



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

---

**DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS  
POR ACTINOMICETES ACIDOFÍLICOS**

---

*Trabajo de Investigación (Graduación). Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI). Presentado como Requisito Previo a la Obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.*

**AUTOR:** Diana Carolina Tipán Guijarro

**TUTOR:** Dr. Carlos Rodríguez

**Ambato – Ecuador**

**2012**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Dr. Carlos Rodríguez, PhD

Siendo el Tutor del Trabajo de Investigación realizado bajo el tema: “Determinación de la producción de antibióticos por actinomicetes acidofílicos.”, por la egresada Diana Carolina Tipán Guijarro; tengo a bien afirmar que el estudio es idóneo y reúne los requisitos de una tesis de grado de Ingeniería en Bioquímica; y el graduando posee los méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Jurado Examinador que sea designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato, Marzo del 2012

.....  
Dr. Carlos Rodríguez, PhD

TUTOR

## AUTORÍA

Los criterios emitidos en el trabajo de investigación denominado: “Determinación de la producción de antibióticos por actinomicetes acidofílicos.”, así como también los contenidos, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones, corresponden exclusivamente a Diana Carolina Tipán Guijarro; y, Dr. Carlos Rodríguez, PhD.; Tutor del Proyecto de Investigación.

.....  
Diana Carolina Tipán Guijarro

AUTOR

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO  
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS  
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Marzo de 2012

Para constancia firman:

---

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## **Dedicatoria**

*A Dios por regalarme la oportunidad y la dicha de la vida, al brindarme los medios necesarios para formarme profesionalmente, y siendo un apoyo incondicional para lograrlo ya que sin él no hubiera podido.*

*A mis padres por su gran amor, por ser mi apoyo incondicional, por hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos y enseñanzas. De manera especial a mi Madre, que es la luz que me acompaña cada día y el motor que me impulsa a seguir adelante.*

*A mi Abue Gonzalo que ya partió a la presencia del Altísimo, dedicarle este presente documento quien permanentemente me apoyo con su espíritu alentador, contribuyendo incondicionalmente a lograr mis metas y objetivos propuestos y brindarme con su ejemplo a ser perseverante y darme la fuerza que me impulsó a conseguirlo.*

## **AGRADECIMIENTO**

*Cuando se hace algo en la vida se convierte en un reto personal más que en cualquier tipo de meta culminada, la satisfacción que se siente es infinita, y aprovecho este espacio para hacerles partícipes de esta alegría y agradecerles a todas las personas que recorrieron este largo camino cerca de mí. A quienes vieron la transición de la Diana que comenzó a la que terminó.*

*Sin ti nada hubiese sido posible gracias por la vida, por la oportunidad y por hacer de mí la mujer que hoy soy mi Dios a quien todo le debo. A mi Familia por ser el motor constante que ha motivado todo el tiempo a continuar con mi profesión; y quienes siempre han creído en mí con esa fe ciega en lo que hago, sus oraciones han sido mi gran fortaleza.*

*A mi padre Luis Armando y mi madre Germany, por tantas noches de desvelo, por tantos días de oración que dedicaron a mi cuidado. Su perseverancia, sacrificio, dulzura y tenacidad para sacar adelante a sus 4 hijas han sido el mejor ejemplo que hoy me dejan.*

*A mis queridas hermanas Mary, Stefy y mi Beba que supieron ayudarme, aconsejarme y acolítarme en cada una de mis locuras. Con las que eh compartido el día a día y que juntas aprendimos a disfrutar de las grandes y pequeñas cosas de la vida.*

*A Edu, por ser mi apoyo sentimental, mi confidente, mi cómplice, mi amigo y mi fortaleza todo este tiempo. Por darme fuerzas para seguir adelante en todo momento y jamás darme por vencida.*

*A la Universidad Técnica de Ambato de manera especial a mi querida Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Bioquímica.*

*A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - Facultad de Recursos Naturales de manera especial a todos los que conforman el Departamento de Ciencias Biológicas el Ing. Raúl Camacho por su invaluable cooperación a quien admiro por tener la paciencia de un buen maestro.*

*Al Ing. Rigoberto Mancheno y a la Ing. Anita Cunachi mis queridos compañeros de laboratorio por sus buenos consejos y explicaciones cuando los necesite por ser más que compañeros unos excelentes amigos y confidentes dándome la oportunidad de trabajar a su lado.*

*Al Dr. Carlos Rodríguez quien me brindo la oportunidad de vincularme al equipo de investigación, por enseñarme ese mundo tan amplio, variable pero a la vez fluido y ameno de la Microbiología, gracias por la dirección de la tesis y por cada una de sus enseñanzas.*

*A cada uno de mis profesores que compartieron no solo sus conocimientos y enseñanzas, sino su sabiduría dándome una gran lección al inculcarme que un buen profesional no es el que más títulos consigue sino aquel que además de enriquecer su mente fortalece y enriquece su alma, cuerpo y espíritu.*

*A mis grandes amigos y compañeros Mony, Ricardo, Axel, Gabriel, Manuel y Gabby con los cuales compartí experiencias, tristezas, alegrías y tantas aventuras de un diario vivir en la Universidad; de manera especial quiero agradecer a Mony Neira por esa amistad de principio a fin, una amiga incondicional por escucharme, darme su paciencia y sus sabios consejos.*

*Gracias a Todos.*

# INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

## A. PAGINAS PRELIMINARES

|                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| Tema de Investigación                | i    |
| Aprobación del Tutor                 | ii   |
| Autoría                              | iii  |
| Aprobación del Tribunal de Grado     | iv   |
| Dedicatoria                          | v    |
| Agradecimiento                       | vi   |
| Índice general de contenidos         | viii |
| Índice de tablas, gráficos y figuras | xv   |
| Resumen                              | xix  |
| Summary                              | xxi  |

## B. TEXTO

### CAPITULO I

#### EL PROBLEMA DE INVESTIGACION

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| 1.1 Tema de Investigación      | 1 |
| 1.2 Planteamiento del problema | 1 |
| 1.2.1 Contextualización        | 1 |
| 1.2.2 Análisis crítico         | 3 |
| 1.2.3 Prognosis                | 3 |
| 1.2.4 Formulación del problema | 4 |
| 1.2.5 Interrogantes            | 4 |
| 1.2.6 Delimitación             | 4 |
| 1.3 Justificación              | 4 |



|   |    |
|---|----|
| 1.4 Objetivos   | 5  |
| 1.4.1 Objetivo General  | 5  |
| 1.4.2 Objetivos Específicos   | 5  |
| <b>CAPITULO II</b>  |    |
| <b>MARCO TEORICO</b>  |    |
| 2.1 Antecedentes Investigativos                                     | 6  |
| 2.1.7.1 Coeficientes utilizados para determinar similaridad         | 15 |
| 2.1.1 Generalidades de los Actinomicetes                            | 6  |
| 2.1.2 Metabolismo de Actinomicetes                                  | 7  |
| 2.1.2.1 Metabolismo Primario  | 7  |
| 2.1.2.2 Metabolismo Secundario                                      | 7  |
| 2.1.3 Morfología de los Actinomicetes                               | 9  |
| 2.1.3.1 Hifas   | 9  |
| 2.1.3.2 Esporas   | 10 |
| 2.1.4 Ecología y distribución de los actinomicetes en la naturaleza | 10 |
| 2.1.4.1 Ecosistema terrestres                                       | 10 |
| 2.1.4.2 Ecosistema marinos  | 11 |
| 2.1.4.3 Ecosistemas de altas temperatura                            | 11 |
| 2.1.4.4 Ecosistemas ácidos  | 11 |
| 2.1.5 Cultivo in vitro de Actinomicetes                             | 12 |
| 2.1.5.1 Aislamiento Selectivo de Actinomices                        | 12 |
| 2.1.5.2 Aislamiento Selectivo de Actinomices Acidofilicos           | 13 |
| 2.1.5.3 Conservación de las Cepas de Actinomicetes                  | 13 |
| 2.1.6 Importancia de los Actinomicetes en Biotecnología             | 14 |
| 2.1.6.1 Antibióticos  | 14 |
| 2.1.7 Taxonomía Numérica  | 15 |

|                     |  |    |
|---------------------|--|----|
| 2.1.7.1             | Coeficientes utilizados para determinar similaridad      | 15 |
| 2.1.7.2             | Coeficiente de Asociación                                | 16 |
| 2.1.7.3             | Coeficiente de Concordancia Simple                       | 16 |
| 2.1.7.4             | Coeficiente de Jaccard                                   | 17 |
| 2.1.8               | Principales Grupos de Actinomicetes                      | 17 |
| 2.1.8.1             | <i>Streptacidiphilus</i>                                 | 17 |
| 2.1.9               | Antagonismo Microbiano                                   | 18 |
| 2.1.9.1             | Determinación Mediante Cilindros de Agar                 | 18 |
| 2.1.9.2             | Dilución en Medio Sólido                                 | 19 |
| 2.1.9.3             | Difusión en Disco  | 19 |
| 2.1.10              | Tipos de Inhibición                                      | 19 |
| 2.1.10.1            | Inhibición de crecimiento                                | 19 |
| 2.1.10.2            | Inhibición del crecimiento en forma irregular            | 19 |
| 2.1.10.3            | No inhibición del crecimiento                            | 19 |
| 2.1.10.4            | Factores que influyen el tamaño de la zona de inhibición | 20 |
| 2.2                 | Fundamentación Filosófica                                | 20 |
| 2.3                 | Fundamentación Legal                                     | 20 |
| 2.4                 | Categorías Fundamentales                                 | 21 |
| 2.4.2.1             | Variables Dependientes                                   | 22 |
| 2.4.2.2             | Variables Independientes                                 | 22 |
| 2.5                 | Hipótesis  | 23 |
| 2.5.1               | Hipótesis nula   | 23 |
| 2.5.2               | Hipótesis alternante                                     | 23 |
| 2.6                 | Señalamiento de variables                                | 23 |
| <b>CAPITULO III</b> |  |    |
| <b>METODOLOGIA</b>  |  |    |
| 3.1                 | Enfoque  | 24 |

|   |    |
|---|----|
| 3.2 Modalidad básica de la investigación  | 24 |
| 3.3 Nivel o tipo de investigación   | 24 |
| 3.4 Población y muestra   | 24 |
| 3.5 Operalización de Variables  | 24 |
| 3.6 Plan de Recolección de la Información   | 25 |
| 3.6.1 Caracterización físico-química de las muestras                                    | 25 |
| 3.6.1.1 Determinación de pH   | 25 |
| 3.6.1.1 Determinación del porcentaje de humedad   | 25 |
| 3.6.1.1 Determinación del porcentaje materia orgánica                                   | 25 |
| 3.6.2 Determinación de la población de actinomicetes acidofílicos                       | 27 |
| 3.6.3 Aislamiento y purificación de actinomicetes acidofílicos                          | 28 |
| 3.6.4 Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de actinomicetes acidofílicos | 28 |
| 3.6.5 Caracterización Macroscópica  | 28 |
| 3.6.6 Caracterización Microscópica  | 29 |
| 3.6.7 Pruebas Fenotípicas   | 29 |
| 3.6.7.1 Rango del crecimiento en función de la Temperatura                              | 29 |
| 3.6.7.2 Rango del crecimiento en función del pH   | 30 |
| 3.6.7.3 Aminoácidos como fuentes de Carbono y Nitrógeno                                 | 30 |
| 3.6.8 Determinación de la Actividad Antimicrobiana                                      | 30 |
| 3.6.8.1 Selección y Preparación de los cultivos de actinomicetes                        | 30 |
| 3.6.8.2 Preparación de los platos con los microorganismos modelo                        | 31 |
| 3.6.8.2 Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica             | 31 |
| 3.7 Plan de procesamiento de la información   | 31 |
| 3.7.1 Población y diversidad de actinomicetes   | 31 |
| 3.7.2 Taxonomía Numérica de Datos Fenotípicos   | 33 |
| 3.7.3 Determinación de la Actividad Antimicrobiana                                      | 33 |

## **CAPITULO IV**

### **ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS**

|  |    |
|--|----|
| 4.1 Análisis de los resultado  | 35 |
| 4.1.1 Recolección de Información   | 35 |
| 4.1.1.1 Características físico-químicas de las muestras  | 35 |
| 4.1.2 Determinación de la población de actinomicetes acidofílicos                                      | 35 |
| 4.1.2.1 Aislamiento y Purificación de actinomicetes acidofílicos                                       | 37 |
| 4.1.2.2 Almacenamiento conservación y codificación de los cultivos puros de actinomicetes acidofílicos | 37 |
| 4.1.3 Caracterización Fenotípica   | 37 |
| 4.1.3.1 Caracterización Macroscópica   | 37 |
| 4.1.3.2 Caracterización Microscópica   | 37 |
| 4.1.3.3 Rango de crecimiento en función de la Temperatura  | 37 |
| 4.1.3.4 Rango de crecimiento en función del pH   | 38 |
| 4.1.3.5 Determinación del uso de diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno                             | 38 |
| 4.1.3.6 Taxonomía numérica de datos fenotípicos  | 38 |
| 4.1.4 Determinación de la Actividad Antimicrobiana   | 38 |
| 4.1.4.1 Actividad en contra de la Bacteria Gram negativa (G-)  | 38 |
| 4.1.4.2 Actividad en contra de la Bacteria Gram positiva (G+)  | 39 |
| 4.1.4.3 Actividad en contra de Fusarium  | 39 |
| 4.1.4.4 Actividad en contra de Botrytis  | 39 |
| 4.2 Interpretación de Datos  | 40 |
| 4.2.1 Determinación de la población de actinomicetes acidofílicos                                      | 40 |
| 4.2.2 Caracterización Fenotípica   | 40 |
| 4.2.3 Taxonomía numérica de datos fenotípica   | 41 |
| 4.2.4 Determinación de la actividad antimicrobiana   | 42 |
| 4.2.5 Discusión general del trabajo investigativo  | 42 |

|   |    |
|---|----|
| 4.3 Verificación de Hipótesis           | 44 |
| 4.3.1 Hipótesis Nula                    | 44 |
| 4.3.2 Hipótesis Alternante              | 45 |
| <br>                                    |    |
| <b>CAPITULO V</b>                       |    |
| <b>CONCLUSIONES Y RECOMEDACIONES</b>    |    |
| 5.1 Conclusiones                        | 46 |
| 5.2 Recomendaciones                     | 47 |
| <br>                                    |    |
| <b>CAPITULO VI</b>                      |    |
| <b>PROPUESTA</b>                        |    |
| 6.1 Datos informativos                  | 48 |
| 6.1.1 Título                            | 48 |
| 6.1.2 Institución ejecutiva             | 48 |
| 6.1.3 Beneficiarios                     | 48 |
| 6.1.4 Ubicación                         | 48 |
| 6.1.5 Tiempo estimado para la ejecución | 48 |
| 6.1.6 Equipo técnico responsable        | 48 |
| 6.2 Antecedentes de la propuesta        | 48 |
| 6.3 Justificación                       | 49 |
| 6.4 Objetivos                           | 49 |
| 6.4.1 Objetivo General                  | 49 |
| 6.4.2 Objetivo Específico               | 49 |
| 6.5 Análisis de factibilidad            | 50 |
| 6.6 Fundamentación                      | 50 |
| 6.7 Metodología                         | 50 |
| 6.7.1 Población y Muestra               | 50 |

|   |    |
|---|----|
| 6.7.2 Plan de Recolección de la Información               | 50 |
| 6.7.2.1 Caracterización físico-química de las muestras    | 51 |
| 6.7.2.2 Determinación del pH                              | 51 |
| 6.7.2.3 Determinación del porcentaje de humedad           | 51 |
| 6.7.2.4 Determinación del porcentaje de materia orgánica  | 51 |
| 6.7.5 Determinación de la población de actinomicetes      | 52 |
| 6.7.6 Aislamiento y purificación de actinomicetes         | 53 |
| 6.7.7 Almacenamiento y conservación de actinomicetes      | 53 |
| 6.7.8 Caracterización Fenotípica                          | 53 |
| 6.7.8.1 Caracterización Macroscópica                      | 53 |
| 6.7.8.2 Caracterización Microscópica                      | 54 |
| 6.7.8.3 Rango de Crecimiento en función de la Temperatura | 54 |
| 6.7.8.4 Rango de Crecimiento en función del pH            | 54 |
| 6.7.8.5 Aminoácidos como Fuente de Carbono y Nitrógeno    | 54 |
| 6.7.8.6 Análisis de Datos Fenotípicos                     | 54 |
| 6.8 Administración  | 56 |
| 6.9 Previsión de la evaluación                            | 57 |

## **C. MATERIALES DE REFERENCIA**

Bibliografía

Anexos

## INDICE DE TABLAS

### ANEXO A. TABLAS DE RESULTADOS

Tabla A1. Características Físico-Químicas de los Suelos.

Tabla A2. Número de colonias de bacterias (dilución 1/10<sup>3</sup>).

Tabla A3. Número de colonias de actinomicetes (dilución 1/10<sup>3</sup>).

Tabla A4. Número de colonias diferentes de actinomicetes (dilución 1/10<sup>3</sup>).

Tabla A5. Porcentaje de actinomicetes (dilución 1/10<sup>3</sup>).

Tabla A6. Número de ufc de bacterias por gramo de suelo seco (ufc/g suelo seco).

Tabla A7. Número de ufc de actinomicetes por gramo de suelo seco (ufc/g suelo seco).

Tabla A8. Aislamiento de Actinomicetes Acidofílicos.

Tabla A9. Almacenamiento conservación y codificación de los cultivos puros de actinomicetes acidofílicos.

Tabla A10. Caracterización Macroscópica.

Tabla A11. Caracterización Microscópica.

Tabla A12. Matriz de datos fenotípicos.

Tabla A13. Grupos-especie basados en el 90% de similitud de datos fenotípicos (dendrograma).

Tabla A14. Actinomicetes que no presentaron actividad antimicrobiana.

Tabla A15. Actinomicetes que presentaron actividad antimicrobiana.

Tabla A16. Diámetros de inhibición en mm frente a la Bacteria gran positiva (G-).

Tabla A17. Diámetros de inhibición en mm frente a la Bacteria gran positiva (G+).

Tabla A18. Diámetros de inhibición en mm frente a *Fusarium*.

Tabla A19. Diámetros de inhibición en mm frente a *Botrytis*.

## ANEXO B. ANALISIS ESTADISTICOS

Tabla B1. Análisis de varianza para el número de ufc de bacterias por gramo de suelo seco (ufc/g).

Tabla B2. Separación de medias para el número de bacterias por gramo de suelo seco por sitio de recolección.

Tabla B3. Separación de medias para el número de bacterias por gramo de suelo seco de la interacción A x B

Tabla B4. Análisis de varianza para el número de ufc de actinomicetes por gramo de suelo seco (ufc/g)

Tabla B5. Separación de medias para el número de actinomicetes por gramo de suelo seco por sitio de recolección.

Tabla B6. Separación de medias para el número de actinomicetes por gramo de suelo seco de la interacción A x B.

Tabla B7. Análisis de varianza para el porcentaje actinomicetes

Tabla B8. Separación de medias para el porcentaje de actinomicetes por sitio de recolección.

Tabla B9. Separación de medias para el porcentaje de actinomicetes de la interacción A x B.

Tabla 10. Análisis de varianza para la diversidad de actinomicetes

Tabla B11. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram Negativa.

Tabla B12. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram Negativa.

Tabla B13. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram Positiva.

Tabla B14. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram Positiva.

Tabla B15. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium*.

Tabla B16. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium*.

Tabla B17. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis*.

Tabla B18. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis*.



## **ANEXO C GRAFICOS**

Figura C1. Aislamiento y purificación de actinomicetes acidofílicos

Figura C2. Caracterización microscópica

Figura C3. Rango de Crecimiento en Función de la Temperatura

Figura C4. Crecimiento en Función del pH

Figura C5. Crecimiento en diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno

Figura C6. Dendrograma

Figura C7. Formación de Grupos - Especie

Figura C8. Tipos de actividad de los metabolitos secundarios producidos por actinomicetes

## **ANEXO D. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES**

Medios de Cultivo

Buffers

## **ANEXO E. FOTOFRAFIAS**

Aislamiento de Actinomicetes Acidofílicos

Recolección de Suelos

Dilución 1/100

Dilución 1/1000

Dilución 1/10000

Purificación de Actinomicetes Acidofílicos

Pruebas Fenotípicas

Caracterización Macroscópica

Crecimiento en Función de la Temperatura

Crecimiento en Función del pH

Uso de Diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno

Antagonismo Microbiano

## **ANEXO F. TABLA DE COLORES**

British Standard Specification for colours for identification, coding and special purposes.

## RESUMEN

Los actinomicetes son bacterias gram positivas que poseen un ADN rico en guanina - citosina, se caracterizan por presentar un crecimiento filamentosos en forma de hifas, muy similares a las de los hongos, pero su naturaleza procariote hace que claramente sean considerados como bacterias. Las hifas que pueden subsistir como micelio estable o que pueden quebrarse en elementos bacilares o cocoides. La propiedad más importante de los actinomicetes es su habilidad para producir metabolitos secundarios incluyendo antibióticos y compuestos bioactivos. Los actinomicetes están ampliamente distribuidos en el suelo, agua y otros ambientes naturales. Sin embargo la población y tipos de actinomicetes en un ecosistema están determinados por numerosos factores físicos, químicos y biológicos.

En la presente investigación a partir de muestras de suelo se obtuvieron 207 aislamientos puros de actinomicetes de cuatro tipos diferentes de ecosistemas, San Francisco (Trópico Seco), Cotopaxi (Páramo), Tosagua (Trópico húmedo) y Misahualli (Subtropical húmedo). En la caracterización Físico-Química el suelo que presentó mayor acidez fue el suelo de San Francisco con un pH de 4.8, mientras que los suelos de Misahualli y Cotopaxi presentaron pHs de 5.4 en el primer caso y 5.9 en el segundo, el único suelo que presentó un valor neutro fue el suelo de Tosagua con un pH de 7.2.

En la base del análisis estadístico se encontró que los mejores resultados para el número total de actinomicetes fue calculada para la muestra de suelo correspondiente a Tosagua ( $1.06 \times 10^7$  ufc/g), mientras que el porcentaje mayor de actinomicetes fue obtenido para la muestra de suelo correspondiente a Cotopaxi (70.32%), en el caso de la diversidad de actinomicetes no se encontró diferencias significativas en los diferentes suelos, sin embargo en las tablas de resultados podemos visualizar que la mayor diversidad de actinomicetes presentó el suelo perteneciente a San Francisco. En todos los estudios realizados el medio glucosa extracto de malta y levadura (GYM) fue el que permitió el mayor número total de actinomicetes, el mayor porcentaje y la mayor diversidad.

Se realizaron pruebas de actividad metabólica como la caracterización macroscópica lo que permitió obtener sesenta y nueve grupos de color. A partir de estos se escogieron 98 actinomicetes representantes de cada uno de los grupos, para continuar con todas las pruebas fenotípicas tales como caracterización microscópica, rangos de crecimiento en diferentes pHs y temperaturas, y la utilización de diferentes aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno. Este procedimiento permitió formar una matriz binaria para caracterizar numéricamente los aislamientos utilizando el coeficiente simple de similaridad. El punto de corte de la similaridad de grupo fue del 90%, obteniendo así 22 grupos-especie.

En la última etapa de la investigación se realizaron las pruebas de antagonismo frente a una bacteria Gram positiva, Gram negativa y dos hongos *Fusarium* y *Botrytis*, los cuales presentaron una gran capacidad para producir antibióticos, la mayoría de actinomicetes presentaron actividad

específica en contra de un microorganismo o dos siendo estos anti-Botrytis, anti-Fusarium, anti Gram-, anti Gram+, Bactericida, Fungicida y de otros tipos.

## SUMMARY

The actinomycetes are gram positive bacteria possess a DNA rich in guanine - cytosine, are characterized by filamentous growth as hyphae, very similar to those of fungi, but its nature makes prokaryote clearly be considered as bacteria. The hyphae that can exist as stable or mycelium can break bacillary or coccoid elements. The most important property of actinomycetes is their ability to produce secondary metabolites including antibiotics and bioactive compounds. The actinomycetes are widely distributed in soil, water and other natural environments. However, the types of actinomycetes population in an ecosystem are determined by numerous physical, chemical and biological agents.

In the present investigation from soil samples were obtained 207 pure isolates of actinomycetes from four different types of ecosystems, San Francisco (Dry Tropics), Cotopaxi (Paramo) Tosagua (wet tropics) and Misahualli (subtropical humid). The physico-chemical characterization showed higher soil acidity was the floor of San Francisco with a pH of 4.8, while the soils of Misahualli and Cotopaxi showed pHs of 5.4 in the first case and 5.9 in the second, the only soil showed a neutral value was Tosagua soil with a pH of 7.2.

On the basis of statistical analysis found that the best results for the total number of actinomycetes was calculated for the soil sample for Tosagua ( $1.06 \times 10^7$  ufc/g), while the highest percentage of actinomycetes was obtained for the sample of ground for Cotopaxi (70.32%) in the event of diversity of actinomycetes found no significant differences in the different soils, but in the results tables we can see that the greatest diversity of soil actinomycetes belonging presented to San Francisco. In all studies environmental glucose and yeast malt extract (GYM) was the one that allowed the highest total number of actinomycetes, the highest percentage and the greatest diversity.

Tests were performed to characterize metabolic activity such as making way for macroscopic sixty-nine color groups. From these 98 actinomycetes were chosen representatives from each group to continue with all phenotypic tests such as microscopic characterization, rates of growth in different pHs and temperatures, and the use of different amino acids as carbon and nitrogen source. This procedure allowed to form a binary matrix to characterize the isolates numerically using the simple coefficient of similarity. The cutoff of the similarity group was 90%, gaining 22 species groups.

In the last stage of the investigation were tested for antagonism against Gram positive bacteria, Gram negative and two fungi Fusarium and Botrytis, which showed a great capacity to produce antibiotics, most actinomycetes showed specific activity against a these being micro or two anti-Botrytis, anti Fusarium, anti Gram-, anti Gram+, bactericides, fungicides and other types.

# CAPITULO I

## EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACION

### 1.1 Tema de Investigación

Determinación de la producción de antibióticos por actinomicetes acidofílicos.

### 1.2 Planteamiento del problema

#### 1.2.1. Contextualización

##### 1.2.1.1. Macro

Los actinomicetes son un grupo de bacterias Gram positivas, filamentosas, con un alto contenido de guanina – citosina en su ADN, y formadores de esporas. Tienen diversa morfología macroscópica y microscópica que les ha permitido colonizar la gran mayoría de medioambientes terrestres. Son considerados como organismos de transición entre las bacterias y hongos, debido a que forman hifas, micelio y esporas. Sin embargo, las características celulares procariotes los ubica claramente dentro de las bacterias (Pelczar *et al.*, 1982).

En muchos casos, los actinomicetes constituyen gran parte de la población microbiana del suelo, especialmente bajo condiciones alcalinas y secas. Sin embargo, algunos actinomicetes acidofílicos han sido identificados y caracterizados, demostrando su gran adaptabilidad relacionada a pHs bajos. Los suelos ácidos están compuestos básicamente de pequeñas y finas partículas de materia orgánica. Carecen de ciertos nutrientes esenciales, como calcio, fósforo y magnesio, pero presentan en gran abundancia hierro, además tienen una excelente permeabilidad (Brock *et al.*, 1987).

Los actinomicetes acidofílicos han sido poco estudiados, por lo que se desconocen muchos aspectos acerca de su distribución geográfica y biodiversidad. Como consecuencia, el descubrimiento de nuevas especies de actinomicetes que habiten en éstas condiciones, podrían llevar al descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos útiles en Biotecnología (Brock *et al.*, 1987).

Los actinomicetes tienen la capacidad de sintetizar diversos metabolitos secundarios biológicamente activos, tales como antibióticos, herbicidas, pesticidas, y antiparasíticos. También producen enzimas como celulasas y xilanasas, que tradicionalmente han sido usadas en el tratamiento de desechos. De todos los compuestos bioactivos producidos por los actinomicetes, los antibióticos predominan debido a su importancia terapéutica y comercial (Leveau & Bouix, 2000), por ello, éstos compuestos conforman la parte primordial de las aplicaciones industriales de los actinomicetes. Los actinomicetes son capaces de sintetizar muchos productos de interés

por lo que su estudio e investigación permiten ampliar y conocer nuevos compuestos útiles, para beneficio directo de los seres humanos en el presente, y el de las futuras generaciones.

### **1.2.1.2. Meso**

Un antibiótico es una sustancia química producida por un microorganismo capaz de matar o inhibir el crecimiento o proliferación de otros microorganismos. Se han descubierto miles de antibióticos pero solo unos cuantos han demostrado ser de gran valor práctico para la biotecnología. Sin embargo, los más importantes han sido ampliamente aplicados en el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas.

La búsqueda de nuevos antibióticos ha ocupado el tiempo de un gran número de investigadores durante la última generación. El procedimiento más ampliamente usado es el que se denomina pruebas de selección. Se aísla un gran número de posibles organismos productores de antibióticos de su medio ambiente natural y cada uno es probado una amplia gama de microorganismos para ver si existe algún antagonismo.

La producción de antibióticos por microorganismos es un fenómeno muy frecuente y una variedad de microorganismos producen antibióticos que actúan contra otros. Aquellos que los producen son especialmente del suelo. Tres grupos son los responsables de la producción de la mayoría de los antibióticos usados, en donde, los hongos, especialmente del género *Penicillium*, producen antibióticos como la penicilina. Bacterias del género *Bacillus* y un gran número de actinomicetes, fabrican antibióticos como estreptomycin, cloranfenicol, tetraciclina y eritromicina (Brock *et al.*, 1987).

Los antibióticos manifiestan a bajas concentraciones, actividades biológicas de naturaleza principalmente antibacteriana, antifúngica, anticancerosa, antiviral o antiparasitaria. Si bien los antibióticos son conocidos en primer lugar por sus aplicaciones médicas, presentan también un interés significativo en los campos de la sanidad animal y de la agricultura (Leveau & Bouix, 2000).

