto excluidos manualmente