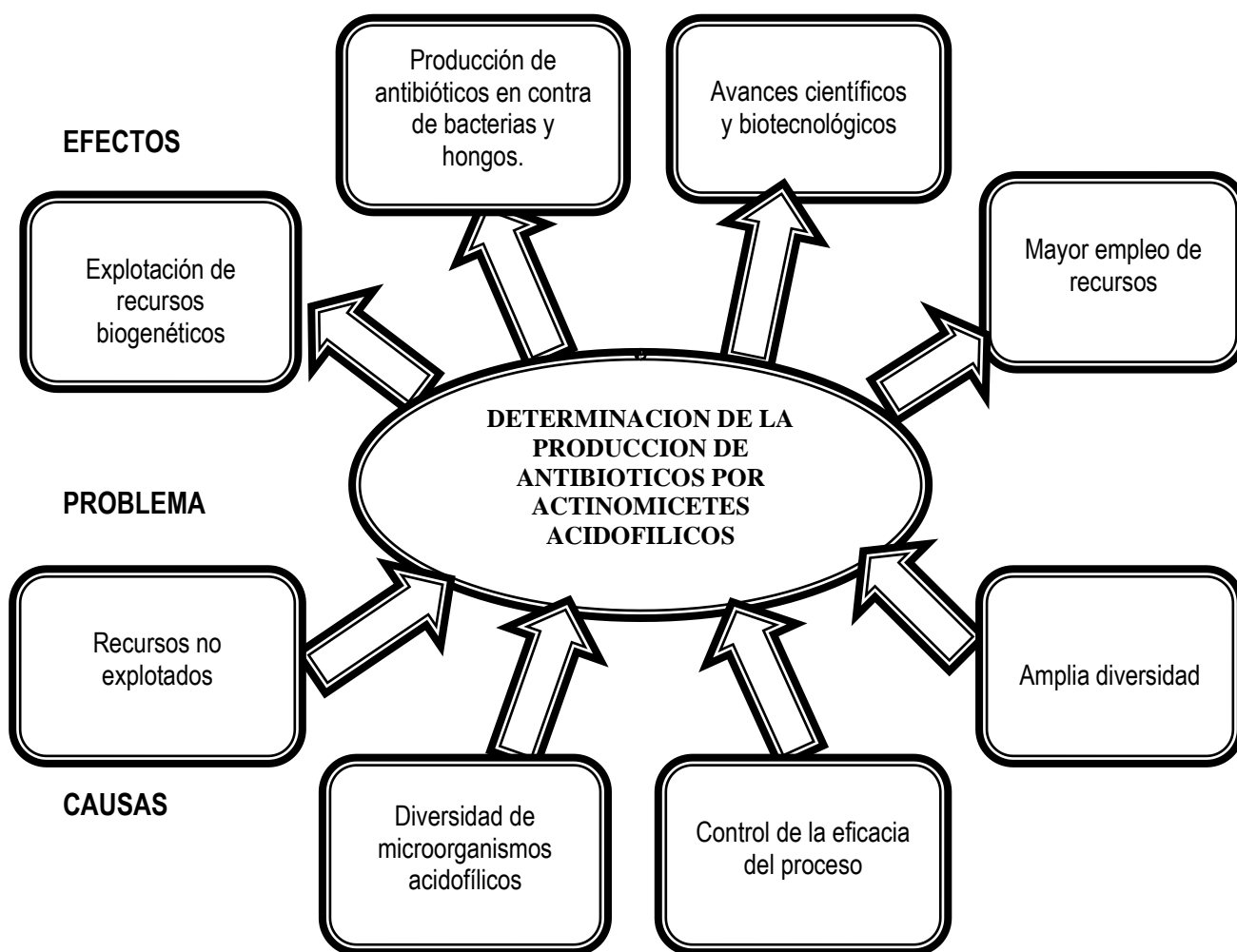
### **1.2.1.3. Micro**

En un hábitat natural como el suelo, la biodiversidad de actinomicetes es muy abundante. Sin embargo, la gran creencia que éstos prefieren medioambientes neutros y alcalinos, ha llevado a que poco se conozca acerca de la diversidad de actinomicetes en suelos ácidos. La descripción del nuevo género *Streptacidiphilus* (Kim *et al.*, 1997), abrió la posibilidad de conocer más la diversidad de éste grupo de actinomicetes acidofílicos. Hasta la actualidad se han descrito ocho nuevas especies (Kim *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2008). Además ya se ha reportado la producción de polímeros con posibles aplicaciones industriales por miembros de *Streptacidiphilus* (Matias *et al.*, 2009). Por ello, es necesario desarrollar métodos y procedimientos que permitan el enriquecimiento, aislamiento y cultivo de

actinomicetes acidofílicos, en condiciones de laboratorio. Este trabajo es importante porque se obtienen cultivos puros para estudios detallados y controlados de laboratorio, permitiendo comprender de mejor manera su capacidad metabólica para producir nuevos compuestos bioactivos, y determinar las posibles aplicaciones en biotecnología, microbiología ambiental e industrial, y medicina (Brock *et al.*, 1987).

### 1.2.2 Análisis Crítico

#### 1.2.2.1. Diagrama Causa – Efecto



#### 1.2.2.2. Prognosis

Si no se llega a concluir el presente trabajo de investigación se desconocería la capacidad de los actinomicetes acidofílicos de producir compuestos bioactivos limitando el uso de los mismos en diferentes áreas de biotecnología, agricultura y salud. Además se aportará con una guía para la explotación y utilización de los recursos biogenéticos que nos ofrece nuestro país, ya que éste posee una gran riqueza natural al permitir que se desarrollen microorganismos con una diversidad morfológica, taxonómica, ecológica y bioquímica muy amplia.



### **1.2.2.3. Formulación del problema**

¿Es factible la producción de antibióticos a partir de actinomicetes acidofílicos?

### **1.2.2.4. Interrogantes**

¿Cómo se determina la población y diversidad de actinomicetes presentes en suelos ácidos?

¿Cómo se realiza la caracterización fenotípica de los actinomicetes?

¿Cómo se determina la capacidad de producción de antibióticos por actinomicetes?

### **1.2.2.5. Delimitación**

Campo: Investigación.

Área: Microbiología.

Sub área: Biotecnología Microbiana.

Aspecto: Diversidad y Metabolismo secundario de microorganismos.

Geográfica: Laboratorio de Ciencias Biológicas. Facultad de Recursos Naturales. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

Temporal: Abril 2010 – Abril 2011

## **1.3 Justificación**

En la actualidad la mayoría de investigaciones sobre actinomicetes han sido un gran aporte para la biotecnología. Este tipo de investigación se ve reforzada por la capacidad que los actinomicetes poseen para producir diversos metabolitos secundarios, ya que han permitido el desarrollo de productos útiles, basados en la gran diversidad biológica y metabólica que éstos microbios presentan. Es posible que se encuentre una gran biodiversidad, lo que implicaría también encontrar posibles nuevas especies y metabolitos secundarios no descubiertos hasta la actualidad.

El presente estudio determinó la diversidad biológica y metabólica de actinomicetes que crecieron en medios de cultivo ácidos. Para ello se usaron medios específicos y se aplicaron técnicas que permitieron identificar aquellos que son similares, para así disminuir el número de actinomicetes a los que se determinó la capacidad para producir antibióticos. Además se obtuvieron datos acerca de la distribución geográfica de éstos microorganismos.

El presente estudio aporta con una guía para la explotación y utilización de los recursos biogenéticos que nos ofrece nuestro país, ya que éste posee una gran riqueza natural al permitir

que se desarrollen microorganismos con una diversidad morfológica, taxonómica, ecológica y bioquímica muy amplia.

Es importante insistir que en el Ecuador el desarrollo y la investigación en el área de biotecnología aún son muy elementales, debido a la falta de apoyo financiero y en algunos casos al poco interés de nosotros como profesionales de contribuir con la ciencia y la tecnología aprovechando la megadiversidad que tenemos a nuestro alcance.

#### **1.4 Objetivos**

##### **1.4.1 General**

- Determinar la producción de antibióticos por actinomicetes acidófilos.

##### **1.4.2 Específicos**

- Determinar la población y diversidad de actinomicetes presentes en suelos ácidos.
- Caracterizar fenotípicamente los cultivos de los actinomicetes aislados.
- Determinar la producción de antibióticos en contra de bacterias y hongos.

## CAPITULO II

### MARCO TEORICO

#### 2.1 Antecedentes Investigativos

##### 2.1.1. Generalidades de los Actinomicetes

Los actinomicetes comprenden un grupo de microorganismos procariotes con una gran diversidad, son de naturaleza Gram positiva, y crecen usualmente por la formación de filamentos muy ramificados (desarrollo miceliar). Muchos de estos organismos pueden formar ciertas estructuras llamadas esporas, así como también unas más especializadas llamadas esporangios. Algunas de estas esporas pueden ser móviles por flagelos mientras que otras son inmóviles. Fisiológicamente, es posible distinguir formas aerobias, aunque también es posible encontrar unas pocas anaerobias. Presentan una diversidad considerable desde formas bacilares hasta formas filamentosas ramificadas, terminando en una esporulación compleja (Lo, 2002; García, 2005). Generalmente el contenido de G+C de su ADN es superior al 55%. Su crecimiento es más lento que el de otras bacterias, ya que el tiempo de generación promedio es de alrededor de 2 a 3 horas. En ciertas especies, como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, se desarrollan todavía más lentamente con tiempos de generación superiores a 15 horas. Se reproducen por fisión binaria o fragmentación y la mayoría posee un metabolismo oxidativo (Leveau & Bouix, 2000).

Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, principalmente en agua dulce y marina, y materia orgánica. Sin embargo su reservorio natural es el suelo en donde comprenden aproximadamente del 20 al 60% de la población microbiana. Su función ecológica principal es la descomposición de la materia orgánica. El olor característico a tierra húmeda se debe a su actividad metabólica y a la producción de pigmentos terpenoides conocidos como geosminas, y enzimas extracelulares que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal y animal. Otras especies fijan nitrógeno atmosférico mientras que solo unas pocas son patógenas de humanos, animales o plantas (Brock *et al.*, 1987).

Es el grupo más prolífico en cuanto a la producción de antibióticos, ya que se ha reportado que de los 7.500 antibióticos de origen microbiano descubiertos hasta hoy, más del 50% corresponden a los actinomicetes, y de los cuales un poco más de una centena son comercializados. Constituyen el reservorio genético más importante de agentes antimicrobianos, ya que estos compuestos presentan estructuras químicas muy diversas. Muestran actividades biológicas variadas que pueden ser de tipo antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, antiparasitario o antiviral. A estos antibióticos cuyo campo de aplicación se extiende no solamente a los diversos terrenos de la terapéutica humana y veterinaria, sino también a la agricultura, se añaden otros productos como enzimas e inhibidores de enzimas, entre los cuales

algunos manifiestan actividades farmacológicas que subrayan todavía más el interés de estos microorganismos (Madigan *et al.*, 1998; Leveau & Bouix, 2000).

### **2.1.2. Metabolismo de los actinomicetes**

Dentro de las propiedades más significativas de los actinomicetes está su capacidad de desarrollarse sobre los sustratos más diversos, y su aptitud para sintetizar numerosos compuestos bioactivos. Estas propiedades traducen la riqueza completamente destacable del metabolismo celular de este grupo microbiano (Brock *et al.*, 1987).

#### **2.1.2.1. Metabolismo Primario**

Corresponde al conjunto de vías catabólicas, anfibólicas y anabólicas que suministran al organismo la energía y las moléculas necesarias para su crecimiento. Este tipo de metabolismo de los actinomicetes es parecido al de otros microorganismos. La acción de las enzimas del catabolismo conduce a la degradación de los nutrientes y fuentes de energía relativamente complejas (Leveau & Bouix, 2000).

Los productos finales del metabolismo se utilizan para formar intermediarios primarios como los azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, vitaminas y los polímeros esenciales que derivan de ellos (polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, coenzimas). Estos metabolitos primarios forman la estructura celular y permiten el funcionamiento del metabolismo general. Los mecanismos de control más importantes son la inducción por los sustratos, la retro – inhibición sobre las actividades enzimáticas, la represión de la síntesis de las enzimas, la represión catabólica y la regulación del ATP (Leveau & Bouix, 2000).

Más allá de las fuentes usuales de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, los actinomicetes tienen la capacidad de degradar o transformar compuestos bastante complejos, muchos de ellos hidrófobos, entre los cuales se pueden destacar a los hidrocarburos y afines (alcanos, alquenos, alquinos, ciclanos, terpenos), compuestos nitrogenados no aromáticos (nitrilos, amidas, heterocíclicos), compuestos aromáticos (hidrocarburos arilalifáticos, aminas aromáticas, fenoles, heterocíclicos), esteroides y esteroides (Leveau & Bouix, 2000).

#### **2.1.2.2. Metabolismo Secundario**

Los metabolitos secundarios se definen como compuestos de bajo peso molecular, no esenciales para el crecimiento del microorganismo productor. La producción de metabolitos secundarios está a menudo asociada a un crecimiento limitado, correspondiente a la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Si bien este hecho es frecuente, no es sistemático. El hecho de que la mayoría de los metabolitos secundarios conocidos, producidos por los actinomicetes sean antibióticos, se relaciona con la amplitud de la búsqueda de nuevos antibióticos llevada a cabo desde hace varias décadas con ayuda de programas de screening específicos. Otros tipos de programas de screening, aplicados más recientemente, han sido

diseñados para seleccionar otras actividades biológicas. Por ejemplo, ponen en evidencia un número creciente de metabolitos secundarios no antibióticos. Del mismo modo, se han descubierto metabolitos secundarios sin actividad biológica evidente, con ayuda de programas de screening más focalizados sobre la originalidad estructural de las moléculas que sobre su actividad (Phillips, 1994).

El conjunto de metabolitos secundarios conocidos corresponde a una gran diversidad de familias de compuestos orgánicos, entre los cuales tenemos aminoazúcares, epóxidos, alcaloides, quinonas, glucósidos, lactonas, macrólidos, nucleósidos, péptidos, fenazinas, polienos, pirroles, quinolinas, tetraciclinas, naftalenos, poliacetilenos,  $\beta$ -lactaminas. A pesar de la diversidad de estructuras químicas y de sus actividades biológicas, los metabolitos secundarios son sintetizados a partir de un pequeño número de precursores directamente provenientes del metabolismo primario. Así, se distinguen una docena de vías principales en los actinomicetes, en base al origen del carbono (Leveau & Bouix, 2000). La descripción es la siguiente:

- Incorporación del esqueleto carbonado completo de la glucosa para formar ya sea, el conjunto del metabolito secundario (estreptomycina y otros aminoglicósidos) o ya sea una parte correspondiente a un glúcido proveniente de otra vía (eritromicina, espiramicina y otros macrólidos).
- Utilización de la vía de las pentosas para la biosíntesis de metabolitos nucleotídicos (tubercidina).
- Utilización de la vía del ácido shikímico para la biosíntesis de la parte aromática de ciertos metabolitos (novobiocina, cloramfenicol).
- Utilización de la vía de los policétidos, menos común en los actinomicetes, para acceder a otros metabolitos con ciclos aromáticos (tetraciclinas):
- Una variante de la vía del polipropionato, que implica la condensación del ácido propiónico y del ácido metilmalónico conduce a la biosíntesis de numerosos metabolitos entre ellos las gliconas de los macrólidos (la eritronolida de la eritromicina)
- Otra variante, incluye la incorporación de acetato, de propionato y de butirato conduce a metabolitos secundarios de tipo poliéter (monensina, lasalocida, narasina, emericida).
- Conversión o incorporación de aminoácidos (cefamicinas, cicloserina).
- Utilización de la vía de los terpenos y de los esteroides (geosmina) (Brock *et al.*, 1987; Leveau & Bouix, 2000).

Por otra parte, se utilizan tres tipos de reacciones químicas para transformar intermediarios primarios en metabolitos secundarios finales, las que incluyen oxidaciones y reducciones, metilaciones, y halogenaciones (Leveau & Bouix, 2000). La producción de metabolitos secundarios tiene lugar generalmente tras la fase de crecimiento rápido, durante la idiofase. En el caso de los antibióticos, la idiofase está asociada a la expresión de mecanismos que permiten a la cepa productora sobrevivir en presencia del antibiótico sintetizado. Entre estos mecanismos de resistencia se pueden identificar la modificación enzimática del antibiótico, la alteración de la

permeabilidad al antibiótico excretado, y la modificación del blanco celular del antibiótico (Leveau & Bouix, 2000).

La biosíntesis de metabolitos secundarios está regulada por diversos mecanismos, entre ellos la represión por fuentes nutricionales, la inducción, la represión y la inhibición de enzimas de las vías de biosíntesis por el metabolito final. La glucosa, fuente de carbono favorable al crecimiento, interfiere con la biosíntesis de numerosos metabolitos secundarios. Así, durante la biosíntesis de la tilosina, la glucosa interfiere inhibiendo o reprimiendo la oxidación de los ácidos grasos, fuentes de acetato y propionato en la formación del ciclo de los macrólidos. La represión de la biosíntesis de metabolitos secundarios por el amonio o por ciertos aminoácidos es frecuente en los actinomicetes. Ese es el caso de la biosíntesis de la tilosina, eritromicina, cloramfenicol y de la estreptomicina. En cambio, los fosfatos interfieren a menudo con la biosíntesis de los metabolitos secundarios según dos mecanismos principales, ya sea cuando el fosfato reprime o inhibe las fosfatasas, o porque actúa reprimiendo o inhibiendo otras sintetetasas diferentes de las fosfatasas (Leveau & Bouix, 2000).

La finalidad de los metabolitos secundarios es conferir ciertas ventajas selectivas a los actinomicetes, en la competición entre diferentes especies por la colonización de un habitat específico. Además la actividad metabólica que presentan por ser diversa a demostrado tener muchas aplicaciones medicinales, terapéuticas y agroquímicas (Phillips, 1994; Leveau & Bouix, 2000).

### **2.1.3. Morfología de los actinomicetes**

La diversidad morfológica es un carácter totalmente destacable de los actinomicetes, en los cuales se observan múltiples formas desde células cocoides en *Micrococcus*, bacilares (*Mycobacterium*) hasta un micelio complejo generador de esporas envueltas en un esporangio (*Streptosporangium*). Esta diversidad morfológica se traduce con frecuencia en una diferenciación importante y en la existencia de un ciclo biológico parecido al de los eucariotes. Así, los actinomicetes más diferenciados desarrollan sobre un medio sólido una masa de hifas miceliales repartidas en dos capas distintas, el micelio del sustrato y el micelio aéreo. Según los casos, se pueden formar esporas en el micelio aéreo o en el del sustrato, o en los dos a la vez, permitiendo la propagación de la cepa (Brock *et al.*, 1987).

#### **2.1.3.1. Hifas**

Las hifas son un conjunto de una o más células rodeadas por una pared tubular, generalmente filamentosa y ramificada. Estas al encontrarse sobre sustrato sólido se ramifican a intervalos y se dispersan radialmente, ya sea dentro del sustrato o a lo largo de la superficie. Un sistema ramificado de hifas constituye el micelio, el mismo consta de una masa de citoplasma encerrada dentro de un sistema de tubos rígidos y ramificados que son bastante uniformes en cuanto a su diámetro. Los tubos que encierran al protoplasma representan una estructura homóloga a la

pared celular de un organismo unicelular (Holt *et al.*, 1984; Stanier *et al.*, 1986; Brock *et al.*, 1987).

En medio sólido, los actinomicetes forman dos estructuras macromorfológicas principales. El micelio del sustrato, penetra el agar y solubiliza el material orgánico para proporcionar nutrientes, los que son absorbidos para el crecimiento del organismo. Éste crece hacia abajo para poder cumplir su función. El micelio aéreo o micelio secundario, se forma cuando los nutrientes han sido extraídos, de tal manera que la energía y materias primas para este proceso son proporcionadas por el micelio del sustrato. Este tipo de micelio se encuentra constituido por hifas erguidas sobre la superficie. Las hifas aéreas son más espesas y mucho menos ramificadas que las del sustrato. Están en general pigmentadas y encerradas en una envoltura externa hidrófoba (Phillips, 1994).

### **2.1.3.2. Esporas**

Las esporas son resistentes a la desecación y proporcionan un mecanismo de dispersión y propagación para los organismos. Las exosporas son el tipo principal de esporas de los actinomicetes y se forman por septación de hifas y la separación de los elementos obtenidos (Leveau & Bouix, 2000). En la gran mayoría de actinomicetes, el micelio aéreo puede transformarse en estructuras especializadas para la reproducción y supervivencia de los individuos. Las esporas son estructuras especializadas que resisten desecación y cambios leves de temperatura, sin embargo no muestran la organización y propiedades de resistencia extrema de las endosporas (Goodfellow, 1988). El diámetro de las esporas de actinomicetes es de  $1\mu\text{m}$ , lo cual hace que su conteo e identificación en muestras de suelo se dificulte con microscopios ópticos, debido a que están enterradas a partículas de suelo (Phillips, 1993). Algunos géneros forman esporas móviles, sin embargo, la gran mayoría de esporas producidas por actinomicetes son inmóviles. Los actinomicetes presentan esporas en diferentes maneras, así es posible encontrar esporas simples, esporas en pares, cadenas de esporas o esporas dentro de esporangios. (Bergey, 1989, citado por Berrones, G. 2008).

### **2.1.4. Ecología y Distribución de los Actinomicetes en la Naturaleza**

#### **2.1.4.1. Ecosistemas terrestres**

Los actinomicetes son microorganismos muy ubicuos que se encuentran sobre todos los sustratos naturales corrientes, pero el suelo es el que constituye su reservorio más rico, a partir del cual estos microorganismos pueden invadir numerosos biotopos. Los actinomicetes están ampliamente propagados en todos los suelos, sobretodo en la capa comprendida entre la superficie y los 2 metros de profundidad. Su número varía en grandes proporciones según los casos, pero es corriente en las tierras fértiles contar  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo de tierra seca. Los actinomicetes son generalmente menos numerosos que otros grupos de bacterias, pero más numerosos que los hongos. Su proporción en relación a otros

microorganismos oscila entre el 10 y el 50%. Los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora* son los que más frecuentemente son aislados en cultivo puro (Leveau & Bouix, 2000).

#### **2.1.4.2. Ecosistemas marinos**

Los océanos cubren más del 70% de la superficie de la tierra, sin embargo, poco se conoce acerca de la diversidad microbiana en los sedimentos marinos. Como en los sedimentos terrestres, los marinos contienen cantidades limitadas de materia orgánica y la mayor parte de fuentes de carbono se encuentran en formas complejas. Sin embargo, nuevos métodos de cultivo han demostrado que en los sedimentos marinos existe un amplio rango de actinomicetes únicos que no se presentan en ambientes terrestres y que además producen una gran variedad de metabolitos bioactivos (Magarvey *et al.*, 2004). La diversidad de los actinomicetes en ambientes marinos está caracterizada por su tolerancia a la presión, halofilia y una temperatura óptima baja. Por ejemplo, ciertas cepas nocardioformes aisladas a más de 2000 metros de profundidad se desarrollan a presiones hidrostáticas de 500 bares en presencia de agua de mar a 18°C (Madigan *et al.*, 1998; Leveau & Bouix, 2000).

#### **2.1.4.3. Ecosistemas de altas temperaturas**

Entre los actinomicetes termófilos, que resisten altas temperaturas, se encuentran ciertas especies de *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Saccharopolyspora* y *Saccharomonospora*. Así también, en ambientes marinos, los actinomicetes se han adaptado a temperaturas de alrededor de 100°C cerca de las fumarolas en las fosas en medio del océano (Lam, 2006). Además se han encontrado cepas más termotolerantes que termófilas, es decir, éstos son actinomicetes mesófilos, pero resisten altas temperaturas entre 40 y 60°C. Estos grupos han sido aislados a partir de diversos sustratos como suelos variados, estiércoles, abonos compuestos, henos y forrajes (Leveau & Bouix, 2000).

#### **2.1.4.4. Ecosistemas ácidos**

Los actinomicetes son microorganismos con una gran diversidad en la naturaleza, si bien es cierto la mayoría de estos se encuentran bajo condiciones alcalinas y secas. Sin embargo, algunos actinomicetes acidófilos han sido identificados y caracterizados demostrando su adaptabilidad en pHs extremadamente bajos (Brock *et al.*, 1987).

Los ecosistemas ácidos pueden ser completamente naturales. La influencia humana directa o indirecta ha influido en el incremento de la acidez en diferentes ambientes, sobre todo aquellos dedicados a la explotación agrícola. Los ambientes ácidos están compuestos básicamente de pequeñas y finas partículas de materia orgánica, presentan una gran abundancia en hierro, pero carecen de nutrientes como calcio, fósforo, y magnesio. Una variedad de actividades microbianas genera acidez, esto incluye a la nitrificación y la formación y acumulación de ácidos



orgánicos, debido al proceso de fermentación como producto del metabolismo aerobio (Brock *et al.*, 1987).

Existen actinomicetes capaces de crecer y sobrevivir en ambientes que tienen pHs inferiores a 5.5 sin embargo estos microorganismos han sido poco estudiados, por lo que se desconocen mucho sus aspectos acerca de distribución geográfica y diversidad (Brock *et al.*, 1987; Juárez, 2004).

Los actinomicetes que se desarrollan en ambientes ácidos son de gran importancia en la industria, por ser fuente de compuestos anti fúngico y enzimas; también tienen un rol en la descomposición de biomasa de hongos en hojarasca y suelos ácidos. Dentro de los géneros de actinomicetes que poseen especies acidofílicas tenemos: *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* (producen antibióticos), *Frankia* (fijadores de nitrógeno), *Mycobacterium*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Agromyces*, y otros (Rodríguez, 2000).

## **2.1.5. Cultivo in vitro de actinomicetes**

### **2.1.5.1. Aislamiento Selectivo de Actinomicetes**

Las muestras de suelos contienen con frecuencia una flora microbiana variada, muchos de cuyos representantes perjudican el aislamiento de los actinomicetes. Los métodos más corrientes, son aquellos en los que se usan medios sólidos en placas petri. Combinan un tratamiento previo a las muestras, la elección de un medio apropiado y la adición de inhibidores. Uno de los pre-tratamientos clásicos consiste en secar la muestra de suelo a la temperatura de laboratorio, triturarla y exponerla durante 30 a 60 minutos a la temperatura máxima tolerada por el género buscado. Los actinomicetes, gracias a sus esporas, resisten mejor a la desecación que muchos otros microorganismos. La muestra así tratada se pone en suspensión y se preparan diluciones desde 1/10 hasta la 1/10<sup>8</sup>. Se toman alícuotas para ser inoculadas en cajas, ya sea por el método de difusión en placa o por vertido en placa. La temperatura de incubación se elige en función de los géneros que se quieren aislar. De 25 a 28 °C, para la mayoría de los actinomicetes mesófilos de origen terrestre o acuático, 28 a 30°C para *Micromonospora*, y de 45 a 65°C, en una atmósfera saturada de agua, para los termófilos (Bull *et al.*, 2000; Leveau & Bouix, 2000).

La eliminación de otros grupos de microbios diferentes a los actinomicetes se ha realizado mediante numerosas fórmulas en combinación con diferentes medios de aislamiento. Estas, aunque favorables al desarrollo de los actinomicetes, no impiden completamente el crecimiento de bacterias y de hongos. Por este motivo es necesaria la adición de compuestos antifúngicos y antibacterianos poco activos frente a los actinomicetes, así por ejemplo, la asociación nistatin + cicloheximida (50 a 100 µg de cada una por ml de medio cultivo), inhibe cualquier desarrollo fúngico. Por otro lado, el uso de polimixina B (5 µg/ml) y penicilina (1 µg/ml), limita el crecimiento bacteriano. La adición de estos cuatro antibióticos a un medio de cultivo tiene una buena eficacia

en el aislamiento (Capella 1971; Hayakawa *et al.*, 2000, citado por Berrones, G. 2008; Leveau & Bouix, 2000).

#### **2.1.5.2. Aislamiento Selectivo de Actinomicetes Acidofilicos**

Las muestras de suelo contienen una gran diversidad de microorganismos; por lo general se aíslan cepas de actinomicetos en la superficie del suelo y en profundidades entre 2 y 15 cm, más allá de esta profundidad disminuye la cantidad de éstos. El tamaño de la comunidad depende del tipo del suelo, particularmente de algunas de las características físicas, del contenido de materia orgánica y del pH del medio ambiente (Bok *et al.*, 1984).

Estudios anteriores indican que hay dos grupos principales de microorganismos acidofilicos de acuerdo al crecimiento en distintos rangos de pHs, es decir, grupos estrictamente acidofilicos como es el caso de *Streptacidiphilus* que muestra un rango de pH restringido con un pH óptimo de 4 a 5 y grupos neutrotolerantes acidofilicos como es el caso de *Streptomyces* que crecen en un rango de 3 a 5 con un crecimiento óptimo entre 5 a 5.5 (Cho *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004). Uno de los pre-tratamientos consiste en secar la muestra de suelo a la temperatura de laboratorio, triturarla y exponerla durante 45 a 60 minutos a la temperatura máxima tolerada por el género. Se emplea la técnica de difusión en placa y se prepara diluciones desde 1/10<sup>2</sup> hasta la 1/10<sup>5</sup>; se utiliza medios de agar como WYE, YCED, LMMC, MSSC, YCoE, CYPC y WYEC el pH de los diferentes medios de aislamiento se ajusta a 3, 4, 5, 5.5, 6 y 6.5 utilizando soluciones buffers con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a una concentración de 100mM. El pH final de cada medio se ajusta a su valor antes de la esterilización en la autoclave (Crawford *et al.*, 1993), en general estos medios son pobres en carbono orgánico, lo que efectivamente controla el crecimiento de hongos y ayudan a aislar la mayoría de actinomicetes acidofilicos e incluso aquellos de crecimiento lento. La temperatura de incubación puede oscilar entre 25 a 37 °C, dependiendo del género que se desee aislar durante 4 a 14 días. Cada actinomicete aislado es la prueba de su capacidad para crecer en medios completamente ácidos. (Crawford *et al.*, 1993; Hagedorn *et al.*, 1976).

#### **2.1.5.3. Conservación de las Cepas de Actinomicetes**

Las cepas aisladas o provenientes de una modificación genética deben poder ser conservadas sin perder sus caracteres morfológicos o bioquímicos. Esto es capital en las cepas industriales para las cuales la estabilidad genética, así como la facultad de propagarse rápidamente en medio sólido o en cultivos sumergidos sin perder su capacidad de producción, son cualidades esenciales. La mayoría de los métodos descritos se relacionan con cuatro técnicas principales, las que incluyen las transferencias sucesivas sobre medio nuevo, conservación de suspensiones de esporas sobre tierra estéril seca, liofilización de suspensiones de esporas, y congelación de cultivos o de suspensiones de propágulos a - 20°C, o en nitrógeno líquido.

Las transferencias en serie no se aconsejan para conservación prolongada, en la medida en que en cada transferencia se seleccionan los clones de crecimiento rápido que pueden no poseer los caracteres deseados. Las otras tres técnicas permiten conservaciones de varios años con una cierta ventaja de la liofilización y la de la congelación en nitrógeno líquido. La elección de un método es entonces función del estado esporulado o no de las cepas, del material disponible, del número de cepas a conservar, de la experiencia adquirida por cada laboratorio y del empleo previsto de las cepas conservadas. Por último sea cual fuera el método utilizado, y con el fin de permitir a la cepa la expresión de sus propiedades es necesario respetar las condiciones de cultivo óptimo antes y después de la puesta bajo la forma de conservación (Leveau & Bouix, 2000).

## **2.1.6. Importancia de los Actinomicetes en Biotecnología**

Teniendo en cuenta la importancia de los actinomicetes en la producción de antibióticos, es claro el interés de sus aplicaciones en sectores médicos e industriales. Además, este grupo microbiano tiene otras aplicaciones industriales como la producción de enzimas, de aminoácidos, de nucleótidos, de ciertas vitaminas, y las bioconversiones (Brock *et al.*, 1987)

### **2.1.6.1. Antibióticos**

Los antibióticos conforman la parte primordial de las aplicaciones industriales de los actinomicetes. Estas moléculas de origen natural manifiestan a bajas concentraciones actividades biológicas de naturaleza principalmente antibacteriana, antifúngica, anticancerosa, antiviral o antiparasitaria. Si bien los antibióticos son conocidos en primer lugar por sus aplicaciones médicas, presentan también un interés significativo en los campos de la sanidad animal, de la cría y de la agricultura. Por otra parte, es necesario subrayar la amplitud de los trabajos de hemisíntesis realizados a partir de ciertos antibióticos naturales. Más de 70.000 derivados han sido preparados en 20 años, de ellos una parte muy importante en la familia de las  $\beta$ -lactaminas. La preponderancia de los antibióticos entre los productos de interés industrial provenientes de los actinomicetes está ligada a la riqueza del metabolismo secundario de este grupo microbiano pero también a la explotación de este potencial, sobre todo en las grandes firmas farmacéuticas, de múltiples métodos de aislamiento de actinomicetes y de selección de actividades antibióticas variadas acopladas a medio pujantes de purificación y de estudio de estas sustancias naturales (Leveau & Bouix, 2000).

Entre los números antibacterianos provenientes de actinomicetes, se puede citar a la rifampicina, que es un derivado de hemisíntesis de la rifamicina producida por *Nocardia mediterranei*. Es usada en el tratamiento de la tuberculosis. Los antifúngicos de actinomicetes más explotados en terapéutica son la nistatina, extraído del cultivo de *Streptomyces noursei* y la anfotericina B, extraída de *Streptomyces nodosus*. Algunos antiparasitarios, entre ellos la paramomicina, que es un aminociclitol producido por algunas especies de *Streptomyces*, es utilizado en casos de amebiasis intestinal. Así también, la espiramicina, un macrólido

antibacteriano producido por *Streptomyces ambofaciens*, igualmente eficaz en el tratamiento de la toxoplasmosis. Otros antibióticos manifiestan actividades anticancerosas importantes, sobre todo el caso de varias antraciclinas y quinonas, entre ellas la daunorubicina de *Streptomyces coeruleorubidus* y *Streptomyces peucetius* utilizada en el tratamiento de vario tipos de cáncer, las leucemias en particular (Lazzarini *et al.*, 2000; Leveau & Bouix, 2000).

### **2.1.7. Taxonomía Numérica**

Una importante disciplina en microbiología es la clasificación microbiana, ya que permite establecer tanto las relaciones entre diferentes microorganismos, como el marco necesario para el desarrollo de una taxonomía natural (evolutiva). Haciendo uso del criterio establecido por la clasificación y nomenclatura, los microorganismos se identifican comparando las características de las unidades “desconocidas” y las “conocidas”. La identificación de un microorganismo recién aislado, se realiza mediante la comparación adecuada con las descripciones publicadas de microorganismos previamente caracterizados (Pelczar *et al.*, 1982).

El fenotipo de las bacterias comprende características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Individualmente, muchas de estas características han demostrado ser irrelevantes como parámetros para la relación genética, pero en su conjunto, proporcionan información descriptiva que permite reconocer taxones (Vandamme *et al.*, 1996).

Habitualmente, la taxonomía se ha basado en los análisis fenotípicos que incluyen el aspecto de un organismo, su metabolismo, sus enzimas, etc. En la taxonomía numérica, se determina varias características y los resultados se utilizan para agrupar los organismos en la escala taxonómica, principalmente al nivel de especie y subespecie. Las características fisiológicas y bioquímicas incluyen datos sobre el crecimiento a diferentes temperaturas, valores de pH, concentraciones de sal, condiciones atmosféricas, crecimiento en presencia de diversas sustancias tales como agentes antimicrobianos, y datos sobre la presencia o actividad de diversas enzimas, metabolización de los compuestos, entre otros (Brock *et al.*, 1987; Vandamme *et al.*, 1996).

#### **2.1.7.1. Coeficientes Utilizados para determinar similitud**

La utilización de métodos numéricos se basa fundamentalmente en el estudio y cálculo de la distancia fenotípica entre las entidades taxonómicas. Con tal fin se utilizan distintos coeficientes de similitud o disimilitud, en función del carácter considerado y del grado de correspondencia del fenotipo. Los métodos numéricos son procedimientos matemáticos que permiten cuantificar el parecido entre unidades taxonómicas, tomando como base los niveles de los caracteres observados (Oliva *et al.*, 2003).

Las medidas de similitud evalúan el grado de parecido o proximidad existente entre dos elementos. Los valores más altos indican mayor parecido o proximidad entre los elementos comparados. Cuando dos elementos se encuentran juntos, el valor de las medidas es máximo. Los coeficientes de similitud son utilizados para medir la asociación entre muestras. En contraste

con la mayoría de los coeficientes de disimilitud, las medidas de similitud no son métricas, ya que siempre pueden encontrarse dos muestras A y B más similares a otra que la sumatoria de sus similitudes con una muestra distante C. Por lo tanto, las similitudes no pueden ser utilizadas para ubicar muestras en relación con otra en un espacio métrico (Rodríguez *et al.*, 2001).

Los índices de similitud se definen como aquellos que miden los datos de pares idénticos entre pares de unidades taxonómicas operativas (UTOs) sobre un arreglo de caracteres de doble o multiestado (Oliva *et al.*, 2003).

### 2.1.7.2. Coeficientes de Asociación

Son funciones que miden la concordancia entre parejas de UTOs basándose en un conjunto de caracteres bifásicos y multifásicos, para lo cual se comparan la frecuencia de niveles de los caracteres en las que dicha concordancia existe, con el número total de los mismos. Se han hecho varios estudios comparando las ventajas de cada uno de los coeficientes de asociación (Oliva *et al.*, 2003).

### 2.1.7.3. Coeficientes de Concordancia Simple

Se define como la proporción de características que coinciden entre dos OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas). Es el coeficiente más utilizado en los estudios de investigación. Es una forma sencilla de establecer la similitud entre dos muestras contando el número de variables que ambas poseen en la misma forma y dividir entre el número total de variables. Este índice toma valores de cero o uno indistintamente, donde cero significa ningún patrón en común y uno patrones idénticos (Rodríguez *et al.*, 2001). Su fórmula es:

$$S_{SMC}(x_1, x_2) = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

**Dónde:**

$x_1, x_2$  = Son las dos especies comparadas.

$a$  = Número de lugares donde tanto  $x_1$  como  $x_2$  se han encontrado.

$b$  = Número de lugares donde  $x_1$  se ha encontrado pero  $x_2$  no.

$c$  = Número de lugares donde  $x_2$  se ha encontrado pero  $x_1$  no.

$d$  = Número de lugares donde ni  $x_1$  ni  $x_2$  se ha encontrado.

#### 2.1.7.4. Coeficiente de Jaccard

Es una estadística que se usa para comparar la similitud y diversidad de grupos de la muestra. El Coeficiente de Jaccard omite las ausencias conjuntas y considera la proporción entre localidades donde ambas especies se encuentran y el número total de localidades, donde al final una de ellas se encontró. Este índice proporciona el mismo valor a todos los términos, y oscila entre el cero y uno (Rodríguez *et al.*, 2001). La fórmula general es:

$$S_J(x_1, x_2) = \frac{a}{a + b + c}$$

#### 2.1.8. Principales Grupos de Actinomicetes

La taxonomía de los actinomicetes ha evolucionado mucho durante los treinta últimos años. El aumento en el número de nuevos géneros de actinomicetes debe atribuirse, al menos en parte, al interés industrial de este grupo microbiano. Tradicionalmente se han usado caracteres puramente morfológicos para establecer los diferentes grupos taxonómicos, sin embargo, actualmente se añaden criterios bioquímicos, químicos y moleculares, en lo que se conoce como taxonomía polifásica (Brock *et al.*, 1987). El conjunto de estos caracteres permiten diferenciar más 60 géneros. La tendencia a formar ramificaciones cortas o mucho más desarrolladas dando lugar a verdaderos filamentos miceliares, y un porcentaje G+C superior al 55%, constituyen las propiedades comunes más significativas de estas bacterias Gram-positivas. En este grupo de microorganismos morfológicamente muy variados, dominan dos tipos principales: Los nocardioformes, cuyas hifas se fragmentan en elementos cortos generadores de nuevos filamentos miceliares, y los esporoactinomicetos en los que se diferencia una parte del micelio completo para formar esporas (Leveau & Bouix, 2000).

##### 2.1.8.1. *Streptacidiphilus*

*Streptacidiphilus* comprende un grupo de microorganismos procariotes, recién descubierto en estudios realizados en suelos de arrozales, son aeróbicos, bacterias de naturaleza Gram positiva, crecen usualmente en largas cadenas de esporas flexuosas que miden aproximadamente 0.7x1.0 um con superficies lisas, forman un micelio de sustrato de color marrón y micelio aéreo abundante de color blanco grisáceo. Crecen a valores de pH entre 3.0 - 6.5, con un pH óptimo alrededor de 4.5 y en rangos de temperaturas de 28-37 °C. Son capaces de degradar la caseína, adenina, almidón y ácido úrico, pero no la elastina, guanina, hipoxantina, xantina, o xilano. El nitrato es reducido; utilizan como fuente de carbono para la energía y el crecimiento a L-arabinosa, D-arabitol-, d-celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, glucógeno, d-lactosa, D-manitol, D-manosa, D-rafinosa, l-ramnosa, entre otros (Wang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2003).

En los últimos años se han ido descubriendo diferentes especies que pertenecen a dicho género; Kim *et al* (2003), propuso que el género *Streptacidiphilus* sea para un grupo de cepas estrictamente acidofílicas, reconociendo tres especies *Streptacidiphilus albus*, la especie tipo, *Streptacidiphilus carbonis* y *Streptacidiphilus neutrinimicus*. Huang *et al.*, 2004 y 2006 propusieron las especies nuevas *Streptacidiphilus jiangxiensis* y *Streptacidiphilus oryzae*. Finalmente en el 2008, Cho *et al.*, descubrieron tres especies más, *Streptacidiphilus rugosus*, *Streptacidiphilus anmyonensis* y *Streptacidiphilus melanogenes*, por ello en la actualidad existen ocho diferentes especies dentro del género acidofílico *Streptacidiphilus*.

### **2.1.9. Antagonismo Microbiano**

Existe un grupo importante de actinomicetes que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos, esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de ciertos patógenos. En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen la enfermedad (Rodríguez, V. 2002).

La determinación de la capacidad antagónica de los actinomicetes ocurre en varias etapas. La inicial involucra identificar aquellos que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos modelo como bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Mendez & Mondino, 1999).

#### **2.1.9.1. Determinación Mediante Cilindros de Agar**

Consiste en hacer perforaciones cilíndricas con un instrumento estéril, en varias partes de un medio sólido sobre el cual un cultivo de actinomicetes ha estado creciendo por varios días. Luego los cilindros son colocados sobre la superficie de un medio de cultivo en el cual se ha inoculado alguno de los microorganismos modelo. Debe hacerse de tal manera que la parte del cilindro que presente el crecimiento del actinomicete este contacto con el medio de cultivo en el que es colocado. Luego de un período de incubación, que varía entre 48 – 72 horas, se observa si existen zonas de inhibición, las que serán más grandes mientras mayor sea la actividad antagónica (Phillips, 1993; Mattar & Martínez, 2007; Merino *et al.*, 2007).

#### **2.1.9.2. Dilución en medio sólido**

Implica la incorporación de un agente antimicrobiano a concentraciones progresivamente crecientes en un medio solidificado con agar y la aplicación de un inóculo bacteriano definido a la superficie de la placa que contiene el agar. La dilución en medio sólido se recomienda a menudo como un ensayo estandarizado para medir la sensibilidad a antimicrobianos de organismos difíciles de cultivar, como es el caso de especies de *Helicobacter* y *Campylobacter* (Mattar & Martínez, 2007; Merino *et al.*, 2007).

### **2.1.9.3. Difusión en disco**

Es la difusión que experimenta un agente antimicrobiano a una determinada concentración a partir de discos, tiras o tabletas, que se depositan en un medio de cultivo sólido que ha sido sembrado con un inóculo bacteriano estandarizado. El método de difusión en disco se basa en la determinación de una zona de inhibición del crecimiento que es proporcional a la sensibilidad de la bacteria frente al antimicrobiano presente en el disco. La difusión de un antimicrobiano en un medio de cultivo inoculado crea un gradiente de la sustancia antimicrobiana. Cuando su concentración llega a ser tan diluida que no logra inhibir el crecimiento de la bacteria ensayada, termina la zona de inhibición. Teóricamente, el borde de esta zona de inhibición se corresponde con la concentración mínima inhibitoria. Hay que advertir que las pruebas de difusión en disco basadas solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición, sin considerar su tamaño, no son aceptables como ensayos para la sensibilidad a antimicrobianos desde el punto de vista metodológico (Mattar & Martínez, 2007; Merino *et al.*, 2007).

### **2.1.10. Tipos de Inhibición**

#### **2.1.10.1. Inhibición del crecimiento**

La actividad antimicrobiana provoca la muerte del microorganismo modelo formando un halo translúcido detectado alrededor del disco, es decir que el organismo a prueba es sensible contra el microorganismo en estudio (Obregón & Zavaleta, 1998; Manzano *et al.*, 1999).

#### **2.1.10.2. Inhibición del crecimiento en forma irregular**

El compuesto solamente ha reducido el crecimiento del organismo a prueba ya que se observa una inhibición pero el halo no adopta la forma esperada (Obregón & Zavaleta, 1998).

#### **2.1.10.3. No inhibición del crecimiento**

Es decir que no se forma un halo alrededor del disco y el microorganismo a prueba no es sensible contra el compuesto antimicrobiano (Obregón & Zavaleta, 1998).

#### **2.1.10.4. Factores que influyen el tamaño de la zona de inhibición**

El tamaño de la zona de inhibición se ve afectado por diferentes factores como son la sensibilidad del organismo, la concentración de esporas o células en la suspensión que contiene el microorganismo modelo. El tipo de medio de cultivo influye directamente en los resultados ya que tener un medio más rico da como resultado un crecimiento más rápido del organismo de prueba y una gradiente menos pronunciada de la línea de respuesta. Otros factores son las condiciones de incubación, la velocidad de difusión de la sustancia y su concentración (Hewitt & Vicent, 1989, citado por Cortez, C. 1998)



Algunos antibióticos se difunden mucho más fácilmente en agar que otros en consecuencia, no siempre es posible concluir que el microorganismo que forma la zona más amplia es el más activo contra un organismo testigo. Por ejemplo, sustancias de alto peso molecular difunden medios más rápidamente que otras de bajo peso molecular, mientras que algunos compuestos difunden muy poco debido a que se unen con el agar, en ambos casos se producen zonas de inhibición más pequeñas (Brock *et al.*, 1987).

## **2.2. Fundamentación Filosófica**

El presente estudio pretende expandir los conocimientos acerca de los actinomicetes acidófilicos ya que han permitido el desarrollo de productos útiles, basados en la gran diversidad biológica y metabólica que estos microbios presentan. Es por ello que se busca determinar la producción de antibióticos a partir de dichos actinomicetes acidófilicos, los cuales brindan soluciones eficientes y viables en el campo médico, sanidad animal, la cría y de la agricultura, a más de aportar con una guía de explotación y utilización de los recursos biogenéticos que nos ofrece nuestro país al permitir que se desarrollen microorganismos con una diversidad morfológica, taxonómica, ecológica y bioquímica muy amplia. . Por ello, para esta investigación se considerara el paradigma positivista ya que este se rige por las leyes que permiten explicar, predecir y controlar los fenómenos del mundo natural y pueden ser descubiertas y descritas por los investigadores con métodos adecuados; además el objetivo que se obtiene se considera objetivo y factual, ya q se basa en la experiencia y es válido para todos los tiempos y lugares, con independencia de quien lo descubre. Y se utiliza la vía hipotético–deductiva como lógica metodológica válida.

## **2.3. Fundamentación Legal**

Según la Norma ISO 10381-6(E). “Guía para la colección, manejo y conservación del suelo para procesos microbianos aeróbicos en el laboratorio”. Calidad de suelo – Muestreo - Dirección sobre la colección, manejando y almacenaje de suelo en condiciones aeróbicas para la evaluación de procesos microbiológicos, biomasa y diversidad en el laboratorio.

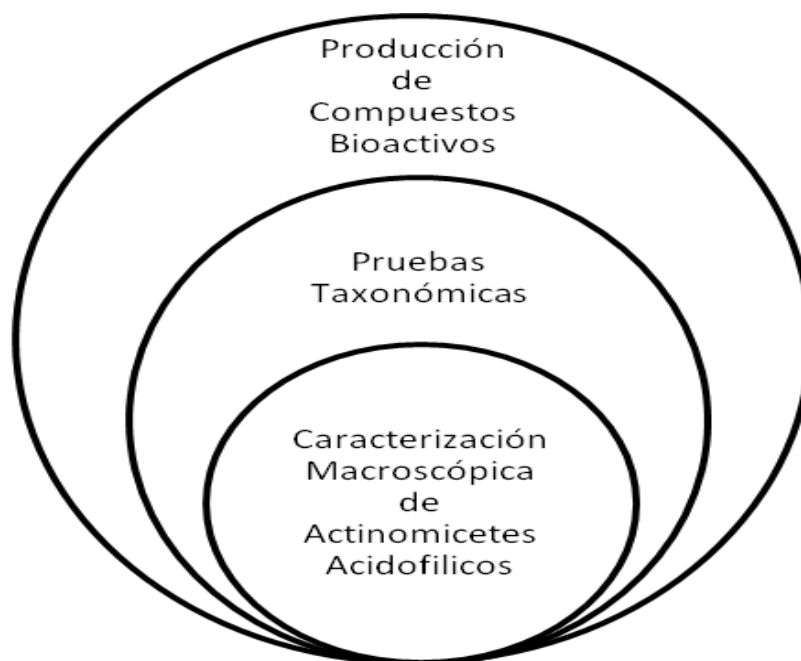
Apoyándose en el Art. 400 de la Constitución de la República del Ecuador en el Capítulo Segundo (Biodiversidad y Recursos Naturales) en la Sección Segunda (Biodiversidad) menciona que el Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, cuya administración y gestión se realizará con responsabilidad intergeneracional. Se declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola y silvestre y el patrimonio genético del país.

Basándose en la Norma ISO 17025 "Medios de cultivo microbiológicos y los factores que la influyen medio agar, la preparación previa y las diferentes tinciones que nos facilitan la observación de los microorganismos, y los requisitos que se deben dar en los cultivos.

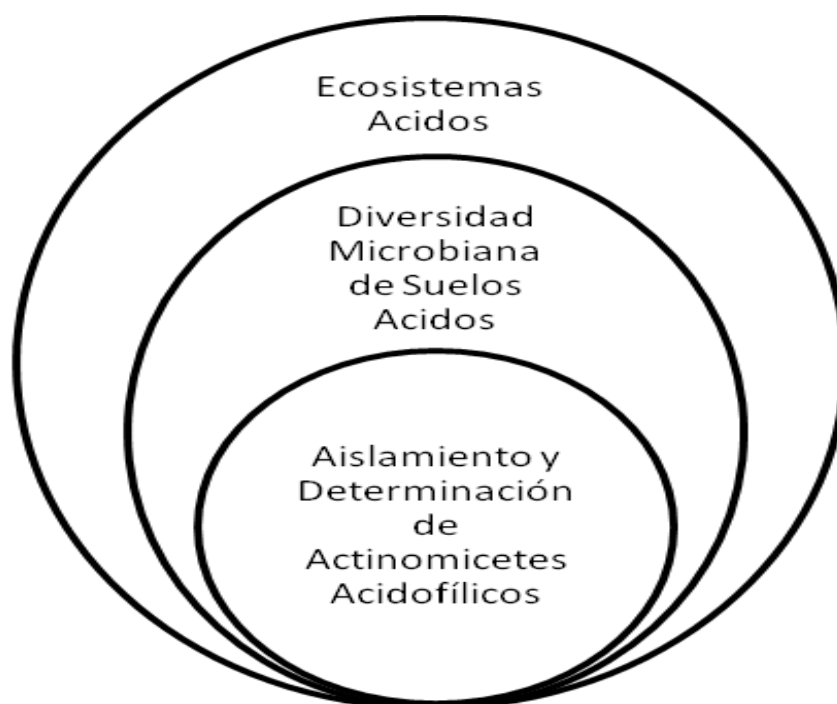
#### **2.4. Categorías fundamentales**

Ver página siguiente

#### 2.4.2.1. Variable Dependiente



#### 2.4.2.2. Variable Independiente



## **2.5 Hipótesis**

### **2.5.1. Hipótesis nula**

Los actinomicetes acidofílicos aislados de diferentes suelos no producen compuestos bioactivos.

### **2.5.2. Hipótesis alternante**

Los actinomicetes acidofílicos aislados de diferentes suelos producen compuestos bioactivos.

## **2.6 Señalamiento de variables de las hipótesis**

- Número de unidades formadoras de colonias totales por gramo de suelo (ufc/g)
- Número de unidades formadoras de actinomicetes por gramo de suelo (ufc/g)
- Porcentaje de actinomicetes
- Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos
- Rango de crecimiento relacionado a temperatura
- Rango de crecimiento relacionado a pH
- Diferentes aminoácidos como única fuente de energía y materia.
- Pruebas de antagonismo en contra de bacterias y hongos modelo.

## CAPITULO III

### METODOLOGIA

#### 3.1. Enfoque

La investigación tuvo un enfoque predominantemente cuantitativo.

#### 3.2. Modalidad básica de la investigación

Experimental

#### 3.3. Nivel o tipo de investigación

Básica exploratoria

#### 3.4. Población y muestra

Se tomaron muestras individuales de suelo y rizósfera en cuatro lugares diferentes, correspondientes a ecosistemas diversos como son el de páramo, trópico húmedo, trópico seco y subtropical húmedo (Tabla 1). Con la ayuda de un barreno estéril, se recolectaron los primeros 20 cm de suelo. Las muestras fueron trasferidas asépticamente a frascos estériles para su transporte. Una vez que estas arribaron al laboratorio, se procedió a homogeneizarlas, mediante el uso de un mortero y pistilo, esterilizados con alcohol al 70%. Las muestras homogeneizadas fueron almacenadas en frascos estériles. Para cada sitio se prepararon muestras compuestas que fueron utilizadas para los experimentos *in vitro*.

**Tabla 1. Características de los sitios de recolección**

| LUGAR         | TIPO DE VEGETACIÓN   | TIPO DE ECOSISTEMA |
|---------------|----------------------|--------------------|
| San Francisco | Cultivos de guayabas | Trópico seco       |
| Cotopaxi      | Bosque de pinos      | Páramo             |
| Tosagua       | Cultivos de arroz    | Trópico húmedo     |
| Misahualli    | Selva                | Subtropical húmedo |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

#### 3.5. Operacionalización de variables

Ver más adelante página N° 26.

### **3.6. Plan de Recolección de la Información**

#### **3.6.1. Caracterización físico-química de las muestras**

##### **3.6.1.1. Determinación del pH**

Se colocaron 5 gramos de suelo en un vaso de precipitación y se añadió agua destilada hasta obtener una película de aproximadamente 1 cm de altura sobre el suelo. La suspensión se agitó por varios minutos y posteriormente se dejó reposar durante media hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, utilizando un pHmetro calibrado, y sin agitar la muestra, se tomaron cinco lecturas de pH, con las cuales se realizó el promedio y se obtuvo el valor final.

##### **3.6.1.2. Determinación del porcentaje de humedad**

Para la determinación de humedad, se pesó una cápsula de porcelana previamente esterilizada con alcohol (P1). Utilizando las muestras homogeneizadas, se colocó una cierta cantidad de suelo en la cápsula (P2), y se llevó a la estufa a 105°C por 24 horas. Para obtener el peso de la muestra de suelo tomada (P3) se utilizó la siguiente expresión:

$$P_3 = P_2 - P_1$$

Una vez transcurrido el tiempo establecido se sacó la muestra de la estufa y se dejó enfriar al ambiente por unos minutos hasta obtener una temperatura uniforme. Se pesó nuevamente la cápsula (P4) y para obtener el valor del peso seco de la muestra (P5), se realizó la siguiente operación:

$$P_5 = P_4 - P_1$$

Para calcular el porcentaje de humedad, se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = 100 - \left( \frac{P_5}{P_3} \times 100 \right)$$

##### **3.6.1.3. Determinación del porcentaje de materia orgánica**

El envase obtenido en el paso anterior se llevó a la mufla a 405°C por tres horas. Una vez transcurrido este tiempo se sacó la muestra de la mufla y se dejó al ambiente hasta que se establezca la temperatura y se volvió a pesar (P6). Para obtener el valor del peso del suelo luego del tratamiento en la mufla, es decir sin materia orgánica (P7), se realizó la siguiente operación:

$$P_7 = P_6 - P_1$$

| HIPOTESIS  | VARIABLE  | CONCEPTO  | INDICADORES  | INDICES  | INSTRUMENTOS                                    |
|--|---|---|--|--|---|
| Los actinomicetes aislados de diferentes suelos no producen compuestos bioactivos. | Dependiente   | Población y diversidad de actinomicetes presentes en diferentes tipos de suelos.                  | Población de actinomicetes   | Número de ufc/g  | Calculadora                                     |
|  |   |   | Grupos especie identificados en los dendrogramas respectivos de acuerdo al porcentaje de similitud | Similitudes mayores al 80% indican miembros de un mismo grupo especie                            | Software estadístico NTSys.<br>Microsoft Excel. |
|  | Independientes  | Características fenotípicas como producto de la expresión visible de los genes de cada individuo. | Características macroscópicas  | Coloración del micelio del sustrato, esporas y cualquier producción de pigmento difusible        | Microsoft Excel.                                |
|  |   |   |  | Presencia o ausencia de micelio aéreo. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0 | Microsoft Excel.                                |
|  |   |   | Características microscópicas  | Tipo de morfología de las cadenas de esporas (Tabla 1). Tinción gram. Endosporas y cápsulas      | Microscopio                                     |
|  |   |   | Características fisiológicas de crecimiento a diferentes rangos de temperatura y pH                | Presencia o ausencia de crecimiento. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0   | Microsoft Excel.                                |
|  |   |   | Utilización de diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía.                   | Presencia o ausencia de crecimiento. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0   | Microsoft Excel.                                |
| Producción de compuestos bioactivos  | Presencia de zonas de inhibición de los platos con los microorganismos modelo | Diámetro de la zona de inhibición en milímetros   | Regla. Software estadístico.   |  |   |

Para conocer el peso de la materia orgánica (P8) se utilizó la siguiente operación:

$$P_8 = P_5 - P_7$$

Para calcular el porcentaje de la materia orgánica, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{materia orgánica} = \left( \frac{P_8}{P_7} \times 100 \right)$$

### 3.6.2. Determinación de la población de actinomicetes

En botellas con tapa rosca se colocaron 90 ml de agua de llave estéril junto con aproximadamente 20 esferas de vidrio y se llevó a esterilización a 121 °C por 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se dejó enfriar las botellas hasta una temperatura de 45°C. Posteriormente se pesaron 10 g de cada una de las muestras compuestas y se añadió a las botellas con agua de llave estéril (dilución 1/10), entonces las suspensiones de suelo fueron agitadas por 45 minutos. Una vez transcurrido éste tiempo se preparó la dilución 1/102, la que fue colocada en un baño maría a 55°C por 6 minutos. A partir de ésta se prepararon las diluciones 1/103, y 1/104. Cien microlitros (100 µl) de las diluciones 1/102, 1/103, y 1/104 fueron colocadas y extendidos por duplicado, sobre la superficie de cajas petri que contengan agar sucrosa aminoácido (ASA) y en agar extracto de levadura extracto de malta (GYM) (Anexo D), suplementado con nistatin, a una concentración de 75 µg/ml, y con rifampicina (5 µg/ml). El pH de los medios de aislamiento se ajustó a 5.5, utilizando una solución búfer con 0.1 M ácido cítrico y 0.2M fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Anexo D). Las cajas inoculadas fueron incubadas a 26°C por dos semanas. Luego de la incubación se procedió a contar el número de colonias de bacterias y de actinomicetes presentes en cada una de las cajas. Además se anotó también el número de colonias diferentes de actinomicetes para determinar su diversidad. El número de ufc por gramo de suelo fue calculado para aquella dilución en la que el número de colonias se encuentre en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/gsuelo} = \frac{N \times FD \times Vt}{Vi \times S}$$

**Dónde:**

- N** Número de colonias
- FD** Dilución en la cual se contó N (Ej: Conteo realizado en la dilución 1/10<sup>3</sup>, FD = 1x10<sup>3</sup>).
- Vt** Volumen de la dilución 1/10, en mililitros
- Vi** Volumen inoculado en mililitros
- S** Cantidad de suelo utilizada para preparar la dilución 1/10



Posteriormente se calculó el número de ufc/g suelo seco tomando en cuenta el valor del porcentaje de humedad. Finalmente, el porcentaje de actinomicetes fue calculado al dividir el número de colonias de actinomicetes para el número total de colonias presentes en el plato. Ese resultado fue multiplicado por cien para obtener el porcentaje.

### **3.6.3. Aislamiento y purificación de actinomicetes**

Los platos que presentaron crecimiento visible y diversidad de colonias de actinomicetes fueron escogidos para proceder con el aislamiento y purificación de las cepas. Con la ayuda de un palillo estéril se tomó parte de una colonia o micelio con esporas, para proceder a realizar estrías simples en platos tetrapetri que contenían agar GYM y agar ASA (Anexo D), ajustado a pH 5.5 en la forma descrita anteriormente. Los platos sembrados fueron incubados a 28°C por dos semanas. Aquellos cultivos que se encontraron puros fueron repicados en estrías compuestas en nuevos platos monopetri con agar GYM y ASA. Todos los cultivos contaminados fueron repicados hasta obtener cultivo puro.

### **3.6.4. Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de actinomicetes**

En primer lugar se prepararon suspensiones de esporas. Para ello, se usó un palillo de dientes estéril para raspar la superficie de las colonias con abundante crecimiento. El material obtenido fue transferido a un tubo que contenía 1000  $\mu$ l de agua de llave estéril. Las suspensiones de esporas fueron almacenadas en refrigeración a 4°C, hasta su posterior uso durante la realización de las pruebas de taxonomía numérica. La conservación a largo plazo de los actinomicetes aislados fueron realizados mediante la transferencia de material de cada colonia hacia un criovial que contenía 1 ml de glicerol al 20% (w/v). Los tubos preparados fueron almacenados en un congelador a -20°C.

### **3.6.5. Caracterización macroscópica**

Los cultivos puros obtenidos se agruparon de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias. Para la determinación del color del micelio del sustrato, micelio aéreo y pigmento difusible se utilizó una tabla estándar de colores (British Standard Specification for colours for identification coding and special purposes), en cultivos crecidos en agar GYM y agar ASA, luego de haber sido incubados a 28°C por siete días. Aquellos actinomicetes que presentaron características macroscópicas similares fueron ubicados en un mismo grupo de color. De todos los actinomicetes aislados en los grupos de color, se escogieron 98 representantes al azar para realizar las caracterizaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, en donde se incluyeron 8 repeticiones. Estos también fueron usados para la determinación de la actividad antimicrobiana,

### 3.6.6. Caracterización microscópica

La caracterización microscópica se realizó solamente a los actinomicetes representativos de cada grupo para ello con la ayuda de una pinza estéril se tomó un cubreobjetos previamente esterilizado y se lo colocó sobre aquellos cultivos que presentaron esporulación. El cubreobjetos se presionó sobre la colonia y se transfirió a un portaobjetos limpio, al que se le habían colocado dos gotas de esmalte transparente, para ayudar a fijar el cubreobjetos por las esquinas. El sellado completo de la muestra se obtuvo al colocar esmalte transparente en todos los bordes del cubreobjetos. Para la determinación del tipo de cadena de esporas, se procedió a observar cada cubreobjetos bajo el microscopio usando el lente de inmersión (100X). Los resultados se reportaron de acuerdo a las descripciones que se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 2. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas**

| <b>SIMBOLO</b> | <b>TIPO</b>     | <b>DESCRIPCION</b>  |
|----------------|-----------------|---|
| <b>S</b>       | Espiral         | Cadenas de esporas formando espirales abiertas o cerradas en el micelio aéreo |
| <b>R</b>       | Rectas          | Cadenas de esporas rectas, cortas o largas.                                   |
| <b>RA</b>      | Incompletas     | Cadenas de esporas en forma de ganchos, espirales incompletas, u onduladas.   |
| <b>E</b>       | Esporangios     | Estructuras en forma de saco o bolsa que contiene en su interior esporas.     |
| <b>M</b>       | Esporas simples | Esporas individuales aparecen en las hifas del micelio aéreo.                 |
| <b>S</b>       | Flexous         | Cadenas de esporas en forma sinuosa, no espiral.                              |

Fuente: Philips, 1994.

### 3.6.7. Pruebas Fenotípicas

#### 3.6.7.1. Rango de Crecimiento en Función de la Temperatura

Porciones de biomasa fueron tomadas con la ayuda de un palillo de dientes estéril, las que fueron transferidas a tubos de centrifugación de 1.5 ml que contenían 1 ml de agua de llave estéril. Cinco microlitros de la suspensión de cada cepa fueron inoculados sobre la superficie de agar GYM y ASA. Las cajas fueron incubadas a 50°C, 37°C, 28°C y 4°C durante 2, 4, 7 y 30 días, respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las cajas para

observar el crecimiento de los actinomicetes, mediante código binario. Si el actinomicete presentó crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

### **3.6.7.2. Rango de crecimiento en Función del pH**

Se inocularon 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar GYM y ASA, ajustado a los pHs 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, y 9.5. El pH fue ajustado con la ayuda de sistemas de búferes (Anexo D), para así evitar cambios en el pH debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas se incubaron a 26°C durante 10 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes, mediante código binario. Si el actinomicete presenta crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0. Además, los cultivos fueron clasificados de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH. Aquellos que crecieron desde 4.5 hasta 6.5 fueron considerados como acidofilicos, aquellos que lo hicieron entre 4.5 hasta 7.5 como neutrotolerantes, mientras que si presentaron crecimiento entre 4.5 hasta 8.5 o 9.5 se los clasificó como alcalitolerantes.

### **3.6.7.3. Aminoácidos como Fuentes de Carbono y Nitrógeno**

Se determinó la capacidad de utilización de distintos aminoácidos y compuestos orgánicos con nitrógeno, como fuentes de carbono y nitrógeno por los actinomicetes. Para ello se utilizaron los siguientes compuestos: quitina, lisina, cisteína, leucina, glicina, tirosina, urea, valina, treonina, arginina, asparagina, phenilalanina, alanina, histidina, ácido aspártico, y ácido glutámico. Estos fueron añadidos a un medio basal (Anexo D), que no contenía ninguna fuente de carbono ni de nitrógeno. Sobre la superficie de cada medio de cultivo se inocularon 5 µl de las suspensiones de biomasa. Las cajas se incubaron durante siete días a 26°C. Posteriormente, se evaluaron tomando en cuenta la presencia o ausencia de crecimiento. Si el actinomicete presentó crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

### **3.6.8. Determinación de la actividad antimicrobiana**

#### **3.6.8.1. Selección y Preparación de los cultivos de actinomicetes**

Con los resultados obtenidos en la taxonomía numérica, se tomaron 106 representantes de los grupos-especie visualizados en los dendrogramas. El punto de corte fue establecido en el 90% de similitud. El número de representantes fue proporcional al número total de miembros de cada grupo. Los microorganismos seleccionados fueron usados para determinar la capacidad de cada uno para producir compuestos bioactivos de interés en Biotecnología. Los actinomicetes fueron crecidos en agar GYM y ASA, de tal manera que el micelio cubra por completo la superficie del medio de cultivo. Para ello, los platos fueron incubados a 28°C por 10 a 15 días.

### **3.6.8.2. Preparación de los platos con los microorganismos modelo**

Inicialmente, cultivos de los hongos fitopatógenos *Botrytis* y *Fusarium* y de dos bacterias, una gram positiva y la otra gram negativa, fueron crecidos en PDA y AN (Anexo D), respectivamente. En el caso de los hongos, los microorganismos fueron incubados a 26°C por 7 días provocando la esporulación, mientras que las bacterias fueron incubadas a 28°C por 4 días. Una vez obtenido los cultivos de cada microorganismo, se prepararon los platos siguiendo la técnica detallada por Phillips (1994).

La primera etapa consistió en preparar suspensiones con las estructuras reproductivas de los hongos y bacterias. Para cada microorganismo, se raspó la superficie del medio de cultivo, con la ayuda de un asa de transferencia estéril. El material recogido, ya sea esporas o células fue transferido a un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina estéril. A partir de éste se realizaron diluciones seriadas. Con la ayuda de un hemocitómetro, en el caso de hongos, y una placa para conteo de bacterias (Petroff-Hausser chamber), se determinó la concentración inicial de cada uno de los microorganismos en las suspensiones. Posteriormente, con éstos valores se calculó el volumen de inóculo necesario para obtener concentraciones finales de  $1 \times 10^6$  células/ml de AN para bacterias, y  $1 \times 10^3$  esporas/ml de PDA para los hongos fitopatógenos. El volumen calculado fue trasferido asépticamente a medio de cultivo estéril, enfriado previamente a 50°C. Las botellas fueron agitadas hasta obtener una suspensión uniforme de esporas o células, y el medio vertido en cajas monopetri estériles, cuidando que el espesor del medio sea uniforme.

### **3.6.8.3. Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica**

Utilizando un sacabocados de 8 mm de diámetro, se extrajeron bloques cilíndricos de partes del micelio de cada uno de los representantes de los grupos especie. La profundidad del medio donde se extrajeron los bloques fue la misma en todos los casos. Luego se depositaron los bloques sobre la superficie de los platos de cultivo que contenían a los microorganismos modelo, colocando la parte del crecimiento del actinomicete en contacto con el medio, para así permitir una difusión más rápida de los metabolitos producidos. Además se prepararon platos en los que se colocaron círculos de papel con nistatin (100\_ug/ml) y rifampicina (50\_ug/ml), como control experimental, para los ensayos de hongos y bacterias, respectivamente. Los platos preparados fueron incubados a 26°C por 7 días, y los perfiles de actividad antagónica se determinaron midiendo los diámetros de las zonas de inhibición, en milímetros, de aquellos actinomicetes que mostraron actividad antimicrobiana

### 3.7. Plan de procesamiento de la información

#### 3.7.1. Población y diversidad de actinomicetes

Con los números de ufc/g de muestra, con los datos de diversidad y porcentaje de colonias se procedió a realizar un análisis de varianza para establecer si existen diferencias significativas, en cuyo caso se procedió a realizar la separación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

##### a. Tratamientos

Se estudiaron 8 tratamientos (Tabla 3), producto de la combinación de los dos factores en estudio, el lugar de recolección de la muestra de suelo, y el tipo de medio de cultivo (Tabla 4).

**Tabla 3. Tratamientos en estudio**

| Tratamientos | Factor A:                   | Factor B:         |
|--------------|-----------------------------|-------------------|
|              | Lugares de Recolección      | Medios de Cultivo |
| a0b0         | Tosagua (Cultivos de arroz) | GYM               |
| a0b1         | Tosagua (Cultivos de arroz) | ASA               |
| a1b0         | Cotopaxi (Bosque de pinos)  | GYM               |
| a1b1         | Cotopaxi (Bosque de pinos)  | ASA               |
| a2b0         | Misahualli (Selva)          | GYM               |
| a2b1         | Misahualli (Selva)          | ASA               |
| a3b0         | San Francisco (Selva)       | GYM               |
| a3b1         | San Francisco (Selva)       | ASA               |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla 4. Factores en estudio**

| Factor A: Lugar de Recolección |                             |
|--------------------------------|-----------------------------|
| a0                             | Tosagua (Cultivos de arroz) |
| a1                             | Cotopaxi (Bosque de pinos)  |
| a2                             | Misahualli (Selva)          |
| a3                             | San Francisco (Selva)       |
| Factor B: Medios de Cultivo    |                             |
| b0                             | GYM                         |
| b1                             | ASA                         |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

##### b. Diseño Experimental

Se implementó un diseño completo al azar con 2 repeticiones. Además, se realizó un análisis de varianza para la población de actinomicetes (ufc/g), porcentaje y diversidad de actinomicetes. La información obtenida experimentalmente mediante el proceso de investigación fue procesada y analizada en base a un estudio estadístico empleando el programa MSTAT. En caso de

encontrar diferencias significativas entre los tratamientos se procedió a separar las medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia. El esquema del análisis de varianza se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5. Esquema del análisis de varianza**

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|---------------------|--------------------|
| Factor A            | (a - 1)            |
| Factor B            | (b - 1)            |
| AB                  | (a - 1) (b - 1)    |
| Error               | ab x (r - 1)       |
| Total               | (r x t) - 1        |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

### 3.7.2. Taxonomía Numérica de Datos Fenotípicos

Se usaron 23 pruebas fenotípicas para el cálculo de la similaridad mediante el coeficiente de simple coincidencia ( $S_{SM}$ ) (Rodríguez *et al.*, 2001). Las pruebas usadas fueron: pH desde 3.5, 4.5, 6.5, 7.5, 8.5, hasta 9.6. Temperatura de crecimiento a 4°C. Fuentes únicas de carbono y nitrógeno de: quitina, lisina, cisteína, leucina, glicina, tirosina, urea, valina, treonina, arginina, asparagina, phenilalanina, alanina, histidina, ácido aspártico, y ácido glutámico. Con los resultados de las pruebas fenotípicas se construyó una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas. Posteriormente la información fue procesada en el software estadístico NTSys, en el que primeramente se calcularon los porcentajes de similaridad entre los actinomicetes estudiados. Finalmente los porcentajes fueron utilizados para construir un dendrograma basado en la similaridad entre los microorganismos. Una vez obtenido éste gráfico, se procedió a identificar los grupos especie basados en un coeficiente de similaridad del 90%.

### 3.7.3. Determinación de la actividad antimicrobiana

El único factor correspondió a los actinomicetes representantes de los grupos especie del dendrograma de taxonomía numérica de datos fenotípicos. Se realizó un diseño completo al azar con 2 repeticiones. El esquema del análisis de varianza se encuentra en la Tabla 5. Solamente aquellos actinomicetes que presentaron actividad antimicrobiana fueron considerados en el análisis final, y cada uno fue considerado como un tratamiento. La única variable evaluada fue el diámetro de la zona de inhibición, en milímetros. La separación de medias fue realizada al encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, usando la prueba de Tukey al 5% de significancia. Además, a los actinomicetes se los clasificó de acuerdo al tipo de actividad antagonista. Aquellos considerados como bactericidas presentaron inhibición solamente a las bacterias Gram+ y Gram-, pero no a los hongos. Los actinomicetes con actividad antifúngica solamente afectaron a *Botrytis* y *Fusarium*, pero no a las bacterias. Finalmente, los que presentaron amplio espectro inhibieron el crecimiento de tanto de bacterias como de hongos.

**Tabla 5. Esquema del análisis de varianza**

| Fuente de variación | Grados de libertad |   |
|---------------------|--------------------|---|
| Repeticiones        | $(r - 1)$          | 1 |
| Tratamientos        | $(t - 1)$          | X |
| Error               | $(r - 1) (t - 1)$  | 1 |
| Total               | $(r \times t) - 1$ | Z |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011.

X = Los tratamientos para cada organismo de prueba varían puesto que no todos mostraron antagonismo para todos los microorganismos modelo.

## CAPITULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1. Análisis de los Resultados

##### 4.1.1 Recolección de Información

##### 4.1.1.1. Caracterización físico-química de las muestras

En la Tabla A1 (Anexo A) muestra los resultados de la caracterización físico-química de los aislamientos. Obteniendo como resultado de pH en Misahualli 5,4, en Cotopaxi 5,9, en San Francisco 4,8 y en Tosagua 7,2. Claramente se nota que el único suelo que no tiene características ácidas es el recolectado en Tosagua, el mismo que presenta un valor neutro. En lo referente a la humedad, Misahualli y San Francisco mostraron valores de 33.41% en el primer caso y 30.49% en el segundo, mientras que para Cotopaxi se calculó un porcentaje de humedad de 25.08%. Solamente en la muestra recolectada en Tosagua se obtuvo una humedad baja (10.95%).

Finalmente, el porcentaje de materia orgánica en las cuatro muestras fue alto, así, para Misahualli fue del 12.08%, 19.36% para Cotopaxi, 10.59% en el caso de Tosagua y 12.56% en San Francisco.

##### 4.1.2. Determinación de la población de microorganismos y porcentaje y número de colonias diferentes de actinomicetes

Los resultados del conteo del número de colonias de bacterias, actinomicetes y colonias diferentes de actinomicetes se muestran en las Tablas A2, A3, y A4 (Anexo A). Por otro lado, la Tabla A5 muestra el porcentaje de actinomicetes por sitio de recolección y medio de cultivo. Todas las determinaciones fueron realizadas en la dilución  $1/10^3$ . La Tabla A6 y A7 muestran el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco, de bacterias totales y actinomicetes, para cada uno de los sitios de recolección y medios de cultivos estudiados.

El análisis de varianza para el número total de bacterias (Tabla B1, Anexo B), muestra diferencias altamente significativas para el factor A (sitios de recolección), factor B (medios de cultivo) y para la interacción AB. El coeficiente de variación fue 3,16%. La separación de medias para el número de ufc/g de suelo seco, para el factor A se muestra en la Tabla B2 (Anexo B). La mayor población fue calculada para la muestra de suelo correspondiente a San Francisco ( $2.17 \times 10^7$  ufc/g), mientras que el valor más bajo fue encontrado en el suelo del Cotopaxi ( $6.75 \times 10^6$  ufc/g). Para el factor B (medios de cultivo) se encontró que el medio agar sucrosa aminoácidos (ASA), permitió el crecimiento de un mayor número de bacterias ( $1.92 \times 10^7$  ufc/g). En agar glucosa extracto de malta y levadura (GYM) crecieron  $1.34 \times 10^7$  ufc/g de suelo seco. Finalmente, la Tabla B3 (Anexo B) muestra la separación de medias de los tratamientos. Se



obtuvieron siete niveles de significancia, en donde el tratamiento a2b1 (Misahualli + ASA), mostró el número más alto de ufc/g de bacterias por suelo seco ( $2.98 \times 10^7$ ), mientras que el número más bajo se obtuvo para el tratamiento a1b1, en donde se calcularon solamente  $3.18 \times 10^6$  ufc/g.

El análisis de varianza para el número total de actinomicetes (Tabla B4, Anexo B), muestra diferencias altamente significativas para el factor A (sitios de recolección), factor B (medios de cultivo) y para la interacción AB. El coeficiente de variación fue 6.20%. La separación de medias para el número de ufc/g de actinomicetes por suelo seco, para el factor A se muestra en la Tabla B5 (Anexo B). La mayor población fue calculada para la muestra de suelo correspondiente a Tosagua ( $1.06 \times 10^7$  ufc/g), mientras que el valor más bajo fue encontrado en el suelo de Misahualli ( $3.87 \times 10^6$  ufc/g). Para el factor B (medios de cultivo) se encontró que el medio glucosa extracto de malta y levadura (GYM), permitió el crecimiento de un mayor número de bacterias ( $1.49 \times 10^7$  ufc/g). En agar sucrosa aminoácidos (ASA) crecieron  $2.19 \times 10^6$  ufc/g de suelo seco. Finalmente, la Tabla B6 (Anexo B) muestra la separación de medias de los tratamientos. Se obtuvieron cuatro niveles de significancia, en donde el tratamiento a0b0 (Tosagua + GYM), mostró el número más alto de ufc/g de actinomicetes por suelo seco ( $1.93 \times 10^7$ ), mientras que el número más bajo se obtuvo para el tratamiento a2b1, en donde se calcularon solamente  $1.02 \times 10^6$  ufc/g.

El análisis de varianza para el porcentaje de actinomicetes (Tabla B7, Anexo B), muestra diferencias altamente significativas para el factor A (sitios de recolección), factor B (medios de cultivo) y para la interacción AB. El coeficiente de variación fue 6.20%. La separación de medias para el número de ufc/g de actinomicetes por suelo seco, para el factor A se muestra en la Tabla B8 (Anexo B). El porcentaje mayor fue obtenido para la muestra de suelo correspondiente a Cotopaxi (70.32%), mientras que el valor más bajo fue encontrado en el suelo de Misahualli (51.72%). Para el factor B (medios de cultivo) se encontró que el medio glucosa extracto de malta y levadura (GYM), permitió el crecimiento de un mayor porcentaje de actinomicetes (97.99%). En agar sucrosa aminoácidos (ASA) el porcentaje fue mucho menor (17.68%). Finalmente, la Tabla B9 (Anexo B) muestra la separación de medias de los tratamientos. Se obtuvieron cuatro niveles de significancia, en donde los tratamientos a0b0 (Tosagua + GYM), y a2b0 (Misahualli + GYM) mostraron los porcentajes más altos de actinomicetes (100%), mientras que el porcentaje más bajo se obtuvo para el tratamiento a2b1 (Misahualli + ASA), en donde se obtuvo solamente un 3.45% de actinomicetes.

El análisis de varianza para la diversidad de actinomicetes (Tabla B10, Anexo B), no muestra diferencias altamente significativas para el factor A (sitios de recolección), ni para la interacción AB, sin embargo indica diferencias altamente significativas para el factor B (medios de cultivo). El coeficiente de variación fue 39.13%. La separación de medias para la diversidad de actinomicetes, para el factor B (medios de cultivo) se encontró que el medio glucosa extracto de malta y levadura (GYM), permitió la mayor diversidad de actinomicetes (9.25). En agar sucrosa aminoácidos (ASA) la diversidad fue mucho menor (5.37).

#### **4.1.2.1. Aislamiento y purificación de actinomicetes**

En la Figura C1 (Anexo C), se observa el número de actinomicetes aislados de acuerdo al lugar de recolección. La Tabla A8 (Anexo A), muestra los resultados de la purificación de los 207 microorganismos, obteniendo de esta manera 52 actinomicetes en Misahualli (selva), 49 en Tosagua (arroz), 55 en San Francisco (selva), 51 en Cotopaxi (pinos).

#### **4.1.2.2. Almacenamiento conservación y codificación de los cultivos puros de actinomicetes**

Los resultados del almacenamiento y conservación de los cultivos puros de los actinomicetes se muestra en la Tabla A9 (Anexo A), para aquello se procedió a codificar a cada uno de los actinomicetes utilizando los códigos del Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH, siendo el código inicial DCB-1400. Además se adjuntó información acerca de las características del aislamiento, tales como código original, medio de aislamiento, pH del medio, lugar de aislamiento y observaciones.

#### **4.1.3. Caracterización Fenotípica**

##### **4.1.3.1. Caracterización macroscópica**

En la Tabla A10 (Anexo A) se muestra la caracterización macroscópica de los doscientos siete actinomicetes utilizados en el estudio. Se obtuvieron setenta y nueve grupos de color, de los cuales veinte y ocho estuvieron formados por un solo individuo, mientras que los grupos restantes presentaron dos o más miembros. La mayoría de los grupos de actinomicetes presentaron micelio aéreo únicamente tres grupos no presentaron micelio aéreo (los grupos 6, 16 y 66) en sus colonias, lo que representa que seis actinomicetes no mostraron ésta característica. A partir de estos se escogieron 98 actinomicetes representantes de cada uno de los grupos de color (Tabla A10), para la realización de los estudios posteriores,

##### **4.1.3.2. Caracterización microscópica**

En las Figuras C2 (Anexo C), se observan los resultados de la caracterización microscópica que se realizó solo a noventa y ocho actinomicetes, ya que se tomó únicamente los representantes de cada grupo. La Tabla A11 (Anexo A), muestra que sesenta y uno actinomicetes presentaron cadenas rectas, veinte y ocho mostraron cadenas incompletas, seis cadenas simples y tres cadenas espirales.

##### **4.1.3.3. Rango de Crecimiento en Función de la Temperatura**

En la Figura C3 (Anexo C) se observa el crecimiento de los actinomicetes a diferentes temperaturas. Todos los cultivos estudiados crecieron a 28°C y a 37°C, solo existió diferencia en el crecimiento a 4°C, ya que solo treinta y uno crecieron a esta temperatura. Es importante

anotar que ningún cultivo creció a 50°C. Los resultados se muestran en la Tabla A12 (Anexo A), en la matriz de datos fenotípicos.

#### **4.1.3.4. Rango de Crecimiento en Función del pH**

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla A12 (Anexo A), se determinó que cincuenta y ocho actinomicetes crecieron en un pH de 3.5, ochenta y seis a 4.5, noventa y ocho a 5.5, noventa y siete a 6.5, noventa y siete a 7.5, ochenta y uno a 8.5 y sesenta y nueve a 9.5 como se indica en la Figura C4 (Anexo C).

#### **4.1.3.5. Determinación del Uso de Diferentes Fuentes de Carbono y Nitrógeno**

En la Figura C5 (Anexo C) se detalla el número de actinomicetes que presentaron crecimiento en los medios que contenían las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. De esta manera, de los ciento seis actinomicetes utilizados, noventa y tres en Quitina (Qui), noventa y seis en Lisina (Lys), noventa y siete en Cisteína (Cis), ochenta y siete en Leucina (Leu), noventa y tres en Glicina (Gly), ochenta y siete en Tirosina (Try), noventa y dos en Urea, noventa y dos en Valina (Val), noventa y siete en Treonina (Tre), ochenta y nueve en Arginina (Arg), ochenta y nueve en Asparagina (Asn), ochenta y cuatro en Phenilalanina (Phe), noventa en Alanina (Ala), ochenta y siete en Histidina (His), setenta y cuatro en ácido aspártico (Asp) y ochenta y siete aislamientos crecieron en ácido glutámico (Glu).

#### **4.1.3.6. Taxonomía numérica de datos fenotípicos**

En la Figura C6 (Anexo C), se puede observar el dendrograma realizado a partir de las pruebas taxonómicas. Se ubicaron 22 grupos-especie en base a la similaridad del 90% (Figura C7, Anexo C). De éstos, 7 fueron multimiembros y 15 de un solo miembro. El grupo más numeroso estuvo integrado por 35 individuos. Los resultados se muestran en la Tabla A13 (Anexo A).

#### **4.1.4. Determinación de la actividad antimicrobiana**

De los noventa y ocho representantes, cincuenta y cuatro actinomicetes no presentaron ninguna actividad antagónica en contra de los microorganismos modelo usados en la presente investigación (Tabla A14 Anexo A). De los cuarenta y cuatro que presentaron actividad (Tabla A15, Anexo A). Se encontró que uno de los actinomicetes presentó amplio espectro de actividad, ya que logró inhibir el crecimiento de los cuatro microorganismos modelo. Se pudo identificar los siguientes resultados: anti-*Botrytis* nueve, anti-*Fusarium* dos, anti Gram- diez, anti Gram+ tres, Bactericida siete, Fungicida cinco, y otros tipos siete (Figura C8, Anexo C).

#### **4.1.4.1. Actividad en contra de la Bacteria Gram negativa (G-)**

Veinte y dos actinomicetes mostraron actividad en contra de la bacteria Gram negativa (Tabla A16, Anexo A). La Tabla B11 (Anexo B) muestra el análisis de varianza, en el cual se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos. La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en diez niveles como se muestra en la Tabla B12 (Anexo B). El tratamiento 17 (DCB-1579) produjo la zona de inhibición más grande con 23.00 mm de diámetro mientras que el tratamiento 9 (DCB-1512R) presentó la zona más pequeña con 8.5 mm. Ocho actinomicetes produjeron una zona de inhibición más grande que el tratamiento 25 que corresponde al control experimental con rifampicina (5 µg/ml).

#### **4.1.4.2. Actividad en contra de la Bacteria Gram positiva (G+)**

Diecisiete actinomicetes mostraron inhibición frente a la Bacteria Gram positiva (Tabla A17, Anexo A). El análisis de varianza (Tabla B13, Anexo B) mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos. La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en ocho niveles como se indica en la Tabla B14 (Anexo B). El tratamiento 12 (DCB-1580) produjo la zona de inhibición más grandes con 23.5 mm de diámetro mientras que el tratamiento 2 (DCB-1490) presentó la zona más pequeña con 11.0 mm. Tres actinomicetes produjeron una zona de inhibición más grande que los tratamientos 18 y 17 que corresponde a los controles experimentales con rifampicina (5 µg/ml).

#### **4.1.4.3. Actividad en contra de *Fusarium***

Once cultivos de actinomicetes presentaron actividad antagónica frente al hongo fitopatógeno *Fusarium* (Tabla A18, Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos como se indica en la Tabla B15 (Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5% (Tabla B16, Anexo B) dividió a los tratamientos en seis niveles. El tratamiento 11 que pertenece al control experimental con nistatín (75 µg/ml) produjo la zona de inhibición más grande con 43.5 mm de diámetro mientras que el tratamiento 4 (DCB-1486) presentó la zona más pequeña con 10.0 mm.

#### **4.1.4.4. Actividad en contra de *Botrytis***

Veinte y dos cultivos de actinomicetes presentaron antagonismo frente al hongo fitopatógeno *Botrytis* (Tabla A19, Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla B17, Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 2 niveles como se muestra en la Tabla B18 (Anexo B). El tratamiento 0 (DCB-1402), produjo la zona de inhibición más grande con 43.0mm igual que el tratamiento 22 que pertenece al control experimental con nistatin (75 µg/ml). El tratamiento 19 (DCB-1593) presentó la zona más pequeñas con 13.0 mm.

## **4.2. Interpretación de Datos**

### **4.2.1. Determinación de la población de actinomicetes**

La diversidad de actinomicetes encontrados en los distintos lugares de recolección es muy amplia. En los diferentes suelos se encontraron en casi todos los tipos y bajo condiciones extremas disminuyendo levemente la concentración de la población. El número de ufc por gramo de suelo fue calculado en la dilución  $1/10^3$  en la que el número de colonias se encontró en un rango entre 30 hasta 300, estudios realizados por otros investigadores (Tate 2000), demuestran que el número de actinos varía en gran proporción según el caso, pero es común encontrarlos en suelos fértiles con concentraciones de  $1/10^3$  a  $1/10^5$  ufc por gramo de suelo seco. En la Tabla A8 (Anexo A), podemos observar los lugares de recolección, medio y pH con los que se trabajaron aislando un total de 207 actinomicetes

Por lo general se aíslan cepas de actinomicetos en la superficie del suelo y en profundidades entre 2 y 15 cm, más allá de esta profundidad disminuye la cantidad de éstos. El tamaño de la comunidad depende del tipo del suelo, particularmente de algunas de las características físicas, del contenido de materia orgánica y del pH del medio ambiente.

### **4.2.2. Caracterización Fenotípica**

El reconocimiento macroscópico se realizó teniendo en cuenta factores claves y propios de este tipo de microorganismos. Las colonias crecidas presentaban bordes no regulares y se encontraban fuertemente adheridas a la superficie del medio, mostrando una consistencia dura y compacta.

Las cepas evaluadas presentaban variedad de colores de micelio, principalmente del micelio aéreo, mostrando pigmentaciones que variaron en los tonos manilla, vellum, beige, grey, biscuit y white principalmente como se indica en la Tabla A10 (Anexo A), Estas coloraciones no mostraron ser exclusivas del micelio, sino que se difundieron en el medio, alterando la coloración del mismo. La variedad de colores refleja la presencia de diversas especies y también la capacidad de estos microorganismos de producir pigmentos melanoideos, tal como lo reporto Fialho De Oliveira (2003), quien encontró compartimentos macroscópicos similares.

Al observar la Figura C2 (Anexo C), se nota claramente que la mayoría de actinos aislados cadenas rectas, mientras que aquellos diferentes fueron muy pocos, esto concuerda con lo reportado por (Lo, 2002; García, 2005), quienes manifiestan que los actinomicetes son microorganismos que crecen usualmente por la formación de filamentos muy ramificados (desarrollo miceliar). Muchos de estos organismos pueden formar ciertas estructuras llamadas esporas, así como también unas más especializadas llamadas esporangios. Algunas de estas esporas pueden ser móviles por flagelos mientras que otras son inmóviles. Presentan una

diversidad considerable desde formas bacilares hasta formas filamentosas ramificadas, terminando en una esporulación compleja

Los rangos de temperatura afecta en gran cantidad a la actividad microbiana y a la velocidad de degradación. En nuestra investigación el rango de crecimiento en función de la temperatura mostró que todos los cultivos crecieron a 28 y 37°C, esto coincide con lo publicado por (Ramírez *et al.*, 2004), quienes manifiestan que las especies de bacterias generalmente crecen a temperaturas limitadas. Las bacterias mesófilas crecen en un rango de temperatura de entre 15 y 45°C, tienen un óptimo crecimiento entre 25 y 35°C y constituyen la mayor parte de microorganismo del suelo. Mientras que a 4°C solo se desarrollaron treinta y un cultivos, como se observa en la Tabla A12 (Anexo A). Las bacterias psicrófilas crecen en temperaturas menores a 20°C, estos microorganismos que habitan en estos ambientes extremos son llamados extremófilos, y poseen características bioquímicas y metabólicas que les permiten vivir en hábitats poco comunes, resultando ser microorganismos muy útiles para el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos

Al observar la Figura C4 (Anexo C), identificamos que la mayoría de actinomicetes crecieron en los diferentes rangos de pHs, teniendo un crecimiento óptimo en pH de 5.5 a 7.5 en el cual se desarrollaron todos los cultivos. La gran mayoría de aminoácidos fueron usados como fuentes de carbono y nitrógeno por parte de casi todos los actinomicetes. No se encontraron grandes diferencias en la utilización de los mismos, la única excepción fue el ácido aspártico (Asp), el cual fue usado solamente por 74 actinos de los 98 utilizados, como se observa en la Figura C5 (Anexo C), otros estudios (Franco *et al.*, 2009), han demostrado que la capacidad de los actinomicetes de reproducirse por conidias han hecho que puedan encontrarse en muchas condiciones adversas, como temperatura, pH y salinidad, entre otras y desarrollarse bien.

#### **4.2.3.1. Taxonomía numérica de datos fenotípicos**

Se usaron 23 pruebas fenotípicas para el análisis de similaridad mediante el coeficiente de simple coincidencia ( $S_{SM}$ ); a pesar del número tan bajo de pruebas, se ubicaron 22 grupos – especie en base a similaridades muy altas (90%). Obteniendo así 7 grupos multimiembros y 15 grupos de un solo miembro. La diversidad fenotípica en los suelos tiene dos implicaciones importantes. La primera es ecológica y es positiva, pues la mayor diversidad fenotípica podrá favorecer la mayor capacidad de los actinomicetes para tolerar los efectos de factores adversos bióticos y abióticos, los cuales constantemente inciden en la sobrevivencia de estos microorganismos en los diferentes suelos. Se considera que la mayor diversidad fenotípica en características adaptativas ventajosas para la especie son una condición necesaria para su supervivencia y evolución (Padilla *et al.*, 2002).

#### **4.2.4. Determinación de la actividad antimicrobiana**

En la determinación de la actividad antimicrobiana se trabajó con 98 representantes utilizados en la taxonomía numérica, realizando las pruebas de antagonismo frente a dos bacterias una Gram

positiva y Gram negativa; así como en contra de dos hongos *Fusarium* y *Botrytis*, demostrando la capacidad de inhibición en contra de estos microorganismos. Un total de 44 actinos presentaron actividad antimicrobiana (Tabla A15, Anexo A), existieron actinomicetes que inhibieron el crecimiento en contra de las bacterias y varios de ellos presentaron actividad también contra los hongos. El tamaño de los halos de inhibición fue medido. En el caso de la bacteria Gram - la cepa 1579 mostro tener un gran potencial antagónico evidente por su crecimiento, presentado un halo de inhibición de 23.00 mm de diámetro, por el contrario la cepa 1512 mostró un halo de inhibición mucho más pequeño de 8.5 mm. La cepa 1580 formó un halo de inhibición de 23.5 mm en contra de la bacteria Gram + mientras que las cepas 1560, 1543 y 1490 mostraron un halo de inhibición más pequeño de 11.00 mm de diámetro respectivamente. En el caso de *Fusarium* el control experimental con nistatín (75 µg/ml) fue el que presento el mayor halo de inhibición con 43.5 mm mientras que la cepa 1486 presentó la zona más pequeña con 10.0 mm. Finalmente la cepa 1402 al igual que el control experimental con nistatin (75 µg/ml) produjeron el halo de inhibición más grande con 43.00 mm de diámetro contra *Botrytis* y la cepa 1593 presentó la zona más pequeñas con 13.00 mm. El análisis individual de la inhibición muestra resultados interesantes, ya que en todos los casos es posible encontrar actinomicetes que produjeron zonas de inhibición iguales e incluso superiores a los controles experimentales con antibióticos, esto concuerda con lo investigado por (Farfán & Gutiérrez, 2009), quienes manifiestan que el tamaño de la zona de inhibición depende de ciertas propiedades fisicoquímicas del antibiótico que influyen sobre la velocidad de difusión en agar y no están necesariamente relacionadas con la actividad terapéutica del antibiótico.

#### **4.2.5. Discusión general del trabajo investigativo**

Los actinomicetes son microorganismos que presentan una gran diversidad metabólica. Al encontrarse distribuidos en toda la naturaleza constituyen el ecosistema más estable y sustentable dentro del entorno natural. Teniendo presente la capacidad de producción de antibióticos que generan algunas especies de este grupo de microorganismos, la presente investigación se desarrolló con el propósito de encontrar actinomicetes que produzcan nuevos compuestos bioactivos como es la producción de antibióticos. De esta manera, se aprovechará su potencial en varios ámbitos de la industria, agricultura y biotecnología.

Al realizar la caracterización fisico-química de los aislamientos se obtuvo que para Misahualli, San Francisco y Cotopaxi, el pH es ácido y para la muestra de Tosagua el pH es relativamente neutro, a pesar de esto los actinomicetes aislados a partir de esta muestra crecieron abundantemente en un pH ácido de 5.5. En la determinación del porcentaje de humedad se encontró que las muestras de Misahualli, San Francisco y Cotopaxi se encontraba en valores mayores al 25%, mientras que la muestra recolectada en Tosagua presentó una porcentaje relativamente bajo de 10.95%. El porcentaje de materia orgánica para las cuatro muestras fue alta, esto se debe a que la materia orgánica es uno de los componentes más importantes del

suelo, principalmente en nuestro caso ya que las muestras fueron aisladas de lugares donde existía gran cantidad de raíces y raicillas en las inmediaciones de la toma de muestras.

El análisis estadístico del número total de bacterias presenta diferencias altamente significativas. La separación de medias por la prueba de Tukey al 5% en el Factor A, nos dió como mejor resultado el tratamiento a3 San Francisco ( $2.17 \times 10^7$  ufc/g), el cual presentó la mayor población, mientras que el valor más bajo fue encontrado en el tratamiento a1 del Cotopaxi ( $6.75 \times 10^6$  ufc/g), para el Factor B se encontró que el tratamiento b1 medio agar sucrosa aminoácidos (ASA), permitió el crecimiento de un mayor número de bacterias ( $1.92 \times 10^7$  ufc/g); la Interacción AB dividió a los tratamientos en siete niveles. El tratamiento a2b1 (Misahualli – ASA), presentó el número más alto de ufc/g de bacterias por suelo seco, mientras que el tratamiento a1b1 (Cotopaxi – ASA), en donde se calcularon solamente  $3.18 \times 10^6$  ufc/g.

El análisis estadístico del número total de actinomicetes presenta diferencias altamente significativas. La separación de medias por la prueba de Tukey al 5% en el Factor A, nos dió como mejor resultado el tratamiento a0 Tosagua ( $1.06 \times 10^7$  ufc/g), mientras que el valor más bajo fue encontrado en el tratamiento a2 Misahualli ( $3.87 \times 10^6$  ufc/g), para el Factor B se encontró que el tratamiento b0 medio glucosa extracto de malta y levadura (GYM), permitió el crecimiento de un mayor número de actinomicetes ( $1.49 \times 10^7$  ufc/g); finalmente la Interacción AB dividió a los tratamientos en cuatro niveles, en donde el tratamiento a0b0 (Tosagua + GYM), mostró el número más alto de ufc/g de actinomicetes por suelo seco ( $1.93 \times 10^7$ ), mientras que el número más bajo se obtuvo para el tratamiento a2b1 (Misahualli –ASA), en donde se calcularon solamente ( $1.02 \times 10^6$  ufc/g). Lo cual indica claramente que el mayor porcentaje de actinomicetes se encontraron en los suelos recolectados de Tosagua, mientras que el mejor medio de cultivo para trabajar con estos microorganismo es agar extracto de levadura extracto de malta (GYM), esto se puede observar claramente en la Tabla B9 (Anexo B).

El análisis de varianza para la diversidad de actinomicetes, no mostró diferencias altamente significativas en el factor A (sitios de recolección), ni para la interacción AB, sin embargo indica diferencias altamente significativas para el factor B (medios de cultivo). La separación de medias para la diversidad de actinomicetes, para el factor B (medios de cultivo) se encontró que el medio glucosa extracto de malta y levadura (GYM), permitió la mayor diversidad de actinomicetes (9.25).

En la presente investigación se aislaron y purificaron un total de 207 actinomicetes, obteniendo de esta manera 52 actinomicetes en Misahualli, 49 en Tosagua, 55 en San Francisco y 51 en Cotopaxi, como se indicó en la Tabla A8 (Anexo A).

Una vez obtenidos los cultivos puros de actinomicetes, se realizó la caracterización macroscópica lo que permitió clasificarlos por grupos de color a estos microorganismos de los cuales se sacaba representantes dependiendo del número de actinos que conformaba un grupo. Por ejemplo, el grupo número uno está conformado por cuatro actinomicetes entonces se



tomaba dos representantes de dicho grupo. Es así que para las pruebas taxonómicas se utilizaron noventa y ocho representantes de los doscientos siete actinomicetes, permitiendo tanto una optimización en el uso de los recursos y materiales, así como también un ahorro económico importante.

En la última etapa de la investigación se realizaron las pruebas de antagonismo frente a una bacteria Gram positiva, Gram negativa y dos hongos *Fusarium* y *Botrytis*; los cuales presentaron una gran capacidad para producir antibióticos. La mayoría de los actinomicetes presentaron actividad específica, dando los siguientes resultados nueve anti-*Botrytis*, dos anti-*Fusarium*, diez anti Gram-, tres anti Gram+, siete Bactericida, cinco Fungicida y siete otros tipos, es importante recalcar que de los cuarenta y cuatro actinomicetes a penas unos presentó amplio espectro de actividad siendo capaz de inhibir el crecimiento de los cuatro microorganismos modelos, este actino fue el DCB-1594, aislado de los suelos de Misahualli en el agar sucrosa aminoácidos ASA.

Los actinomicetes que solo actúan como bactericidas podrían desarrollar un producto farmacéutico de uso humano, la producción de enzimas, de aminoácidos, de nucleótidos, de ciertas vitaminas, porque probablemente el compuesto solo ataca a células procariontas. Es claro indicar que la elaboración de estos productos llevaría años realizarlo, sin embargo estos estudios pueden contribuir con investigaciones futuras. Por otro lado, la actividad antagónica específica en contra de *Botrytis* y *Fusarium*, dos hongos fitopatógenos de gran importancia comercial en agricultura, podría abrir un nuevo campo en la fabricación de bioproductos que sean altamente efectivos.

El presente trabajo ha aportado con resultados precisos en desarrollo de una metodología adecuada para la recolección, aislamiento y determinación de actinomicetes acidofílicos en distintos lugares de nuestro país, además de la selección de representantes de los mismos para la determinación de la producción de antibióticos; es así que por la notable capacidad de inhibición es necesario ampliar el estudio de este grupo de microorganismos que son fundamentales en la composición del ecosistema del suelo y que por su capacidad de producir antibióticos son necesarios para aplicaciones médicas, en los campos de la sanidad animal, la agricultura y un interés significativo en el avance de la biotecnología.

### **4.3. Verificación de Hipótesis**

#### **4.3.1. Hipótesis nula (H0)**

Los actinomicetes acidofílicos aislados de diferentes suelos no producen compuestos bioactivos.

#### **4.3.2. Hipótesis alternante (H1)**

Los actinomicetes acidofílicos aislados de diferentes suelos producen compuestos bioactivos.

Después de realizar el análisis de antagonismo microbiano, “se acepta la hipótesis alternante ( $H_1$ )” afirmando que los actinomicetes acidofílicos aislados de diferentes suelos producen compuestos bioactivos.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- En la investigación se realizó el aislamiento selectivo de actinomicetes a partir de diferentes muestras de suelos de Misahualli (selva), Cotopaxi (pinos), San Francisco (selva) y Tosagua (arroz). De esta manera se obtuvieron 207 actinomicetes acidofílicos puros con los cuales se realizaron las posteriores pruebas.
- Se determinó la capacidad de crecimiento de los actinomicetes representantes en distintas pruebas tales como características macroscópicas y microscópicas, rangos de crecimiento en diferentes pHs y temperaturas, y la utilización de diferentes aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno. Este procedimiento permitió formar una matriz binaria para caracterizar numéricamente los aislamientos utilizando el coeficiente simple de similaridad.
- En la taxonomía numérica de datos fenotípicos, los noventa y ocho cultivos de actinomicetes representantes de los doscientos siete estudiados fueron ubicados en veinte y dos grupos especie. El punto de corte de la similaridad de grupo fue del 90%. Siete grupos estuvieron formados por más de un miembro, mientras que el resto presentaron solamente uno. El grupo más numeroso estuvo integrado por 35 individuos.
- Se determinó la capacidad de producción de antibióticos de los actinomicetes acidofílicos aislados de las diferentes muestras de suelos mediante las pruebas de antagonismo realizadas en el laboratorio. De esta manera se obtuvo que uno de los actinomicetes presentó amplio espectro de actividad, ya que logró inhibir el crecimiento de los cuatro microorganismos modelo, nueve anti-*Botrytis*, dos anti-*Fusarium*, diez anti Gram-, tres anti Gram+, siete Bactericida, cinco Fungicida y siete de otros tipos. Además muchos de los antibióticos producidos por los actinomicetes acidofílicos fueron igual o más eficientes que los antibióticos usados como control experimental.
- Con los estudios realizados en la presente investigación se puede aportar para el avance de la biotecnología debido a que la biodiversidad de los actinomicetes acidofílicos existentes es muy amplia y muy importante para el desarrollo de nuevos productos como antibióticos.

#### 5.2. Recomendaciones

- Realizar dereplicación (es el proceso de análisis de las muestras estudiadas en un proceso de selección, con el fin de reconocer y eliminar de la consideración aquellas muestras que ya se estudiaron, una herramienta útil de selección de representantes para

determinar la producción de nuevos compuestos bioactivos útiles en biotecnología) de cultivos puros de actinomicetes obtenidos en experimentos de aislamiento selectivo para la búsqueda de compuestos bioactivos. De esta manera, se lograría un ahorro en recursos económicos y humanos durante el proceso de búsqueda de metabolitos útiles en biotecnología mediante selección de microorganismos por taxonomía numérica.

- Determinar la estructura química y concentración de los metabolitos secundarios obtenidos a partir del antagonismo microbiano para posteriores aplicaciones biotecnológicas.
- Realizar la caracterización molecular, es decir el secuenciamiento de las distintas cepas utilizadas en el estudio, principalmente de aquellas que produjeron metabolitos secundarios para ubicarlas en grupos ya existentes o para saber si se está tratando con una nueva especie.
- Realizar una fermentación líquida con los actinomicetes productores de metabolitos secundarios para la obtención de un bioproducto. Luego de las pruebas de laboratorio, realizar pruebas de campo para conocer la efectividad de los compuestos bioactivos en condiciones reales para el control de enfermedades principalmente en plantas de interés agrícola.

## **CAPITULO VI**

### **PROPUESTA**

#### **6.1. Datos Informativos**

##### **6.1.1. Título**

Aislamiento y Caracterización de actinomicetes acidofílicos recolectados de cultivos de arroz de los Suelos de Tosagua utilizando medios de cultivo específicos para la búsqueda de compuestos bioactivos.

##### **6.1.2. Institución Ejecutora**

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH). Universidad Técnica de Ambato (UTA).

##### **6.1.3. Beneficiarios**

Investigadores y estudiantes de Universidades y Escuelas Politécnicas del país. Centros de Investigaciones en Biotecnología.

##### **6.1.4. Ubicación**

ESPOCH. Panamericana Sur Km. 1.5. Riobamba.

UTA. Colombia S/N y Chile. Ciudadela Ingahurco. Ambato.

##### **6.1.5. Tiempo Estimado para la Ejecución**

Seis meses

##### **6.1.6. Equipo Técnico Responsable**

Docentes, Investigadores y Estudiantes trabajando en experimentos de aislamientos selectivo para la búsqueda de microorganismos útiles en biotecnología.

#### **6.2. Antecedentes de la Propuesta**

Actualmente, el aislamiento y caracterización de cultivos puros de ciertas especies microbianas son métodos importantes para entender la existencia objetiva de los mismos en los ecosistemas naturales. Uno de los objetivos de estudio acerca de la biodiversidad de actinomicetes acidofílicos, es utilizar procedimientos eficaces de aislamiento para conocer la distribución de estos microorganismos en varios ambientes climáticos y ecológicos. Todos estos estudios proporcionan una guía teórica para la explotación y utilización de los recursos que nos ofrece

este conjunto de microorganismos. El estudio “Determinación de la producción de antibióticos por actinomicetes acidófilos”, demostró que existen actinomicetes que son capaces de crecer en condiciones bajas de pH los mismos que pueden producir compuesto bioactivos como antibióticos usando taxonomía numérica de datos fenotípicos. La ejecución de esta metodología significaría un ahorro considerable de recursos económicos, ya que permite disminuir de manera considerable en el número de actinomicetes acidófilos que se usarían en la determinación de la producción de antibióticos, sin tener riesgos como realizar un muestreo erróneo, y garantizando tanto la calidad microbiológica de los cultivos como la detección del tipo de antibióticos producidos. Además se obtuvo datos acerca de la distribución geográfica de éstos microorganismos, aportando con una guía para la explotación y utilización de los recursos biogénéticos que nos ofrece nuestro país

### **6.3. Justificación**

Es importante realizar esta investigación, debido a la gran diversidad metabólica de este grupo de microorganismos, que constituye el ecosistema más estable y sustentable dentro del hábitat natural, especialmente del suelo, en donde exhiben su actividad biológica. Los actinomicetes acidófilos son ampliamente conocidos por su enorme capacidad de producir metabolitos secundarios tales como los antibióticos u otros compuestos que han demostrado muchas aplicaciones medicinales, terapéuticas y agroquímicas.

La finalidad de esta investigación es conocer la capacidad de producción de metabolitos secundarios a partir de los actinomicetes acidófilos presentes en los suelos de la región Costa, específicamente en los cultivos de arroz de los suelos Tosagua utilizando el medio glucosa extracto de malta y levadura (GYM), el cual presento excelentes resultados en cuanto a porcentaje y diversidad en experimentos realizados en el Departamento de Ciencias Biológicas de la ESPOCH (DCB-ESPOCH).

Los antibióticos conforman la parte primordial de las aplicaciones industriales de los actinomicetes. Estas moléculas de origen natural manifiestan a bajas concentraciones actividades biológicas de naturaleza principalmente antibacteriana, antifúngica, anticancerosa, antiviral o antiparasitaria. Si bien los antibióticos son conocidos en primer lugar por sus aplicaciones médicas, presentan también un interés significativo en los campos de la sanidad animal, de la cría y de la agricultura.

### **6.4. Objetivos**

#### **6.4.1. Objetivo General**

- Determinar la capacidad de producción de compuestos bioactivos a partir de actinomicetes acidófilos.

#### **6.4.2. Objetivos Específicos**

- Determinar la población y diversidad de actinomicetes acidofílicos presentes en cultivos de arroz de los suelos de Tosagua.
- Caracterizar fenotípicamente los cultivos de los actinomicetes acidofílicos aislados.

#### **6.5. Análisis de Factibilidad**

La viabilidad de la “Aislamiento y Caracterización de actinomicetes acidofílicos recolectados de cultivos de arroz de los Suelos de Tosagua utilizando medios de cultivo específicos para la búsqueda de compuestos bioactivos” se asegura con los resultados obtenidos en la investigación “*Determinación de la producción de antibióticos por actinomicetes acidofílicos*”. Además, el cumplimiento adecuado de los objetivos específicos planteados en ésta propuesta garantizará el cumplimiento del objetivo general.

Por otro lado, los siguientes resultados de la investigación en la que se basa la propuesta, permiten que los resultados de la presente propuesta sean alcanzados sin ningún inconveniente.

- La mayor cantidad de actinomicetes acidofílicos fue encontrado en los cultivos de arroz en los Suelos de Tosagua, además el mejor medio de cultivo fue el agar glucosa extracto de malta y levadura (GYM), asegurando una gran diversidad y porcentaje de dichos microorganismos.
- La selección de los grupos taxonómicos en los datos fenotípicos fue realizado con un porcentaje de similitud de más del 85%, valor que es elevado y que asegura que todos los individuos dentro del grupo posean las características morfológicas y fisiológicas prácticamente similares.
- La parte de la fundamentación legal, que regula el acceso y uso responsable de la biodiversidad con fines de bioprospección.

#### **6.6. Fundamentación**

La investigación “*Determinación de la producción de antibióticos por actinomicetes acidofílicos*”, es la base científica que permite la formulación de la presente propuesta.

#### **6.7. Metodología – Modelo Operativo**

##### **6.7.1. Población y muestra**

Se tomarán muestras individuales correspondientes a cultivos de arroz de los suelos de Tosagua en la Provincia de Manabí. Con la ayuda de un barreno estéril, se recolectarán los primeros 20 cm de suelo.

Las muestras serán transferidas asépticamente a frascos estériles para su transporte. Una vez que estas estén en el laboratorio, se procederá a homogeneizarlas, mediante el uso de un mortero y pistilo, esterilizados con alcohol al 70%. Las muestras homogeneizadas serán almacenadas en frascos estériles.

## **6.7.2. Plan de Recolección de la Información**

### **6.7.2.1. Caracterización físico-química de las muestras**

#### **6.7.2.2. Determinación del pH**

Se colocarán 5 gramos de suelo en un vaso de precipitación y se añadirá agua destilada hasta obtener una película de aproximadamente 1 cm de altura sobre el suelo. La suspensión se agitará por varios minutos y posteriormente se dejará reposar durante media hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, utilizando un pHmetro calibrado, y sin agitar la muestra, se tomarán cinco lecturas de pH, con las cuales se realizará el promedio y se obtendrá el valor final.

#### **6.7.2.3 Determinación del porcentaje de humedad**

Para la determinación de humedad, se pesará una cápsula de porcelana previamente esterilizada con alcohol (P1). Utilizando las muestras homogeneizadas, se colocará una cierta cantidad de suelo en la cápsula (P2), y se llevará a la estufa a 105°C por 24 horas. Para obtener el peso de la muestra de suelo tomada (P3) se utilizará la siguiente expresión:

$$P_3 = P_2 - P_1$$

Una vez transcurrido el tiempo establecido se sacará la muestra de la estufa y se dejará enfriar al ambiente por unos minutos hasta obtener una temperatura uniforme. Se pesará nuevamente la cápsula (P4) y para obtener el valor del peso seco de la muestra (P5), se realizará la siguiente operación:

$$P_5 = P_4 - P_1$$

Para calcular el porcentaje de humedad, se usará la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = 100 - \left( \frac{P_5}{P_3} \times 100 \right)$$

#### **6.7.2.4. Determinación del porcentaje de materia orgánica**

El envase obtenido en el paso anterior se llevará a la mufla a 405°C por tres horas. Una vez transcurrido este tiempo se sacará la muestra de la mufla y se dejará al ambiente hasta que se establezca la temperatura y se volverá a pesar (P6). Para obtener el valor del peso del suelo luego del tratamiento en la mufla, es decir sin materia orgánica (P7), se realizará la siguiente operación:



$$P_7 = P_6 - P_1$$

Para conocer el peso de la materia orgánica (P8) se utilizará la siguiente operación:

$$P_8 = P_5 - P_7$$

Para calcular el porcentaje de la materia orgánica, se utilizará la siguiente fórmula:

$$\% \text{materia orgánica} = \left( \frac{P_8}{P_7} \times 100 \right)$$

#### 6.7.5. Determinación de la población de actinomicetes

En botellas con tapa rosca se colocarán 90 ml de agua de llave estéril junto con aproximadamente 20 esferas de vidrio y se llevará a esterilización a 121 °C por 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se dejará enfriar las botellas hasta una temperatura de 45°C. Posteriormente se pesarán 10 g de cada una de las muestras compuestas y se añadirá a las botellas con agua de llave estéril (dilución 1/10), entonces las suspensiones de suelo serán agitadas por 45 minutos. Una vez transcurrido éste tiempo se preparará la dilución 1/10<sup>2</sup>, la que será colocada en un baño maría a 55°C por 6 minutos. A partir de ésta se prepararán las diluciones 1/10<sup>3</sup>, y 1/10<sup>4</sup>. Cien microlitros (100 µl) de las diluciones 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup>, y 1/10<sup>4</sup> serán colocadas y extendidos por duplicado, sobre la superficie de cajas petri que contengan agar extracto de levadura extracto de malta (GYM), suplementado con nistatin, a una concentración de 75 µg/ml, y con rifampicina (5 µg/ml). El pH de los medios de aislamiento se ajustará a 5.5, utilizando una solución búfer con 0.1 M ácido cítrico y 0.2M fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Las cajas inoculadas serán incubadas a 26°C por dos semanas. Luego de la incubación se procederá a contar el número de colonias de bacterias y de actinomicetes presentes en cada una de las cajas. Además se anotará también el número de colonias diferentes de actinomicetes para determinar su diversidad. El número de ufc por gramo de suelo será calculado para aquella dilución en la que el número de colonias se encuentre en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/gsuelo} = \frac{N \times FD \times Vt}{Vi \times S}$$

**Dónde:**

**N** Número de colonias

**FD** Dilución en la cual se contó N (Ej: Conteo realizado en la dilución 1/10<sup>3</sup>, FD = 1x10<sup>3</sup>).

- Vt** Volumen de la dilución 1/10, en mililitros
- Vi** Volumen inoculado en mililitros
- S** Cantidad de suelo utilizada para preparar la dilución 1/10

Posteriormente se calculará el número de ufc/g suelo seco tomando en cuenta el valor del porcentaje de humedad. Finalmente, el porcentaje de actinomicetes será calculado al dividir el número de colonias de actinomicetes para el número total de colonias presentes en el plato. Ese resultado será multiplicado por cien para obtener el porcentaje.

#### **6.7.6. Aislamiento y purificación de actinomicetes**

Los platos que presenten crecimiento visible y diversidad de colonias de actinomicetes serán escogidos para proceder con el aislamiento y purificación de las cepas. Con la ayuda de un palillo estéril se tomará parte de una colonia o micelio con esporas, para proceder a realizar estrías simples en platos tetrapetri que contenga agar GYM, ajustado a pH 5.5 en la forma descrita anteriormente. Los platos sembrados serán incubados a 28°C por dos semanas. Aquellos cultivos que se encuentren puros serán repicados en estrías compuestas en nuevos platos monopetri con agar GYM. Todos los cultivos contaminados serán repicados hasta obtener cultivo puro.

#### **6.7.7. Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de actinomicetes**

En primer lugar se prepararán suspensiones de esporas. Para ello, se usará un palillo de dientes estéril para raspar la superficie de las colonias con abundante crecimiento. El material obtenido será transferido a un tubo que contenga 1000  $\mu$ l de agua de llave estéril. Las suspensiones de esporas serán almacenadas en refrigeración a 4°C, hasta su posterior uso durante la realización de las pruebas de taxonomía numérica. La conservación a largo plazo de los actinomicetes aislados serán realizados mediante la transferencia de material de cada colonia hacia un criovial que contenga 1 ml de glicerol al 20% (w/v). Los tubos preparados serán almacenados en un congelador a -20°C.

#### **6.7.8. Caracterización Fenotípica**

##### **6.7.8.1. Caracterización macroscópica**

Los colores del micelio del sustrato y esporas serán determinados usando una tabla estándar de colores (British Standard Specification for colours for identification coding and special purposes), en cultivos que hayan crecido en agar extracto de levadura extracto de malta (GYM). Además se reportará la presencia o ausencia de micelio aéreo en las colonias. La producción de pigmentos difusibles se determinará creciendo los cultivos en agar GYM. En todos los casos, los platos serán incubados a 28°C por siete días.

### **6.7.8.2. Caracterización microscópica**

La determinación de la morfología del micelio aéreo será determinada solamente en aquellos cultivos que presenten crecimiento de ésta estructura en sus colonias. Para ello se usarán cubreobjetos estériles. Con la ayuda de una pinza, serán colocados sobre el micelio aéreo de las colonias. De ésta manera, parte del micelio se pegará sobre la superficie del cubreobjetos. Éste último será colocado sobre un portaobjetos limpio. Finalmente, con la ayuda de un microscopio se determinará el tipo de estructura.

### **6.7.8.3. Rango de Crecimiento en Función de la Temperatura**

Se inocularán 5 µl de las suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar GYM. Las cajas se incubarán a 50°C, 37°C y 4°C durante 2, 4 y 30 días, respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes y se evaluará mediante código binario. Si el actinomicete presenta crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

### **6.7.8.4. Rango de Crecimiento en Función del pH**

Se inocularán 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar GYM ajustado a los siguientes pHs: 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, y 9.5. Las cajas se incubarán a 26°C durante 10 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes y se evaluará mediante código binario. Si el actinomicete presenta crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

### **6.7.8.5. Aminoácidos como Fuentes de Carbono y Nitrógeno**

Para probar la capacidad de utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, se utilizarán distintos aminoácidos. Para la preparación del medio de cultivo se utilizará un medio basal. Sobre la superficie del medio se inocularán 5 µl de la suspensión de esporas. Las cajas se incubarán a 28°C durante 48 horas. Se evaluará tomando en cuenta la presencia o ausencia de crecimiento. Si el actinomicete presenta crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

### **6.7.8.6. Análisis de Datos Fenotípicos**

Con los resultados de las pruebas fenotípicas se construirá una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas. Posteriormente la información será procesada en el software estadístico NTSys, en el que primeramente se calcularán los porcentajes de similaridad entre los actinomicetes estudiados. Finalmente, con la ayuda del mismo programa se procederá a obtener un dendrograma basado en la similaridad entre los

microorganismos. Una vez obtenido éste gráfico, se procederá a identificar los grupos especie basados en un coeficiente de similitud mayor al 90%.

## 6.8. Administración

| INDICADORES A MEJORAR   | SITUACIÓN ACTUAL  | RESULTADOS ESPERADOS  | ACTIVIDADES   | RESPONSABLES   |
|---|---|---|---|--|
| Búsqueda de nuevos compuestos bioactivos a partir de actinomicetes acidofílicos seleccionados por taxonomía numérica. | Búsqueda de compuestos bioactivos a partir de actinomicetes acidofílicos. | <p>Ahorro de tiempo y recursos económicos al realizar la caracterización fenotípica a cada uno de los actinomicetes acidofílicos.</p> <p>Identificación de compuestos bioactivos a partir de actinomicetes acidofílicos seleccionados por la caracterización fenotípica</p> | <p>Caracterización macroscópica de los aislamientos.</p> <p>Caracterización microscópica de los aislamientos que presentan esporulación.</p> <p>Crecimiento de los cultivos en distintas temperaturas, pHs y distintas fuentes de carbono y nitrógeno</p> | <p>Docente</p> <p>Investigador</p> <p>Estudiante</p> |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

## 6.9. Previsión de la Evaluación

| PREGUNTAS BÁSICAS           | EXPLICACIÓN  |
|-----------------------------|--|
| ¿Quiénes solicitan evaluar? | Docentes<br>Investigador   |
| ¿Por qué evaluar?           | Proporciona información sobre nuevos compuestos bioactivos a partir de actinomicetes acidofílicos aislados a partir de muestras de arroz de los suelos de Tosagua. |
| ¿Para qué evaluar?          | Para identificar los grupos-especie basados en la similaridad que permitan seleccionar actinomicetes acidofílicos que producen metabolitos secundarios.            |
| ¿Qué evaluar?               | Datos obtenidos a partir de la taxonomía numérica  |
| ¿Quién evalúa?              | Docente  |
| ¿Cuándo evaluar?            | Al finalizar la Caracterización Fenotípica   |
| ¿Cómo evaluar?              | Revisando los datos obtenidos previo a la realización de una matriz en código binario.   |
| ¿Con qué evaluar?           | Programa NTSys.  |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

#### 4.4. Bibliografía

- BERGEY, D., 1989**, Manual of Systematic Bacteriology. USA, Volumen (4) Editorial Board.
- BERRONES, G., 2008**, Tesis para Ingeniero Agrónomo. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo  
“Determinación de la Actividad Antimicrobiana de Actinomicetes Aislados de Sedimentos de la Laguna de Colta y suelos de sus alrededores”.
- BOK, S.; SEIDMAN, M. & WOPAT, P., 1984**, Selective Isolation of Acidophilic Streptomyces Strains for Glucose Isomerase Production. Applied and Environmental Microbiology. Volumen (47), N° 6. 1213-1215.
- BULL, A.; WARD, A. & GOODFELLOW, M., 2000**, Search and Discovery Strategies for Biotechnology the Paradigm Shift. Microbiology and Molecular Biology Reviews, **64(3)**:573-606.
- BROCK, T.; SMITH, D. & MADIGAN, M., 1987**, Microbiología. Cuarta edición. Pearson Prentice Hall Panamericana, México. 86-92:245-250
- CAPELLA, A., 1971**, Microbiología de Zinsser. Cuarta Edición. Editorial Hispano-Americana, México. 1318-1319.
- CORTEZ, C., 1998**, Tesis para Ingeniero Agrónomo. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo  
“Aislamiento, Caracterización Morfología y Evaluación Preliminar de la Actividad Antagónica de Actinomicetes de la rizósfera de *Culcitium rufescens* (oreja de conejo) y *Stipa ichu* (paja) en suelos del Chimborazo.
- CRAWFORD, D.; LYNCH, J., WHIPPS, J., & OUSLEY, M., 1993**, Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a Fungal Root Pathogen. Applied and Environmental Microbiology. Volumen (59), N° 11. 3899-3905.
- CHO, S., HAN, J., SEONG CH. & KIM, S., 2006**, Phylogenetic Diversity of Acidophilic Sporoactinobacteria Isolated from various soils. The Microbiological Society of Korea. Volumen (44), N° 6. 600-606.
- CHO, S., HAN, J., KO, H. & KIM, S., 2008**, *Streptacidiphilus anmyonensis* sp. nov., *Streptacidiphilus rugosus* sp. nov., and *Streptacidiphilus melanogenes* sp. nov., acidophilic actinobacteria isolated from Pinus soils. Antonie van Leeuwenhoek, 58:1566-1570.
- FARFAN, D. & GUTIERREZ, C., 2009**, Tesis para Ingeniero Industrial. Pontificia Universidad Javeriana “Determinación de la actividad quitinolítica de cepas nativas de actinomicetes y su efecto antagónico sobre microorganismos fitopatógenos”.

- FRANCO, M., GOMEZ, D., CASTRO, N. & RENDON, M., 2009**, Polihidroxicanoatos en actinomicetes nativos de suelos colombianos. *Biología - Revista Peruana*. **16(1)**: 115-118.
- GARCÍA, F., 2005**, Bacteriología Médica. Centro de Investigación en enfermedades tropicales de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, **1**:1-4.
- GOODFELLOW, M., 1988**, Numerical Taxonomy and Selective Isolation of Industrially Important Actinomycetes. *Actinomycetología*, **2(1)**:13-29.
- HAGEDORN, CH., 1976**, Influences of Soil Acidity on Streptomyces Populations Inhabiting Forest Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. Volumen (32), N° 3. 368-375.
- HAYAKAWA, M.; OTOGURO, M.; TAKEUCHI, T.; YAMAZAKI, T. & IMURA, Y., 2000**, Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. Cooperative Research and Development Center and Department of Applied Chemistry and Biotechnology Yamanashi University, Japan.
- HOLT, J.; KRIEG, N.; SNEATH, P.; STALEY, J. & WILLIAMS, S., 1984**, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition, Williams & Wilkins Editorial, London. **607**: 611-612.
- HUANG, Y.; CUI, Q.; WANG, L.; RODRIGUEZ, C., QUINTANA, E., GOODFELLOW, M. & LIU, Z., 2004**, *Streptacidiphilus jiangxiensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in China. **86**: 159-165.
- JUAREZ, A., 2004**, Biolixiviación de minerales sulfuro ferroso en jales. Aislamiento y Caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima.
- KIM, S.; LONSDALE, J.; SEONG, C. & GOODFELLOWS, M., 2003**, *Streptacidiphilus* gen. nov. acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek*, **83**: 107-116
- KIM, S., SEONG, CH., JEON, S., BAE, K. & GOODFELLOW, M., 2004**, Taxonomic Study of neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* **54**: 211-214.
- LAM, K., 2006**, Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, **9**:245-251
- LAZZARINI, A., CAVALETTI, L.; TOPPO, G. & MARINELLI, F., 2000**, Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**:399-405.
- LEVEAU, J. & BOUIX, M., 2000**, Microbiología Industrial, Los microorganismos de interés industrial. Primera Edición. Editorial Acribia, España. 417-442: 455-469.



- LO, C., LAI, N., CHEAH, H., WONG, N. & HO, C., 2002**, Actinomicetes isolated from soil samples from the Crocker range Sabah. *Review of Biodiversity and Environmental Conservation*, **2**:1–3.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J. & PARKER, J., 1998**, Brock Biología de los Microorganismos. Octava Edición. Pearson Educación, S.A, España. 518-554:716-737.
- MANZANO, C.; LANDA, A.; CALVA, D. & LEHMAN, M., 1999**, Un Método Simple para la medida de halos de difusión en cultivos biológicos. Software Integral para Laboratorio Sofilab S.A. de C.V, Lisboa 14A – México DF.
- MAGARVEY, N.; KELLER, J.; BERNAN, V.; DWORKIN, M. & SHERMAN, D., 2004**, Isolation and Characterization of Novel Marine – Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. *American Society for Microbiology*, **12**:7520–7529.
- MATTAR, S. & MARTINEZ, P., 2007**, Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología, **11(1)**:23–35.
- MERINO, L.; DE LA CASA, A.; TORRES, M. & AZNAR, J., 2007**, Detección de Resistencia inducible a clindamicina en aislados cutáneos de *Staphylococcus ssp.* por métodos fenotípicos y genotípicos. Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla – España. **25(2)**:77–81.
- OBREGON, G. & ZAVALA, A., 1998**, Evaluación de la Calidad de Diseño de Sensibilidad Antimicrobiana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* ISSN, 1726 – 4634.
- OLIVA, F.; CACERES, M. & FRONT, X., 2003**, Congreso Nacional de Estadística de Investigación Operativa del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Barcelona, **8**:1-1.
- OLIVEIRA, F., 2003**, Tesis para Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Javeriana “Identificación y Caracterización de Actinomicetes aislados de procesos de Compostaje”.
- PADILLA, J.; GONZALES, E. ; ESQUIVEL, F. ; MERCADO, E.; HERNANDEZ, S. & MAYER, N., 2002**, Caracterización de germoplasma sobresaliente de guayaba de la Región Calvillo Cañones, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, **25(4)**:393-399.
- PELCZAR, M.; ROGER, P. & CHAIN, E., 1982**, Microbiología. Segunda edición. Editorial Hispano-Americana. México.
- PHILLIPS, L., 1993**, Seminario sobre actinomicetes. Versión traducida, Xenova, Ecuador. 1-2:18-19.
- PHILLIPS, L., 1994**, Manual de Actinomicetes. 150.

- RAMIREZ, N.; SANDOVAL, AH. & SERRANO, JA., 2004**, Bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. Microbiología. Revista Sociedad Venezolana. Vol(24), N°1-2. ISSN 1315-2556.
- RODRIGUEZ, C.; WARD, A. & GOODFELLOW, M., 2000**, Nuevos formularios de medios de cultivo para el aislamiento de actinomicetes acidofílicos del suelo y caracterización de nuevas especies de *Streptacidiphilus griseisporus* sp. nov. *Streptacidiphilus griseusb* sp., *Streptacidiphilus luteialbus* sp. nov. y *Streptacidiphilus thailandesis* sp. nov. Escuela Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).
- RODRIGUEZ, M.; ALVAREZ, S. & BRAVO, E., 2001**, Taxonomía Numérica. Primera edición. Editorial Plaza y Valdés, México. 19-26.
- RODRIGUEZ, V., 2002**, Environmental genomics, the big picture? Universidad Miguel Hernandez San Juan de Alicante España.
- RODRIGUEZ, C., 2008**, Tabla estándar de colores. "British Standard Specification for colours for identification coding and special purposes"
- STANIER, R.; ADELBERG, E. & INGRAHAM, J., 1986**, Microbiología. Cuarta edición. Ediciones Repla, México. 101-105.
- TATE, RL., 2000**, Soil Microbiology. Second edition. Wiley, New York, 47-56.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K & SWINGS, J., 1996**, Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. Microbiological Reviews, **60(2)**:407-438.
- WANG, L.; HUANG, Y.; LIU, Z.; GOODFELLOW, M. & RODRIGUEZ, C., 2006**, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *Streptacidiphilus oryzae* sp. nov., an actinomycete isolated from rice – field soil in Thailand. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. **56**:1257-1260.

**ANEXO A**  
**DATOS**  
**EXPERIMENTALES**

**Tabla A1. Características Físico-Químicas de los Suelos**

| <b>Características Físico-Químicas</b> |                   |                      |                |                 |
|--|-------------------|----------------------|----------------|-----------------|
| <b>Zonas</b>                           | <b>MISAHUALLI</b> | <b>SAN FRANCISCO</b> | <b>TOSAGUA</b> | <b>COTOPAXI</b> |
| <b>pH</b>                              | 5,4               | 7,2                  | 4,8            | 5.9             |
| <b>Porcentaje de humedad</b>           | 33,416%           | 10,950%              | 32,493%        | 25,085%         |
| <b>Porcentaje de materia orgánica</b>  | 12,089%           | 10,591%              | 12,562%        | 19,367%         |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A2. Número de colonias de bacterias (dilución 1/10<sup>3</sup>)**

| <b>Lugar de Recolección</b> | <b>GYM</b> |           | <b>ASA</b> |           |
|-----------------------------|------------|-----------|------------|-----------|
|                             | <b>R1</b>  | <b>R2</b> | <b>R1</b>  | <b>R2</b> |
| COTOPAXI                    | 77         | 76        | 22         | 25        |
| MISAHUALLI                  | 58         | 54        | 251        | 245       |
| SAN FRANCISCO               | 128        | 130       | 192        | 203       |
| TOSAGUA                     | 196        | 186       | 178        | 175       |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A3. Número de colonias de actinomicetes (dilución 1/10<sup>3</sup>)**

| <b>Lugar de Recolección</b> | <b>GYM</b> |           | <b>ASA</b> |           |
|-----------------------------|------------|-----------|------------|-----------|
|                             | <b>R1</b>  | <b>R2</b> | <b>R1</b>  | <b>R2</b> |
| COTOPAXI                    | 75         | 71        | 12         | 9         |
| MISAHUALLI                  | 58         | 54        | 8          | 9         |
| SAN FRANCISCO               | 125        | 124       | 26         | 17        |
| TOSAGUA                     | 196        | 186       | 22         | 17        |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A4. Número de colonias diferentes de actinomicetes (dilución 1/10<sup>3</sup>)**

| Lugar de Recolección | GYM |    | ASA |    |
|----------------------|-----|----|-----|----|
|                      | R1  | R2 | R1  | R2 |
| COTOPAXI             | 15  | 6  | 6   | 3  |
| MISAHUALLI           | 4   | 4  | 5   | 5  |
| SAN FRANCISCO        | 15  | 11 | 7   | 7  |
| TOSAGUA              | 7   | 12 | 5   | 5  |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A5. Porcentaje de actinomicetes (dilución 1/10<sup>3</sup>)**

| Lugar de Recolección | GYM    |        | ASA   |       |
|----------------------|--------|--------|-------|-------|
|                      | R1     | R2     | R1    | R2    |
| COTOPAXI             | 97,4%  | 93,4%  | 54,5% | 36,0% |
| MISAHUALLI           | 100,0% | 100,0% | 3,2%  | 3,7%  |
| SAN FRANCISCO        | 97,7%  | 95,4%  | 13,5% | 8,4%  |
| TOSAGUA              | 100,0% | 100,0% | 12,4% | 9,7%  |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A6. Número de ufc de bacterias por gramo de suelo seco (ufc/g suelo seco)**

| Lugar de Recolección | GYM      |          | ASA      |          |
|----------------------|----------|----------|----------|----------|
|                      | R1       | R2       | R1       | R2       |
| COTOPAXI             | 10407906 | 10272738 | 2973687  | 3379190  |
| MISAHUALLI           | 6967897  | 6487352  | 30154175 | 29433358 |
| SAN FRANCISCO        | 17064897 | 17331536 | 25597345 | 27063860 |
| TOSAGUA              | 19809096 | 18798428 | 17989893 | 17686693 |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A7. Número de ufc de actinomicetes por gramo de suelo seco (ufc/g suelo seco)**

| Lugar de Recolección | GYM      |          | ASA     |         |
|----------------------|----------|----------|---------|---------|
|                      | R1       | R2       | R1      | R2      |
| COTOPAXI             | 16895951 | 16760783 | 3514358 | 2297849 |
| MISAHUALLI           | 6967897  | 6487352  | 961089  | 1081225 |
| SAN FRANCISCO        | 16664938 | 16531619 | 3466307 | 2266432 |
| TOSAGUA              | 19809096 | 18798428 | 2223470 | 1718136 |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A8. Aislamiento de Actinomicetes Acidofilicos**

| Lugar de Recolección | Medio | pH  | Código | Observación       |
|----------------------|-------|-----|--------|-------------------|
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 1      | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 2      | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 3      | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 4      | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 5      | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 6      | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 7      | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 8      | Bacteria Pura     |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 9      | Bacteria Pura     |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 10     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 11     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 12     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 13     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 14     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 15     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 16     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 17     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 18     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 19     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 20     | Bacteria Pura     |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 21     | Bacteria Pura     |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 22     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 23     | Sin contaminación |
| MISAHUALLI           | GYM   | 5,5 | 24     | Sin contaminación |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A8. Continuación...**

| <b>Lugar de Recolección</b> | <b>Medio</b> | <b>pH</b> | <b>Código</b> | <b>Observación</b> |
|-----------------------------|--------------|-----------|---------------|--------------------|
| MISAHUALLI                  | GYM          | 5,5       | 25            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | GYM          | 5,5       | 26            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | GYM          | 5,5       | 27            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | GYM          | 5,5       | 28            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | GYM          | 5,5       | 29            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | GYM          | 5,5       | 30            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | GYM          | 5,5       | 31            | Bacteria Pura      |
| MISAHUALLI                  | GYM          | 5,5       | 32            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | GYM          | 5,5       | 33            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | GYM          | 5,5       | 34            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 35            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 36            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 37            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 38            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 39            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 40            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 41            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 42            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 43            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 44            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 45            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 46            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 47            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 48            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 49            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 50            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 51            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 52            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 53            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 54            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 55            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 56            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 57            | Bacteria Pura      |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 58            | Sin contaminación  |
| MISAHUALLI                  | ASA          | 5,5       | 59            | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 60            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 61            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 62            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 63            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 64            | Sin contaminación  |

**Tabla A8. Continuación...**

| <b>Lugar de Recolección</b> | <b>Medio</b> | <b>pH</b> | <b>Código</b> | <b>Observación</b> |
|-----------------------------|--------------|-----------|---------------|--------------------|
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 65            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 66            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 67            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 68            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 69            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 70            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 71            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 72            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 73            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 74            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 75            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 76            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 77            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 78            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 79            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 80            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 81            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 82            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 83            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 84            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 85            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 86            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 87            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 88            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 89            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 90            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 91            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 92            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 93            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 94            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 95            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 96            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 97            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 98            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | GYM          | 5,5       | 99            | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 100           | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 101           | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 102           | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 103           | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 104           | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 105           | Sin contaminación  |



**Tabla A8. Continuación...**

| <b>LUGAR DE RECOLECCIÓN</b> | <b>MEDIO</b> | <b>PH</b> | <b>CÓDIGO</b> | <b>OBSERVACIÓN</b> |
|-----------------------------|--------------|-----------|---------------|--------------------|
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 106           | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 107           | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 108           | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 109           | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 110           | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 111           | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 112           | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 113           | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 114           | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 115           | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 116           | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 117           | Bacteria Pura      |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 118           | Sin contaminación  |
| TOSAGUA                     | ASA          | 5,5       | 119           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 120           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 121           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 122           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 123           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 124           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 125           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 126           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 127           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 128           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 129           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 130           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 131           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 132           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 133           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 134           | Bacteria Pura      |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 135           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 136           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 137           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 138           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 139           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | GYM          | 5,5       | 140           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 141           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 142           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 143           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 144           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 145           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 146           | Sin contaminación  |

**Tabla A8. Continuación...**

| <b>LUGAR DE RECOLECCIÓN</b> | <b>MEDIO</b> | <b>PH</b> | <b>CÓDIGO</b> | <b>OBSERVACIÓN</b> |
|-----------------------------|--------------|-----------|---------------|--------------------|
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 147           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 148           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 149           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 150           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 151           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 152           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 153           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 154           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 155           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 156           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 157           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 158           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 159           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 160           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 161           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 162           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 163           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 164           | Bacteria Pura      |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 165           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 166           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 167           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 168           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 169           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 170           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 171           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 172           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 173           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 174           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 175           | Sin contaminación  |
| SAN FRANCISCO               | ASA          | 5,5       | 176           | Sin contaminación  |
| COTOPAXI                    | ASA          | 5,5       | 177           | Sin contaminación  |
| COTOPAXI                    | ASA          | 5,5       | 178           | Sin contaminación  |
| COTOPAXI                    | ASA          | 5,5       | 179           | Sin contaminación  |
| COTOPAXI                    | ASA          | 5,5       | 180           | Sin contaminación  |
| COTOPAXI                    | ASA          | 5,5       | 181           | Sin contaminación  |
| COTOPAXI                    | ASA          | 5,5       | 182           | Sin contaminación  |
| COTOPAXI                    | ASA          | 5,5       | 183           | Sin contaminación  |
| COTOPAXI                    | ASA          | 5,5       | 184           | Sin contaminación  |
| COTOPAXI                    | ASA          | 5,5       | 185           | Sin contaminación  |
| COTOPAXI                    | ASA          | 5,5       | 186           | Sin contaminación  |

Tabla A8. Continuación...

| LUGAR DE RECOLECCIÓN | MEDIO | PH  | CÓDIGO | OBSERVACIÓN                             |
|----------------------|-------|-----|--------|---|
| COTOPAXI             | ASA   | 5,5 | 187    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | ASA   | 5,5 | 188    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | ASA   | 5,5 | 189    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | ASA   | 5,5 | 190    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | ASA   | 5,5 | 191    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 192    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 193    | Sin contaminación, produce unas gotitas |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 194    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 195    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 196    | Sin contaminación, produce unas gotitas |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 197    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 198    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 199    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 200    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 201    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 202    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 203    | Bacteria Pura                           |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 204    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 205    | Bacteria Pura                           |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 206    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 207    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 208    | Sin contaminación, produce unas gotitas |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 209    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 210    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 211    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 212    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 213    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 214    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 215    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 216    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 217    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 218    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 219    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 220    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 221    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 222    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 223    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 224    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 225    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 226    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 227    | Sin contaminación                       |
| COTOPAXI             | GYM   | 5,5 | 228    | Sin contaminación                       |
| COTOPAX              | GYM   | 5,5 | 229    | Sin contaminación                       |
| TOSAGUA              | GYM   | 5,5 | 230    | Sin contaminación                       |

**Tabla A9. Almacenamiento conservación y codificación de los cultivos puros de actinomicetes acidofílicos**

| <b>CÓDIGO ACTUAL</b> | <b>CÓDIGO ANTERIOR</b> | <b>MEDIO</b> | <b>PH</b> | <b>LUGAR DE RECOLECCIÓN</b> | <b>OBSERVACIÓN</b> |
|----------------------|------------------------|--------------|-----------|-----------------------------|--------------------|
| DCB-1401             | 120                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1402             | 121                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1403             | 122                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1404             | 123                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1405             | 124                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1406             | 125                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1407             | 126                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1408             | 127                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1409             | 128                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1410             | 129                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1411             | 130                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1412             | 131                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1413             | 132                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1414             | 133                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1415             | 134                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1416             | 135                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1417             | 136                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1418             | 137                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1419             | 138                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1420             | 139                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1421             | 140                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1422             | 141                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1423             | 142                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1424             | 143                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1425             | 144                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1436             | 155                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1437             | 156                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1438             | 157                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1439             | 158                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1440             | 159                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1441             | 160                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1442             | 161                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1443             | 162                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1444             | 163                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1445             | 164                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1446             | 165                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |

Tabla A9. Continuación...

| <b>CÓDIGO ACTUAL</b> | <b>CÓDIGO ANTERIOR</b> | <b>MEDIO</b> | <b>PH</b> | <b>LUGAR DE RECOLECCIÓN</b> | <b>OBSERVACIÓN</b> |
|----------------------|------------------------|--------------|-----------|-----------------------------|--------------------|
| DCB-1447             | 166                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1448             | 167                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1449             | 168                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1450             | 169                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1451             | 170                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1452             | 171                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1453             | 172                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1454             | 173                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1455             | 174                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               |                    |
| DCB-1456             | 60                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1457             | 61                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1458             | 62                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1459             | 63                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1460             | 64                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1461             | 65                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1462             | 66                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1463             | 67                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1464             | 68                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1465             | 69                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1466             | 70                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1467             | 71                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1468             | 72                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1469             | 73                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1470             | 74                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1471             | 75                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1472             | 76                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1473             | 77                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1474             | 78                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1475             | 79                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1476             | 80                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1477             | 81                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1478             | 82                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1479             | 83                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1480             | 84                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1481             | 85                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1482             | 86                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1483             | 87                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1484             | 88                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1485             | 89                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1486             | 90                     | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |
| DCB-1487             | 91                     | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                     |                    |

Tabla A9. Continuación...

| <b>CÓDIGO<br/>ACTUAL</b> | <b>CÓDIGO<br/>ANTERIOR</b> | <b>MEDIO</b> | <b>PH</b> | <b>LUGAR DE<br/>RECOLECCIÓN</b> | <b>OBSERVACIÓN</b> |
|--------------------------|----------------------------|--------------|-----------|---------------------------------|--------------------|
| DCB-1488                 | 92                         | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1489                 | 93                         | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1490                 | 94                         | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1491                 | 95                         | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1492                 | 96                         | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1493                 | 97                         | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1494                 | 98                         | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1495                 | 99                         | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1496                 | 100                        | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1497                 | 101                        | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1498                 | 102                        | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1499                 | 103                        | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1500                 | 104                        | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1501                 | 105                        | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1502                 | 106                        | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1503                 | 107                        | GYM          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1504                 | 108                        | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1505                 | 109                        | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                         |                    |
| DCB-1506                 | 177                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1507                 | 178                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1508                 | 179                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1509                 | 180                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1510                 | 181                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1511                 | 182                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1512                 | 183                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1513                 | 184                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1514                 | 185                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1515                 | 186                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1516                 | 187                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1517                 | 188                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1518                 | 189                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1519                 | 190                        | GYM          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1520                 | 191                        | GYM          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1521                 | 192                        | GYM          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1522                 | 193                        | GYM          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1523                 | 194                        | GYM          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1524                 | 195                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1525                 | 196                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1526                 | 197                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1527                 | 198                        | ASA          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |
| DCB-1528                 | 199                        | GYM          | 5,5       | COTOPAXI                        |                    |

Tabla A9. Continuación...

| CÓDIGO ACTUAL | CÓDIGO ANTERIOR | MEDIO | PH  | LUGAR DE RECOLECCIÓN | OBSERVACIÓN                                |
|---------------|-----------------|-------|-----|----------------------|--|
| DCB-1529      | 200             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1530      | 201             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1531      | 202             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1532      | 203             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1533      | 204             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1534      | 205             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1535      | 206             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1536      | 207             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1537      | 208             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1538      | 209             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1539      | 210             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1540      | 211             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1541      | 212             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1542      | 213             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1543      | 214             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1544      | 215             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1545      | 216             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1546      | 217             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1547      | 218             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1548      | 219             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             | Sin contaminación,<br>produce unas gotitas |
| DCB-1549      | 220             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             | Sin contaminación,<br>produce unas gotitas |
| DCB-1550      | 221             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             | Sin contaminación,<br>produce unas gotitas |
| DCB-1551      | 222             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1552      | 223             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1553      | 224             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1554      | 225             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1555      | 226             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1556      | 227             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             |  |
| DCB-1557      | 1               | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |  |
| DCB-1558      | 2               | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |  |
| DCB-1559      | 3               | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |  |
| DCB-1560      | 4               | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |  |
| DCB-1561      | 5               | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |  |
| DCB-1562      | 6               | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |  |
| DCB-1563      | 7               | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |  |
| DCB-1564      | 8               | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |  |
| DCB-1565      | 9               | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |  |
| DCB-1566      | 10              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |  |
| DCB-1567      | 11              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |  |

Tabla A9. Continuación...

| CÓDIGO ACTUAL | CÓDIGO ANTERIOR | MEDIO | PH  | LUGAR DE RECOLECCIÓN | OBSERVACIÓN   |
|---------------|-----------------|-------|-----|----------------------|---------------|
| DCB-1568      | 12              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1569      | 13              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1570      | 14              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1571      | 15              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1572      | 16              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1573      | 17              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1574      | 18              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1575      | 19              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1576      | 20              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1577      | 21              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1578      | 22              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1579      | 23              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1580      | 24              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1581      | 25              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1582      | 26              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1583      | 27              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1584      | 28              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1585      | 29              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1586      | 30              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1587      | 31              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1588      | 32              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1589      | 33              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1590      | 34              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1591      | 35              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1592      | 36              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1593      | 37              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1594      | 38              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1595      | 39              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1596      | 40              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1597      | 41              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1598      | 42              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1599      | 43              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1600      | 44              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1601      | 45              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1602      | 46              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1603      | 47              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1604      | 48              | ASA   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1605      | 49              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1606      | 50              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1607      | 51              | GYM   | 5,5 | MISAHUALLI           |               |
| DCB-1608      | 110             | ASA   | 5,5 | TOSAGUA              | Bacteria Pura |
| DCB-1609      | 228             | GYM   | 5,5 | COTOPAXI             | Bacteria Pura |



Tabla A9. Continuación...

| <b>CÓDIGO ACTUAL</b> | <b>CÓDIGO ANTERIOR</b> | <b>MEDIO</b> | <b>PH</b> | <b>LUGAR DE RECOLECCIÓN</b> | <b>OBSERVACIÓN</b> |
|----------------------|------------------------|--------------|-----------|-----------------------------|--------------------|
| DCB-1610             | 150                    | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                     | Bacteria Pura      |
| DCB-1611             | 52                     | ASA          | 5,5       | MISAHUALLI                  | Bacteria Pura      |
| DCB-1612             | 53                     | GYM          | 5,5       | MISAHUALLI                  | Bacteria Pura      |
| DCB-1613             | 54                     | GYM          | 5,5       | MISAHUALLI                  | Bacteria Pura      |
| DCB-1614             | 175                    | ASA          | 5,5       | SAN FRANCISCO               | Bacteria Pura      |
| DCB-1615             | 229                    | GYM          | 5,5       | COTOPAXI                    | Bacteria Pura      |
| DCB-1616             | 111                    | ASA          | 5,5       | TOSAGUA)                    | Bacteria Pura      |
| DCB-1617             | 112                    | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                     | Bacteria Pura      |
| DCB-1618             | 113                    | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                     | Bacteria Pura      |
| DCB-1619             | 114                    | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                     | Bacteria Pura      |
| DCB-1620             | 115                    | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                     | Bacteria Pura      |
| DCB-1621             | 55                     | GYM          | 5,5       | MISAHUALLI                  | Bacteria Pura      |
| DCB-1622             | 56                     | GYM          | 5,5       | MISAHUALLI                  | Bacteria Pura      |
| DCB-1623             | 57                     | GYM          | 5,5       | MISAHUALLI                  | Bacteria Pura      |
| DCB-1624             | 58                     | ASA          | 5,5       | MISAHUALLI                  | Bacteria Pura      |
| DCB-1625             | 116                    | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                     | Bacteria Pura      |
| DCB-1626             | 117                    | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                     | Bacteria Pura      |
| DCB-1627             | 118                    | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                     | Bacteria Pura      |
| DCB-1628             | 119                    | ASA          | 5,5       | TOSAGUA                     | Bacteria Pura      |
| DCB-1629             | 176                    | GYM          | 5,5       | SAN FRANCISCO               | Bacteria Pura      |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A10. Caracterización Macroscópica**

| GRUPOS         | CÓDIGO   | REPRESENTANTES | LUGAR         | MEDIO | PH  | M.AEREO             | M.SUSTRATO       | PIGMENTACIÓN | OBSERVACIÓN               |
|----------------|----------|----------------|---------------|-------|-----|---------------------|------------------|--------------|---------------------------|
| <b>Grupo 1</b> | DCB-1401 | 1402           | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Purple              | Vellum           | Purple light |                           |
|                | DCB-1402 |                | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Purple              | Vellum           | Purple light |                           |
|                | DCB-1403 | 1403           | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Purple              | Vellum           | Purple light |                           |
|                | DCB-1406 |                | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Purple              | Vellum           | Purple light |                           |
| <b>Grupo 2</b> | DCB-1404 | 1404           | SAN FRANCISCO | GYM   | 5,5 | White               | Camouflage beige | Light brown  |                           |
|                | DCB-1405 |                | SAN FRANCISCO | GYM   | 5,5 | White               | Camouflage beige | Light brown  |                           |
| <b>Grupo 3</b> | DCB-1407 | 1409           | SAN FRANCISCO | GYM   | 5,5 | Taxo                | Biscuit          | –            |                           |
|                | DCB-1408 |                | SAN FRANCISCO | GYM   | 5,5 | Taxo                | Biscuit          | –            |                           |
|                | DCB-1409 |                | SAN FRANCISCO | GYM   | 5,5 | Taxo                | Biscuit          | –            |                           |
| <b>Grupo 4</b> | DCB-1410 | 14012          | SAN FRANCISCO | GYM   | 5,5 | White               | Light buff       | Light brown  |                           |
|                | DCB-1411 |                | SAN FRANCISCO | GYM   | 5,5 | White               | Light buff       | Light brown  |                           |
|                | DCB-1412 |                | SAN FRANCISCO | GYM   | 5,5 | White               | Light buff       | Light brown  |                           |
| <b>Grupo 5</b> | DCB-1413 | 1413           | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Purple              | Beige            | –            |                           |
|                | DCB-1414 |                | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Purple              | Beige            | –            |                           |
| <b>Grupo 6</b> | DCB-1415 | -              | SAN FRANCISCO | GYM   | 5,5 | –                   | Light buff       | Light brown  | No presentó Micelio aéreo |
| <b>Grupo 7</b> | DCB-1416 | 1416           | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Light aircraft grey | Manilla          | –            |                           |
| <b>Grupo 8</b> | DCB-1417 | 1417           | SAN FRANCISCO | GYM   | 5,5 | Manilla             | Biscuit          | –            |                           |
| <b>Grupo 9</b> | DCB-1418 | 1418           | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Biscuit             | Pale cream       | –            |                           |
|                | DCB-1419 |                | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Biscuit             | Pale cream       | –            |                           |
|                | DCB-1420 |                | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Biscuit             | Pale cream       | –            |                           |
|                | DCB-1421 | 1419           | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Biscuit             | Pale cream       | –            |                           |
|                | DCB-1422 |                | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Biscuit             | Pale cream       | –            |                           |
|                | DCB-1423 |                | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Biscuit             | Pale cream       | –            |                           |

Tabla A10. Continuación...

| GRUPOS          | CÓDIGO   | REPRESENTANTES | LUGAR         | MEDIO         | PH         | M.AEREO          | M.SUSTRATO  | PIGMENTACIÓN | OBSERVACIÓN      |  |
|-----------------|----------|----------------|---------------|---------------|------------|------------------|-------------|--------------|------------------|--|
| <b>Grupo 10</b> | DCB-1424 | 1424           | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Biscuit          | Manilla     | –            |                  |  |
| <b>Grupo 11</b> | DCB-1425 | 1426           | SAN FRANCISCO | GYM           | 5,5        | Camouflage beige | Light straw | Light brown  |                  |  |
|                 | DCB-1426 |                | SAN FRANCISCO | GYM           | 5,5        | Camouflage beige | Light straw | Light brown  |                  |  |
|                 | DCB-1427 | 1428           | SAN FRANCISCO | GYM           | 5,5        | Camouflage beige | Light straw | Light brown  |                  |  |
| <b>Grupo 12</b> | DCB-1428 | 1431           | SAN FRANCISCO | GYM           | 5,5        | Camouflage beige | Light straw | Light brown  |                  |  |
|                 | DCB-1429 |                | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Vellum           | Manilla     | –            | Poco Crecimiento |  |
|                 | DCB-1430 |                | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Vellum           | Manilla     | –            |                  |  |
|                 | DCB-1431 |                | 1433          | SAN FRANCISCO | ASA        | 5,5              | Vellum      | Manilla      | –                |  |
|                 | DCB-1432 |                | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Vellum           | Manilla     | –            |                  |  |
| <b>Grupo 13</b> | DCB-1433 | 1434           | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Vellum           | Manilla     | –            |                  |  |
|                 | DCB-1434 |                | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Light straw      | Vellum      | –            |                  |  |
|                 | DCB-1435 |                | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Light straw      | Vellum      | –            |                  |  |
|                 | DCB-1436 |                | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Light straw      | Vellum      | –            |                  |  |
|                 | DCB-1437 |                | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Light straw      | Vellum      | –            |                  |  |
| <b>Grupo 14</b> | DCB-1438 | 1440           | SAN FRANCISCO | GYM           | 5,5        | White            | Manilla     | Light brown  |                  |  |
|                 | DCB-1439 |                | SAN FRANCISCO | GYM           | 5,5        | White            | Manilla     | Light brown  |                  |  |
|                 | DCB-1440 |                | SAN FRANCISCO | GYM           | 5,5        | White            | Manilla     | Light brown  |                  |  |
| <b>Grupo 15</b> | DCB-1441 | 1441           | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Pale cream       | Manilla     | –            | Poco Crecimiento |  |
|                 | DCB-1442 |                | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Pale cream       | Manilla     | –            |                  |  |
|                 | DCB-1443 | 1445           | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Pale cream       | Manilla     | –            |                  |  |
|                 | DCB-1444 | SAN FRANCISCO  | ASA           | 5,5           | Pale cream | Manilla          | –           |              |                  |  |
|                 | DCB-1445 | 1449           | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Pale cream       | Manilla     | –            |                  |  |
| <b>Grupo 16</b> | DCB-1449 | -              | SAN FRANCISCO | ASA           | 5,5        | Pale cream       | Manilla     | –            |                  |  |
|                 | DCB-1446 |                | SAN FRANCISCO | GYM           | 5,5        | –                | Biscuit     | Light brown  | No presente      |  |
|                 | DCB-1447 |                | SAN FRANCISCO | GYM           | 5,5        | –                | Biscuit     | Light brown  | Micelio          |  |
|                 | DCB-1448 |                | SAN FRANCISCO | GYM           | 5,5        | –                | Biscuit     | Light Brown  | Aéreo            |  |

**Tabla A10. Continuación...**

| GRUPOS          | CÓDIGO   | REPRESENTATES | LUGAR         | MEDIO | PH  | M.AEREO        | M.SUSTRATO  | PIGMENTACIÓN | OBSERVACIÓN |
|-----------------|----------|---------------|---------------|-------|-----|----------------|-------------|--------------|-------------|
| <b>Grupo 17</b> | DCB-1450 | 1450          | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Biscuit        | Biscuit     | –            |             |
|                 | DCB-1451 |               | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Biscuit        | Biscuit     | –            |             |
| <b>Grupo 18</b> | DCB-1452 | 1452          | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Maroon         | Maroon      | Middle brown |             |
| <b>Grupo 19</b> | DCB-1453 | 1454          | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Manilla        | Manilla     | –            |             |
|                 | DCB-1454 |               | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Manilla        | Manilla     | –            |             |
|                 | DCB-1455 |               | SAN FRANCISCO | ASA   | 5,5 | Manilla        | Manilla     | –            |             |
| <b>Grupo 20</b> | DCB-1456 | 1457          | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | Light buff     | Light stone | Light brown  |             |
|                 | DCB-1457 |               | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | Light buff     | Light stone | Light brown  |             |
|                 | DCB-1458 |               | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | Light buff     | Light stone | Light brown  |             |
| <b>Grupo 21</b> | DCB-1459 | 1460          | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | White          | Biscuit     | Pale cream   |             |
|                 | DCB-1460 |               | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | White          | Biscuit     | Pale cream   |             |
| <b>Grupo 22</b> | DCB-1461 | 1463          | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | White          | Deep cream  | –            |             |
|                 | DCB-1462 |               | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | White          | Deep cream  | –            |             |
|                 | DCB-1463 |               | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | White          | Deep cream  | –            |             |
| <b>Grupo 23</b> | DCB-1464 | 1464          | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | White          | Pale cream  | –            |             |
|                 | DCB-1465 |               | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | White          | Pale cream  | –            |             |
|                 | DCB-1466 |               | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | White          | Pale cream  | –            |             |
| <b>Grupo 24</b> | DCB-1467 | 1467          | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | Deep sare blue | Arctic blue | –            |             |
|                 | DCB-1468 |               | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | Deep sare blue | Arctic blue | –            |             |
|                 | DCB-1469 | 1468          | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | Deep sare blue | Arctic blue | –            |             |
|                 | DCB-1470 |               | TOSAGUA       | GYM   | 5,5 | Deep sare blue | Arctic blue | –            |             |

Tabla A10. Continuación...

| GRUPOS          | CÓDIGO   | REPRESENTANTES | LUGAR   | MEDIO | PH  | M.AEREO             | M.SUSTRATO  | PIGMENTACIÓN | OBSERVACIÓN |
|-----------------|----------|----------------|---------|-------|-----|---------------------|-------------|--------------|-------------|
| <b>Grupo 25</b> | DCB-1471 | 1472           | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | Light brown         | Light buff  | Light stone  |             |
|                 | DCB-1472 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | Light brown         | Light buff  | Light stone  |             |
|                 | DCB-1473 | 1473           | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | Light brown         | Light buff  | Light stone  |             |
|                 | DCB-1474 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | Light brown         | Light buff  | Light stone  |             |
|                 | DCB-1475 | 1476           | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | Light brown         | Light buff  | Light stone  |             |
|                 | DCB-1476 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | Light brown         | Light buff  | Light stone  |             |
|                 | DCB-1477 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | Light brown         | Light buff  | Light stone  |             |
| <b>Grupo 26</b> | DCB-1478 | 1484           | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Biscuit     | –            |             |
|                 | DCB-1479 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Biscuit     | –            |             |
|                 | DCB-1480 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Biscuit     | –            |             |
|                 | DCB-1481 | 1486           | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Biscuit     | –            |             |
|                 | DCB-1482 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Biscuit     | –            |             |
|                 | DCB-1483 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Biscuit     | –            |             |
|                 | DCB-1484 | 1487           | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Biscuit     | –            |             |
|                 | DCB-1485 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Biscuit     | –            |             |
|                 | DCB-1486 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Biscuit     | –            |             |
|                 | DCB-1487 |                | TOSAGUA | ASA   | 5,5 | White               | Biscuit     | –            |             |
| <b>Grupo 27</b> | DCB-1488 | 1488           | TOSAGUA | ASA   | 5,5 | Light aircraft grey | Vellum      | –            |             |
|                 | DCB-1489 |                | TOSAGUA | ASA   | 5,5 | Light aircraft grey | Vellum      | –            |             |
|                 | DCB-1490 | 1490           | TOSAGUA | ASA   | 5,5 | Light aircraft grey | Vellum      | –            |             |
|                 | DCB-1491 |                | TOSAGUA | ASA   | 5,5 | Light aircraft grey | Vellum      | –            |             |
| <b>Grupo 28</b> | DCB-1492 | 1492           | TOSAGUA | ASA   | 5,5 | Light brown         | Light brown | Light brown  |             |
| <b>Grupo 29</b> | DCB-1493 | 1493           | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Manilla     | –            |             |
|                 | DCB-1494 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Manilla     | –            |             |
|                 | DCB-1495 |                | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | White               | Manilla     | –            |             |
| <b>Grupo 30</b> | DCB-1496 | 1496           | TOSAGUA | GYM   | 5,5 | Biscuit             | Biscuit     | –            |             |

**Tabla A10. Continuación...**

| GRUPOS          | CÓDIGO   | REPRESENTATES | LUGAR    | MEDIO | PH  | M.AEREO             | M.SUSTRATO  | PIGMENTACIÓN | OBSERVACIÓN |
|-----------------|----------|---------------|----------|-------|-----|---------------------|-------------|--------------|-------------|
| <b>Grupo 31</b> | DCB-1497 | 1497          | TOSAGUA  | GYM   | 5,5 | Light aircraft grey | Beige       | –            |             |
| <b>Grupo 32</b> | DCB-1498 | 1498          | TOSAGUA  | ASA   | 5,5 | White               | Vellum      | –            |             |
|                 | DCB-1499 |               | TOSAGUA  | GYM   | 5,5 | White               | Vellum      | –            |             |
| <b>Grupo 33</b> | DCB-1500 | 1500          | TOSAGUA  | GYM   | 5,5 | Taxo                | Deep cream  | Light buff   |             |
| <b>Grupo 34</b> | DCB-1501 | 1501          | TOSAGUA  | ASA   | 5,5 | Vellum              | Vellum      | –            |             |
| <b>Grupo 35</b> | DCB-1502 | 1502          | TOSAGUA  | GYM   | 5,5 | Light stone         | Biscuit     | –            |             |
| <b>Grupo 36</b> | DCB-1503 | 1503          | TOSAGUA  | GYM   | 5,5 | Camouflage beige    | Smoke grey  | –            |             |
| <b>Grupo 37</b> | DCB-1504 | 1504          | TOSAGUA  | ASA   | 5,5 | White               | Light stone | –            |             |
| <b>Grupo 38</b> | DCB-1505 | 1505          | TOSAGUA  | ASA   | 5,5 | Light aircraft grey | Light buff  | –            |             |
| <b>Grupo 39</b> | DCB-1506 | 1508          | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Manilla             | Light buff  | Bold yellow  |             |
|                 | DCB-1507 |               | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Manilla             | Light buff  | Bold yellow  |             |
|                 | DCB-1508 | 1511          | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Manilla             | Light buff  | Bold yellow  |             |
|                 | DCB-1509 |               | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Manilla             | Light buff  | Bold yellow  |             |
|                 | DCB-1510 | 1512          | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Manilla             | Light buff  | Bold yellow  |             |
|                 | DCB-1511 |               | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Manilla             | Light buff  | Bold yellow  |             |
|                 | DCB-1512 |               | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Manilla             | Light buff  | Bold yellow  |             |
| <b>Grupo 40</b> | DCB-1513 | 1513          | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Vellum              | Vellum      | –            |             |
|                 | DCB-1514 |               | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Vellum              | Vellum      | –            |             |
|                 | DCB-1515 | 1515          | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Vellum              | Vellum      | –            |             |
|                 | DCB-1516 |               | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Vellum              | Vellum      | –            |             |
|                 | DCB-1517 | 1516          | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Vellum              | Vellum      | –            |             |
|                 | DCB-1518 |               | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Vellum              | Vellum      | –            |             |

Tabla A10. Continuación...

| GRUPOS          | CÓDIGO   | REPRESENTATES | LUGAR    | MEDIO | PH  | M.AEREO              | M.SUSTRATO    | PIGMENTACIÓN  | OBSERVACIÓN |
|-----------------|----------|---------------|----------|-------|-----|----------------------|---------------|---------------|-------------|
| <b>Grupo 41</b> | DCB-1519 | 1520          | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | White                | Pale cream    | –             |             |
|                 | DCB-1520 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | White                | Pale cream    | –             |             |
|                 | DCB-1521 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | White                | Pale cream    | –             |             |
|                 | DCB-1522 | 1521          | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | White                | Pale cream    | –             |             |
|                 | DCB-1523 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | White                | Pale cream    | –             |             |
| <b>Grupo 42</b> | DCB-1524 | 1524          | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Beige                | Deep cream    | Bold yellow   |             |
|                 | DCB-1525 |               | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Beige                | Deep cream    | Bold yellow   |             |
|                 | DCB-1526 | 1525          | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Beige                | Deep cream    | Bold yellow   |             |
|                 | DCB-1527 |               | COTOPAXI | ASA   | 5,5 | Beige                | Deep cream    | Bold yellow   |             |
| <b>Grupo 43</b> | DCB-1528 | 1530          | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Golden brown         | Middle brown  | Light brown   |             |
|                 | DCB-1529 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Golden brown         | Middle brown  | Light brown   |             |
|                 | DCB-1530 | 1531          | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Golden brown         | Middle brown  | Light brown   |             |
|                 | DCB-1531 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Golden brown         | Middle brown  | Light brown   |             |
| <b>Grupo 44</b> | DCB-1532 | 1534          | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Aircraft grey        | Royal blue    | Light grey    |             |
|                 | DCB-1533 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Aircraft grey        | Royal blue    | Light grey    |             |
|                 | DCB-1534 | 1535          | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Aircraft grey        | Royal blue    | Light grey    |             |
|                 | DCB-1535 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Aircraft grey        | Royal blue    | Light grey    |             |
| <b>Grupo 45</b> | DCB-1536 | 1537          | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | White                | Service brown | Light brown   |             |
|                 | DCB-1537 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | White                | Service brown | Light brown   |             |
|                 | DCB-1538 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | White                | Service brown | Light brown   |             |
| <b>Grupo 46</b> | DCB-1539 | 1541          | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Light grey           | Service brown | Service brown |             |
|                 | DCB-1540 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Light grey           | Service brown | Service brown |             |
|                 | DCB-1541 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Light grey           | Service brown | Service brown |             |
| <b>Grupo 47</b> | DCB-1542 | 1543          | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Lihgt admiratty grey | Sky blue      | –             |             |
|                 | DCB-1543 |               | COTOPAXI | GYM   | 5,5 | Lihgt admiratty grey | Sky blue      | –             |             |

**Tabla A10. Continuación...**

| GRUPOS          | CÓDIGO     | REPRESENTATES | LUGAR      | MEDIO      | PH    | M.AEREO      | M.SUSTRATO  | PIGMENTACIÓN | OBSERVACIÓN   |
|-----------------|------------|---------------|------------|------------|-------|--------------|-------------|--------------|---------------|
| <b>Grupo 48</b> | DCB-1544   | 1545          | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | Biscuit      | Light stone | –            |               |
|                 | DCB-1545   |               | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | Biscuit      | Light stone | –            |               |
| <b>Grupo 49</b> | DCB-1546   | 1546          | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | White        | Light buff  | Light buff   |               |
|                 | DCB-1547   |               | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | White        | Light buff  | Light buff   |               |
| <b>Grupo 50</b> | DCB-1548   | 1548          | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | Light straw  | Light stone | Light buff   | Pesenta gotas |
| <b>Grupo 51</b> | DCB-1549   | 1550          | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | Light grey   | Light brown | Light brown  | Pesenta gotas |
|                 | DCB-1550   |               | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | Light grey   | Light brown | Light brown  |               |
| <b>Grupo 52</b> | DCB-1551   | 1551          | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | White        | Light brown | Light brown  |               |
| <b>Grupo 53</b> | DCB-1552   | 1552          | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | Light grey   | White       | –            |               |
| <b>Grupo 54</b> | DCB-1553   | 1553          | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | White        | Light buff  | Light buff   |               |
| <b>Grupo 55</b> | DCB-1554   | 1554          | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | Light brown  | Beige       | –            |               |
| <b>Grupo 56</b> | DCB-1555   | 1555          | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | Pink         | Biscuit     | –            |               |
| <b>Grupo 57</b> | DCB-1556   | 1556          | COTOPAXI   | GYM        | 5,5   | Light violet | Rubi        | Light stone  |               |
| <b>Grupo 58</b> | DCB-1557   | 1557          | MISAHUALLI | GYM        | 5,5   | White        | Light buff  | Light brown  |               |
|                 | DCB-1558   |               | MISAHUALLI | GYM        | 5,5   | White        | Light buff  | Light brown  |               |
|                 | DCB-1559   | 1559          | MISAHUALLI | GYM        | 5,5   | White        | Light buff  | Light brown  |               |
|                 | DCB-1560   |               | MISAHUALLI | GYM        | 5,5   | White        | Light buff  | Light brown  |               |
|                 | DCB-1561   |               | MISAHUALLI | GYM        | 5,5   | White        | Light buff  | Light brown  |               |
|                 | DCB-1562   |               | 1560       | MISAHUALLI | GYM   | 5,5          | White       | Light buff   | Light Brown   |
|                 | DCB-1563   | MISAHUALLI    |            | GYM        | 5,5   | White        | Light buff  | Light Brown  |               |
|                 | DCB-1564   | MISAHUALLI    |            | GYM        | 5,5   | White        | Light buff  | Light Brown  |               |
|                 | MISAHUALLI | GYM           |            | 5,5        | White | Light buff   | Light Brown |              |               |



Tabla A10. Continuación...

| GRUPOS          | CÓDIGO   | REPRESENTANTES | LUGAR      | MEDIO | PH  | M.AEREO            | M.SUSTRATO    | PIGMENTACIÓN | OBSERVACIÓN   |
|-----------------|----------|----------------|------------|-------|-----|--------------------|---------------|--------------|---------------|
| <b>Grupo 59</b> | DCB-1565 | 1566           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Grey               | Deep cream    | Pale cream   |               |
|                 | DCB-1566 |                | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Grey               | Deep cream    | Pale cream   |               |
|                 | DCB-1567 | 1569           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Grey               | Deep cream    | Pale cream   |               |
|                 | DCB-1568 | 1570           | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Grey               | Deep cream    | Pale cream   |               |
|                 | DCB-1569 | 1571           | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Grey               | Deep cream    | Pale cream   |               |
|                 | DCB-1570 |                | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Grey               | Deep cream    | Pale cream   |               |
|                 | DCB-1571 |                | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Grey               | Deep cream    | Pale cream   |               |
| <b>Grupo 60</b> | DCB-1572 | 1572           | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Dove grey          | Service brown | Light Brown  |               |
|                 | DCB-1573 |                | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Dove grey          | Service brown | Light Brown  |               |
|                 | DCB-1574 |                | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Dove grey          | Service brown | Light Brown  |               |
| <b>Grupo 61</b> | DCB-1575 | 1576           | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Light straw        | Light stone   | Light Stone  |               |
|                 | DCB-1576 |                | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light straw        | Light stone   | Light Stone  |               |
|                 | DCB-1577 | 1578           | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Light straw        | Light stone   | Light Stone  |               |
|                 | DCB-1578 |                | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Light straw        | Light stone   | Light Stone  |               |
| <b>Grupo 62</b> | DCB-1579 | 1579           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light aircraf grey | Deep cream    | Vellum       |               |
| <b>Grupo 63</b> | DCB-1580 | 1580           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light aircraf grey | Manilla       | –            |               |
|                 | DCB-1581 |                | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light aircraf grey | Manilla       | –            |               |
| <b>Grupo 64</b> | DCB-1582 | 1583           | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Salmon pink        | Golden brown  | Light Brown  |               |
|                 | DCB-1583 |                | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Salmon pink        | Golden brown  | Light Brown  |               |
| <b>Grupo 65</b> | DCB-1584 | 1585           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Camouflage beige   | Light straw   | Beige        |               |
|                 | DCB-1585 |                | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Camouflage beige   | Light straw   | Beige        |               |
| <b>Grupo 66</b> | DCB-1586 | -              | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | –                  | Pale cream    | –            | No presentó   |
|                 | DCB-1587 |                | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | –                  | Pale cream    | –            | Micelio aéreo |
| <b>Grupo 67</b> | DCB-1588 | 1588           | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Deep cream         | Pale cream    | Light Brown  |               |

Tabla A10. Continuación...

| GRUPOS          | CÓDIGO   | REPRESENTANTES | LUGAR      | MEDIO | PH  | M.AEREO            | M.SUSTRATO       | PIGMENTACIÓN | OBSERVACIÓN |
|-----------------|----------|----------------|------------|-------|-----|--------------------|------------------|--------------|-------------|
| <b>Grupo 68</b> | DCB-1589 | 1589           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light airgraf grey | Camouflage grey  | –            |             |
|                 | DCB-1590 |                | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Light airgraf grey | Camouflage grey  | –            |             |
| <b>Grupo 69</b> | DCB-1591 | 1592           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light grey         | Pale cream       | –            |             |
|                 | DCB-1592 |                | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light grey         | Pale cream       | –            |             |
| <b>Grupo 70</b> | DCB-1593 | 1593           | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | White              | Light buff       | Beige        |             |
| <b>Grupo 71</b> | DCB-1594 | 1594           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Camouflage beige   | Vellum           | –            |             |
| <b>Grupo 72</b> | DCB-1595 | 1595           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Camouflage beige   | Beige            | –            |             |
| <b>Grupo 73</b> | DCB-1596 | 1597           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light airgraf grey | Vellum           | –            |             |
|                 | DCB-1597 |                | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light airgraf grey | Vellum           | –            |             |
| <b>Grupo 74</b> | DCB-1598 | 1598           | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | White              | Service brown    | Light brown  |             |
|                 | DCB-1599 |                | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | White              | Service brown    | Light brown  |             |
| <b>Grupo 75</b> | DCB-1600 | 1600           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light airgraf grey | Pale roundel red | Salmon pink  |             |
| <b>Grupo 76</b> | DCB-1601 | 1602           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light grey         | Manilla          | –            |             |
|                 | DCB-1602 |                | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Light grey         | Manilla          | –            |             |
| <b>Grupo 77</b> | DCB-1603 | 1603           | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Taxo               | Deep cream       | Pale cream   |             |
| <b>Grupo 78</b> | DCB-1604 | 1604           | MISAHUALLI | ASA   | 5,5 | Taxo               | Biscuit          | –            |             |
| <b>Grupo 79</b> | DCB-1605 | 1606           | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Pale cream         | Light buff       | Deep cream   |             |
|                 | DCB-1606 |                | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Pale cream         | Light buff       | Deep cream   |             |
|                 | DCB-1607 |                | MISAHUALLI | GYM   | 5,5 | Pale cream         | Light buff       | Deep cream   |             |

Elaborado por: Diana Tipán, 201

**Tabla A11. Caracterización Microscópica**

| <b>CODIGO</b> | <b>TIPO DE CADENAS</b> |
|---------------|------------------------|
| DCB-1402      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1403      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1404      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1409      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1412      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1413      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1416      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1417      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1418      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1419      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1424      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1426      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1428      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1431      | Esporas Simples        |
| DCB-1433      | Esporas Simples        |
| DCB-1434      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1440      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1441      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1445      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1449      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1450      | Cadenas Espirales      |
| DCB-1452      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1454      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1457      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1460      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1463      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1464      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1467      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1468      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1472      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1473      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1476      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1484      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1486      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1487      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1488      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1490      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1492      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1493      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1496      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1497      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1498      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1500      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1502      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1503      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1504      | Cadenas Rectas         |

Tabla A11. Continuación...

| <b>CODIGO</b> | <b>TIPO DE CADENAS</b> |
|---------------|------------------------|
| DCB-1505      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1508      | Esporas Simples        |
| DCB-1511      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1512      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1512(R)   | Cadenas Rectas         |
| DCB-1513      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1515      | Esporas Simples        |
| DCB-1516      | Esporas Simples        |
| DCB-1520      | Esporas Simples        |
| DCB-1520(R)   | Esporas Simples        |
| DCB-1521      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1524      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1525      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1530      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1531      | Cadenas Espirales      |
| DCB-1534      | Cadenas Espirales      |
| DCB-1535      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1537      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1541      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1543      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1543(R)   | Cadenas Rectas         |
| DCB-1545      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1546      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1548      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1548(R)   | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1550      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1550(R)   | Cadenas Rectas         |
| DCB-1551      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1552      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1552(R)   | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1553      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1554      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1555      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1556      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1557      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1559      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1560      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1566      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1569      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1570      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1570(R)   | Cadenas Rectas         |
| DCB-1571      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1572      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1572(R)   | Cadenas Rectas         |
| DCB-1576      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1578      | Cadenas Incompletas    |

Tabla A11. Continuación...

| <b>CODIGO</b> | <b>TIPO DE CADENAS</b> |
|---------------|------------------------|
| DCB-1579      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1580      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1583      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1585      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1588      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1589      | Cadenas Recatas        |
| DCB-1592      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1593      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1594      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1595      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1597      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1598      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1600      | Cadenas Rectas         |
| DCB-1602      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1603      | Cadenas Incompletas    |
| DCB-1604      | Cadenas Incompletas    |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

Tabla A12. Matriz de datos fenotípicos

| <b>PRUEBAS</b> | <b>PH</b> |     |     |     |     |     |     | <b>TEMPERATURA</b> |     |      | <b>AMINOACIDOS</b> |     |     |     |
|----------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------|-----|------|--------------------|-----|-----|-----|
| <b>CODIGOS</b> | 3,5       | 4,5 | 5,5 | 6,5 | 7,5 | 8,5 | 9,6 | 28°C               | 4°C | 37°C | Qui                | Lys | Cys | Leu |
| DCB-1402       | 0         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 1   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1403       | 0         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 1   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1404       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1409       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1412       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1413       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1416       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 1   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1417       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1418       | 0         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 1   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1419       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1424       | 0         | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 1   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1426       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1428       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1431       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1433       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 0   |
| DCB-1434       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1440       | 0         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1441       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1445       | 1         | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 1   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1449       | 0         | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 0   | 1    | 0                  | 1   | 1   | 0   |
| DCB-1450       | 0         | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 1   | 1    | 1                  | 0   | 1   | 0   |
| DCB-1452       | 0         | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1                  | 1   | 1    | 1                  | 1   | 1   | 1   |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

Tabla A12. Continuación...

| PRUEBAS<br>CODIGOS | PH  |     |     |     |     |     |     | TEMPERATURA |     |      | AMINOACIDOS |     |     |     |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|-----|------|-------------|-----|-----|-----|
|                    | 3,5 | 4,5 | 5,5 | 6,5 | 7,5 | 8,5 | 9,6 | 28°C        | 4°C | 37°C | Qui         | Lys | Cys | Leu |
| DCB-1454           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1457           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1460           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1463           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1464           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1467           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1468           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1472           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1473           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1476           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1484           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1486           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1487           | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 0   |
| DCB-1488           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1490           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1492           | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1493           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1496           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1497           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1498           | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1500           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1502           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1503           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1504           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1505           | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1508           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1511           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1512           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1512(R)        | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1513           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 0           | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1515           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1516           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1520           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1520(R)        | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1521           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1524           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1525           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1530           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1531           | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1534           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1535           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 0   |
| DCB-1537           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1541           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |

Tabla A12. Continuación...

| PRUEBAS<br>CODIGOS | PH  |     |     |     |     |     |     | TEMPERATURA |     |      | AMINOACIDOS |     |     |     |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|-----|------|-------------|-----|-----|-----|
|                    | 3,5 | 4,5 | 5,5 | 6,5 | 7,5 | 8,5 | 9,6 | 28°C        | 4°C | 37°C | Qui         | Lys | Cys | Leu |
| DCB-1543           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1543(R)        | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1545           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1546           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1548           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1548(R)        | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1550           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1550(R)        | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1551           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1552           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1552(R)        | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1554           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1555           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1557           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1559           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 0   |
| DCB-1560           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1566           | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1569           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1570           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1570(R)        | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1571           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1572           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1572(R)        | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1576           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1578           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 0   | 1   | 0   |
| DCB-1579           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1580           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1583           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 0   |
| DCB-1585           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1588           | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1589           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1592           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 0   |
| DCB-1593           | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 0           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1594           | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1595           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1597           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1598           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 0           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1600           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1602           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 1           | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1603           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 0   | 1    | 0           | 1   | 1   | 0   |
| DCB-1604           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1           | 1   | 1    | 1           | 1   | 1   | 0   |

Tabla A12. Continuación...

| PRUEBAS  | AMINOÁCIDOS |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------|-------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|          | CODIGOS     | Gly | Tyr | Urea | Val | Thr | Arg | Asn | Phe | Ala | His | Asp | Glu |
| DCB-1402 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1403 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1404 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1409 | 1           | 0   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   |
| DCB-1412 | 1           | 0   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1413 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1416 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1417 | 1           | 0   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1418 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1419 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1424 | 1           | 1   | 0   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1426 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1428 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1431 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1433 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1434 | 0           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1440 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1441 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1445 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1449 | 0           | 0   | 0   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1450 | 0           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1452 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1454 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1457 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1460 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1463 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1464 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   |
| DCB-1467 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1468 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1472 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1473 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1476 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1484 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1486 | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1487 | 1           | 0   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |



Tabla A12. Continuación...

| PRUEBAS     | AMINOÁCIDOS |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------|-------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|             | CODIGOS     | Gly | Tyr | Urea | Val | Thr | Arg | Asn | Phe | Ala | His | Asp | Glu |
| DCB-1488    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1490    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1492    | 1           | 0   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   |
| DCB-1493    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1496    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| DCB-1497    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   |
| DCB-1498    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1500    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| DCB-1502    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   |
| DCB-1503    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1504    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1505    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   |
| DCB-1508    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1511    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1512    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1512(R) | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1513    | 1           | 0   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1515    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1516    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1520    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1520(R) | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1521    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1524    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1525    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1530    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   |
| DCB-1531    | 1           | 1   | 0   | 1    | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   |
| DCB-1534    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   |
| DCB-1535    | 1           | 1   | 1   | 0    | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| DCB-1537    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1541    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1543    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   |
| DCB-1543(R) | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   |
| DCB-1545    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   |
| DCB-1546    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   |
| DCB-1548    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1548(R) | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |

Tabla A12. Continuación...

| PRUEBAS     | AMINOÁCIDOS |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------|-------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|             | CODIGOS     | Gly | Tyr | Urea | Val | Thr | Arg | Asn | Phe | Ala | His | Asp | Glu |
| DCB-1550    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1550(R) | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1551    | 1           | 1   | 0   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1552    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1552(R) | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1554    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   |
| DCB-1555    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1557    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1559    | 1           | 1   | 1   | 0    | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1560    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1566    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1569    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1570    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1570(R) | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1571    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1572    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1572(R) | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1576    | 1           | 1   | 0   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1578    | 0           | 0   | 1   | 0    | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   |
| DCB-1579    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1580    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1583    | 0           | 0   | 1   | 0    | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   |
| DCB-1585    | 1           | 1   | 0   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1588    | 1           | 1   | 1   | 0    | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   |
| DCB-1589    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1592    | 1           | 1   | 1   | 0    | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1593    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   |
| DCB-1594    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1595    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1597    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1598    | 1           | 0   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   |
| DCB-1600    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1602    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1603    | 1           | 0   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   |
| DCB-1604    | 1           | 1   | 1   | 1    | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |

Tabla A13. Grupos-especie basados en el 90% de similitud de datos fenotípicos (dendrograma)

| ID GRUPO   | Código     | Número  | Lugar de Recolección |
|------------|------------|---------|----------------------|
| 1          | DCB - 1402 | 1       | SAN FRANCISCO        |
|            | DCB - 1403 | 2       | SAN FRANCISCO        |
|            | DCB - 1418 | 3       | SAN FRANCISCO        |
|            | DCB - 1472 | 4       | TOSAGUA              |
|            | DCB - 1440 | 5       | SAN FRANCISCO        |
|            | DCB - 1454 | 6       | SAN FRANCISCO        |
|            | DCB - 1486 | 7       | TOSAGUA              |
|            | DCB - 1541 | 8       | COTOPAXI             |
|            | DCB - 1560 | 9       | MISAHUALLI           |
|            | DCB - 1576 | 10      | MISAHUALLI           |
|            | DCB - 1457 | 11      | TOSAGUA              |
|            | DCB - 1467 | 12      | TOSAGUA              |
|            | DCB - 1597 | 13      | MISAHUALLI           |
|            | DCB - 1530 | 14      | COTOPAXI             |
|            | DCB - 1504 | 15      | TOSAGUA              |
|            | DCB - 1546 | 16      | COTOPAXI             |
|            | DCB - 1545 | 17      | COTOPAXI             |
|            | DCB - 1554 | 18      | COTOPAXI             |
|            | DCB - 1404 | 19      | SAN FRANCISCO        |
| 2          | DCB - 1419 | 1       | SAN FRANCISCO        |
|            | DCB - 1426 | 2       | SAN FRANCISCO        |
|            | DCB - 1602 | 3       | MISAHUALLI           |
|            | DCB - 1428 | 4       | SAN FRANCISCO        |
|            | DCB - 1595 | 5       | MISAHUALLI           |
|            | DCB - 1441 | 6       | SAN FRANCISCO        |
|            | DCB - 1460 | 7       | TOSAGUA              |
|            | DCB - 1463 | 8       | TOSAGUA              |
|            | DCB - 1488 | 9       | TOSAGUA              |
|            | DCB - 1490 | 10      | TOSAGUA              |
|            | DCB - 1572 | 11      | MISAHUALLI           |
|            | DCB - 1570 | 12      | MISAHUALLI           |
|            | DCB - 1503 | 13      | TOSAGUA              |
|            | DCB - 1515 | 14      | COTOPAXI             |
|            | DCB - 1580 | 15      | MISAHUALLI           |
|            | DCB - 1552 | 16      | COTOPAXI             |
|            | DCB - 1412 | 17      | SAN FRANCISCO        |
|            | DCB - 1417 | 18      | SAN FRANCISCO        |
|            | DCB - 1537 | 19      | COTOPAXI             |
| DCB - 1473 | 20         | TOSAGUA |                      |

Tabla A13. Continuación..

| ID GRUPO | Código     | Número | Lugar de Recolección |
|----------|------------|--------|----------------------|
|          | DCB - 1555 | 21     | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1413 | 22     | SAN FRANCISCO        |
|          | DCB - 1431 | 23     | SAN FRANCISCO        |
|          | DCB - 1468 | 24     | TOSAGUA              |
|          | DCB - 1502 | 25     | TOSAGUA              |
|          | DCB - 1550 | 26     | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1416 | 27     | SAN FRANCISCO        |
| <b>2</b> | DCB - 1433 | 28     | SAN FRANCISCO        |
|          | DCB - 1434 | 29     | SAN FRANCISCO        |
|          | DCB - 1445 | 30     | SAN FRANCISCO        |
|          | DCB - 1520 | 31     | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1571 | 32     | MISAHUALLI           |
|          | DCB - 1604 | 33     | MISAHUALLI           |
|          | DCB - 1551 | 34     | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1476 | 35     | TOSAGUA              |
|          | DCB - 1534 | 1      | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1484 | 2      | TOSAGUA              |
|          | DCB - 1569 | 3      | MISAHUALLI           |
|          | DCB - 1548 | 4      | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1589 | 5      | MISAHUALLI           |
|          | DCB - 1512 | 6      | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1516 | 7      | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1557 | 8      | MISAHUALLI           |
|          | DCB - 1585 | 9      | MISAHUALLI           |
| <b>3</b> | DCB - 1493 | 10     | TOSAGUA              |
|          | DCB - 1511 | 11     | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1521 | 12     | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1524 | 13     | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1508 | 14     | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1597 | 15     | MISAHUALLI           |
|          | DCB - 1600 | 16     | MISAHUALLI           |
|          | DCB - 1579 | 17     | MISAHUALLI           |
|          | DCB - 1525 | 18     | COTOPAXI             |
|          | DCB - 1498 | 19     | TOSAGUA              |
|          | DCB - 1566 | 1      | MISAHUALLI           |
| <b>4</b> | DCB - 1594 | 2      | MISAHUALLI           |
|          | DCB - 1464 | 3      | TOSAGUA              |
| <b>5</b> | DCB - 1409 | 1      | SAN FRANCISCO        |
| <b>6</b> | DCB - 1513 | 1      | COTOPAXI             |
| <b>7</b> | DCB - 1598 | 1      | MISAHUALLI           |
| <b>8</b> | DCB - 1424 | 1      | SAN FRANCISCO        |

Tabla A13. Continuación..

| ID GRUPO | Código     | Número | Lugar de Recolección |
|----------|------------|--------|----------------------|
|          | DCB - 1452 | 1      | SAN FRANCISCO        |
| 9        | DCB - 1505 | 2      | TOSAGUA              |
|          | DCB - 1487 | 3      | TOSAGUA              |
| 10       | DCB - 1492 | 1      | TOSAGUA              |
|          | DCB - 1450 | 2      | SAN FRANCISCO        |
| 11       | DCB - 1535 | 1      | COTOPAXI             |
| 12       | DCB - 1559 | 1      | MISAHUALLI           |
| 13       | DCB - 1592 | 1      | MISAHUALLI           |
|          | DCB - 1603 | 2      | MISAHUALLI           |
| 14       | DCB - 1449 | 1      | SAN FRANCISCO        |
| 15       | DCB - 1496 | 1      | TOSAGUA              |
| 16       | DCB - 1500 | 1      | TOSAGUA              |
| 17       | DCB - 1543 | 1      | COTOPAXI             |
| 18       | DCB - 1588 | 1      | MISAHUALLI           |
| 19       | DCB - 1578 | 1      | MISAHUALLI           |
| 20       | DCB - 1583 | 1      | MISAHUALLI           |
| 21       | DCB - 1531 | 1      | COTOPAXI             |
| 22       | DCB - 1593 | 1      | MISAHUALLI           |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

Tabla A14. Actinomicetes que no presentaron actividad antimicrobiana

| CÓDIGOS  |          |          |
|----------|----------|----------|
| DCB-1404 | DCB-1476 | DCB-1537 |
| DCB-1409 | DCB-1484 | DCB-1541 |
| DCB-1417 | DCB-1487 | DCB-1546 |
| DCB-1419 | DCB-1492 | DCB-1550 |
| DCB-1426 | DCB-1496 | DCB-1551 |
| DCB-1428 | DCB-1498 | DCB-1557 |
| DCB-1431 | DCB-1500 | DCB-1559 |
| DCB-1433 | DCB-1502 | DCB-1566 |
| DCB-1434 | DCB-1503 | DCB-1569 |
| DCB-1440 | DCB-1508 | DCB-1576 |
| DCB-1445 | DCB-1513 | DCB-1578 |
| DCB-1454 | DCB-1515 | DCB-1589 |
| DCB-1457 | DCB-1516 | DCB-1592 |
| DCB-1460 | DCB-1524 | DCB-1595 |
| DCB-1463 | DCB-1525 | DCB-1600 |
| DCB-1467 | DCB-1531 | DCB-1602 |
| DCB-1468 | DCB-1534 | DCB-1603 |
| DCB-1472 | DCB-1535 | DCB-1604 |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A15. Actinomicetes que presentaron actividad antimicrobiana**

| <b>CÓDIGO</b> | <b>G+</b> | <b>G-</b> | <b>FUSARIUM</b> | <b>BOTRYTIS</b> |
|---------------|-----------|-----------|-----------------|-----------------|
| DCB-1402      | +         | -         | -               | +               |
| DCB-1403      | -         | -         | -               | +               |
| DCB-1412      | -         | -         | +               | -               |
| DCB-1413      | -         | +         | +               | +               |
| DCB-1416      | -         | -         | -               | +               |
| DCB-1418      | -         | -         | -               | +               |
| DCB-1424      | -         | -         | -               | +               |
| DCB-1441      | -         | -         | -               | +               |
| DCB-1449      | -         | -         | +               | +               |
| DCB-1450      | -         | -         | +               | +               |
| DCB-1452      | -         | +         | -               | -               |
| DCB-1464      | -         | +         | -               | -               |
| DCB-1473      | -         | +         | -               | -               |
| DCB-1486      | -         | -         | +               | +               |
| DCB-1488      | +         | +         | -               | -               |
| DCB-1490      | +         | -         | -               | -               |
| DCB-1493      | -         | -         | +               | +               |
| DCB-1497      | +         | +         | -               | +               |
| DCB-1504      | -         | +         | -               | -               |
| DCB-1505      | -         | +         | -               | -               |
| DCB-1511      | +         | +         | -               | -               |
| DCB-1512      | -         | +         | -               | -               |
| DCB-1520      | -         | -         | -               | +               |
| DCB-1521      | -         | +         | -               | -               |
| DCB-1530      | -         | +         | -               | -               |
| DCB-1543      | +         | +         | -               | +               |
| DCB-1545      | +         | +         | -               | -               |
| DCB-1548      | -         | -         | -               | +               |
| DCB-1552      | +         | -         | -               | -               |
| DCB-1554      | -         | +         | -               | -               |
| DCB-1555      | +         | -         | -               | -               |
| DCB-1560      | +         | +         | -               | -               |
| DCB-1570      | -         | -         | +               | +               |
| DCB-1571      | -         | -         | -               | +               |
| DCB-1572      | +         | +         | +               | -               |
| DCB-1579      | +         | +         | -               | -               |
| DCB-1580      | +         | +         | -               | -               |
| DCB-1583      | -         | -         | +               | -               |
| DCB-1585      | +         | -         | +               | +               |
| DCB-1588      | +         | -         | -               | +               |
| DCB-1593      | +         | +         | -               | +               |
| DCB-1594      | +         | +         | +               | +               |
| DCB-1597      | -         | +         | -               | -               |
| DCB-1598      | -         | -         | -               | +               |

**Tabla A16. Diámetros de inhibición en mm frente a la Bacteria gran positiva (G-)**

| <b>CÓDIGO</b> | <b>R1</b> | <b>R2</b> |
|---------------|-----------|-----------|
| DCB-1413      | 11        | 12        |
| DCB-1452      | 15        | 14        |
| DCB-1464      | 9         | 9         |
| DCB-1473      | 10        | 11        |
| DCB-1488      | 10        | 12        |
| DCB-1497      | 10        | 10        |
| DCB-1504      | 13        | 14        |
| DCB-1505      | 11        | 11        |
| DCB-1511      | 14        | 14        |
| DCB-1512      | 9         | 8         |
| DCB-1521      | 14        | 15        |
| DCB-1530      | 11        | 11        |
| DCB-1543      | 10        | 9         |
| DCB-1545      | 10        | 11        |
| DCB-1554      | 10        | 8         |
| DCB-1560      | 13        | 13        |
| DCB-1572      | 10        | 11        |
| DCB-1579      | 24        | 22        |
| DCB-1580      | 21        | 22        |
| DCB-1593      | 15        | 15        |
| DCB-1594      | 13        | 14        |
| DCB-1597      | 11        | 10        |
| Control       | 13        | 13        |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A17. Diámetros de inhibición en mm frente a la Bacteria gran positiva (G+)**

| <b>CÓDIGO</b> | <b>R1</b> | <b>R2</b> |
|---------------|-----------|-----------|
| DCB-1402      | 13        | 12        |
| DCB-1488      | 12        | 13        |
| DCB-1490      | 11        | 11        |
| DCB-1497      | 14        | 14        |
| DCB-1511      | 11        | 14        |
| DCB-1543      | 12        | 10        |
| DCB-1545      | 10        | 13        |
| DCB-1552      | 11        | 12        |
| DCB-1555      | 11        | 12        |
| DCB-1560      | 11        | 11        |
| DCB-1572      | 13        | 14        |
| DCB-1579      | 24        | 21        |
| DCB-1580      | 22        | 25        |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A17. Continuación...**

| <b>CÓDIGO</b> | <b>R1</b> | <b>R2</b> |
|---------------|-----------|-----------|
| DCB-1585      | 11        | 13        |
| DCB-1588      | 12        | 12        |
| DCB-1593      | 19        | 19        |
| DCB-1594      | 20        | 19        |
| Control       | 16        | 17        |
| Control       | 19        | 18        |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A18. Diámetros de inhibición en mm frente a *Fusarium***

| <b>CÓDIGO</b> | <b>R1</b> | <b>R2</b> |
|---------------|-----------|-----------|
| DCB-1412      | 15        | 16        |
| DCB-1413      | 22        | 24        |
| DCB-1449      | 12        | 12        |
| DCB-1450      | 11        | 12        |
| DCB-1486      | 10        | 10        |
| DCB-1497      | 11        | 11        |
| DCB-1570      | 15        | 17        |
| DCB-1572      | 15        | 15        |
| DCB-1583      | 20        | 14        |
| DCB-1585      | 20        | 21        |
| DCB-1594      | 22        | 22        |
| Control       | 37        | 50        |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla A19. Diámetros de inhibición en mm frente a *Botrytis***

| <b>CÓDIGO</b> | <b>R1</b> | <b>R2</b> |
|---------------|-----------|-----------|
| DCB-1402      | 45        | 41        |
| DCB-1403      | 35        | 45        |
| DCB-1413      | 25        | 27        |
| DCB-1416      | 18        | 15        |
| DCB-1418      | 14        | 15        |
| DCB-1424      | 24        | 22        |
| DCB-1441      | 20        | 19        |
| DCB-1449      | 16        | 20        |
| DCB-1450      | 20        | 21        |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011



Tabla A19.Continuación...

| <b>CÓDIGO</b> | <b>R1</b> | <b>R2</b> |
|---------------|-----------|-----------|
| DCB-1486      | 23        | 21        |
| DCB-1493      | 26        | 21        |
| DCB-1497      | 14        | 14        |
| DCB-1520      | 15        | 24        |
| DCB-1543      | 18        | 19        |
| DCB-1548      | 15        | 16        |
| DCB-1570      | 13        | 14        |
| DCB-1571      | 15        | 13        |
| DCB-1585      | 22        | 27        |
| DCB-1588      | 12        | 17        |
| DCB-1593      | 12        | 14        |
| DCB-1594      | 20        | 19        |
| DCB-1598      | 15        | 30        |
| Control       | 45        | 41        |

# **ANEXO B**

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

**Tabla B1. Análisis de varianza para el número de ufc de bacterias por gramo de suelo seco (ufc/g).**

| Fuente de variación              | g.l | SC       | CM       | Fc      | Probabilidad |
|----------------------------------|-----|----------|----------|---------|--------------|
| <b>A: Lugares de Recolección</b> | 3   | 5.195e14 | 1.732e14 | 649.235 | 0.000**      |
| <b>B: Medios de Cultivo</b>      | 1   | 1.389e14 | 1.389e14 | 520.581 | 0.000**      |
| <b>AB</b>                        | 3   | 5.300e14 | 1.767e14 | 662.288 | 0.000**      |
| <b>Error</b>                     | 8   | 2.134e12 | 2.667e11 |         |              |
| <b>Total</b>                     | 15  | 1.190e15 |          |         |              |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B2. Separación de medias para el número de bacterias por gramo de suelo seco por sitio de recolección.**

| Factor A               | Niveles | Sitio         | ufc/g suelo seco | Rango |
|------------------------|---------|---------------|------------------|-------|
| Lugares de Recolección | a3      | San Francisco | 2.176e+007       | A     |
|                        | a0      | Tosagua       | 1.857e+007       | B     |
|                        | a2      | Misahualli    | 1.826e+007       | B     |
|                        | a1      | Cotopaxi      | 6.758e+006       | C     |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B3. Separación de medias para el número de bacterias por gramo de suelo seco de la interacción A x B**

| Tratamientos   | Descripción | ufc/g suelo seco    | Rango     |    |
|----------------|-------------|---------------------|-----------|----|
| Interacción AB | a2b1        | Misahuallí + ASA    | 2,98E+007 | A  |
|                | a3b1        | San Francisco + ASA | 2,63E+007 | B  |
|                | a0b0        | Tosagua + GYM       | 1,93E+007 | C  |
|                | a0b1        | Tosagua + ASA       | 1,78E+007 | CD |
|                | a3b0        | San Francisco + GYM | 1,72E+007 | D  |
|                | a1b0        | Cotopaxi + GYM      | 1,03E+007 | E  |
|                | a2b0        | Misahuallí + GYM    | 6,73E+006 | F  |
|                | a1b1        | Cotopaxi + ASA      | 3,18E+006 | G  |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B4. Análisis de varianza para el número de ufc de actinomicetes por gramo de suelo seco (ufc/g)**

| Fuente de variación              | g.l | SC      | CM      | Fc        | Probabilidad |
|----------------------------------|-----|---------|---------|-----------|--------------|
| <b>A: Lugares de Recolección</b> | 3   | 1.17e17 | 3.91e16 | 139.8261  | 0.000**      |
| <b>B: Medios de Cultivo</b>      | 1   | 6.42e17 | 6.42e17 | 2295.6246 | 0.000**      |
| <b>AB</b>                        | 3   | 7.29e16 | 2.43e16 | 86.8636   | 0.000**      |
| <b>Error</b>                     | 8   | 2.24e15 | 2.80e14 |           |              |
| <b>Total</b>                     | 15  | 8.35e17 |         |           |              |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B5. Separación de medias para el número de actinomicetes por gramo de suelo seco por sitio de recolección.**

| Factor A               | Niveles | Sitio         | ufc/g suelo seco | Rango |
|------------------------|---------|---------------|------------------|-------|
| Lugares de Recolección | A0      | Tosagua       | 1.064e+007       | A     |
|                        | A1      | Cotopaxi      | 9.867e+006       | A     |
|                        | A3      | San Francisco | 9.732e+006       | A     |
|                        | A2      | Misahualli    | 3.874e+006       | B     |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B6. Separación de medias para el número de actinomicetes por gramo de suelo seco de la interacción A x B.**

| Tratamientos   | Descripción | ufc/g suelo seco    | Rango      |   |
|----------------|-------------|---------------------|------------|---|
| Interacción AB | a0b0        | Tosagua + GYM       | 1.930e+007 | A |
|                | a1b0        | Cotopaxi + GYM      | 1.683e+007 | B |
|                | a3b0        | San Francisco + GYM | 1.660e+007 | B |
|                | a2b0        | Misahualli + GYM    | 6.728e+006 | C |
|                | a1b1        | Cotopaxi + ASA      | 2.906e+006 | D |
|                | a3b1        | San Francisco + ASA | 2.866e+006 | D |
|                | a0b1        | Tosagua + ASA       | 1.971e+006 | D |
|                | a2b1        | Misahualli + ASA    | 1.021e+006 | D |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B7. Análisis de varianza para el porcentaje actinomicetes**

| Fuente de variación              | g.l | SC       | CM       | Fc       | Probabilidad |
|----------------------------------|-----|----------|----------|----------|--------------|
| <b>A: Lugares de Recolección</b> | 3   | 861.42   | 287.14   | 11.570   | 0.000**      |
| <b>B: Medios de Cultivo</b>      | 1   | 25800.39 | 25800.39 | 1039.579 | 0.000**      |
| <b>AB</b>                        | 3   | 1276.00  | 425.33   | 17.138   | 0.000**      |
| <b>Error</b>                     | 8   | 198.55   | 24.82    |          |              |
| <b>Total</b>                     | 15  | 28136.36 |          |          |              |

**Tabla B8. Separación de medias para el porcentaje de actinomicetes por sitio de recolección.**

| Factor A                  | Niveles | Sitio         | ufc/g suelo seco | Rango |
|---------------------------|---------|---------------|------------------|-------|
| Lugares de<br>Recolección | A1      | Cotopaxi      | 70.32            | A     |
|                           | A0      | Tosagua       | 55.53            | B     |
|                           | A3      | San Francisco | 53.75            | B     |
|                           | A2      | Misahualli    | 51.72            | B     |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B9. Separación de medias para el porcentaje de actinomicetes de la interacción A x B.**

| Tratamientos   | Descripción | ufc/g suelo seco    | Rango  |   |
|----------------|-------------|---------------------|--------|---|
| Interacción AB | a0b0        | Tosagua + GYM       | 100.00 | A |
|                | a2b0        | Misahualli + GYM    | 100.00 | A |
|                | a3b0        | San Francisco + GYM | 96.55  | A |
|                | a1b0        | Cotopaxi + GYM      | 95.40  | A |
|                | a1b1        | Cotopaxi + ASA      | 45.25  | B |
|                | a0b1        | Tosagua + ASA       | 11.05  | C |
|                | a3b1        | San Francisco + ASA | 10.95  | C |
|                | a2b1        | Misahualli + ASA    | 3.45   | C |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B10. Análisis de varianza para la diversidad de actinomicetes**

| Fuente de variación              | g.l | SC      | CM     | Fc     | Probabilidad |
|----------------------------------|-----|---------|--------|--------|--------------|
| <b>A: Lugares de Recolección</b> | 3   | 60.688  | 20.229 | 2.4707 | 0.1363       |
| <b>B: Medios de Cultivo</b>      | 1   | 60.063  | 60.063 | 7.3359 | 0.0267       |
| <b>AB</b>                        | 3   | 33.188  | 11.063 | 1.3511 | 0.3250       |
| <b>Error</b>                     | 8   | 65.500  | 8.188  |        |              |
| <b>Total</b>                     | 15  | 219.438 |        |        |              |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B11. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram Negativa**

| Fuente de Variación | g.l | SC     | CM     | Fc    | Probabilidad |
|---------------------|-----|--------|--------|-------|--------------|
| Tratamientos        | 25  | 636.25 | 25.45  | 57.54 | 0.0000       |
| Error               | 26  | 11.5   | 0.4423 |       |              |
| Total               | 51  | 647.75 |        |       |              |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B12. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram Negativa**

| Tratamiento | Código   | Diámetro (mm) | Rango |
|-------------|----------|---------------|-------|
| 17          | DCB-1579 | 23.0          | a     |
| 18          | DCB-1580 | 22.0          | a     |
| 19          | DCB-1593 | 15.0          | b     |
| 1           | DCB-1452 | 14.5          | b     |
| 10          | DCB-1521 | 14.5          | b     |
| 8           | DCB-1511 | 14.0          | bc    |
| 20          | DCB-1594 | 13.5          | bcd   |
| 6           | DCB-1504 | 13.5          | bcd   |
| 15          | DCB-1560 | 13.0          | bcde  |
| 22          | Control  | 13.0          | bcde  |
| 0           | DCB-1413 | 11.5          | cdef  |
| 7           | DCB-1505 | 11.0          | defg  |
| 4           | DCB-1488 | 11.0          | defg  |
| 11          | DCB-1530 | 11.0          | defg  |
| 13          | DCB-1545 | 10.5          | efg   |
| 3           | DCB-1473 | 10.5          | efg   |
| 16          | DCB-1572 | 10.5          | efg   |
| 21          | DCB-1597 | 10.5          | efg   |
| 5           | DCB-1497 | 10.0          | fg    |
| 12          | DCB-1543 | 9.5           | fg    |
| 2           | DCB-1464 | 9.0           | fg    |
| 14          | DCB-1554 | 9.0           | fg    |
| 9           | DCB-1512 | 8.5           | g     |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B13. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram Positiva**

| <b>Fuente de Variación</b> | <b>g.l</b> | <b>SC</b> | <b>CM</b> | <b>Fc</b> | <b>Probabilidad</b> |
|----------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|---------------------|
| Tratamientos               | 21         | 618.659   | 29.46     | 22.74     | 0.0000              |
| Error                      | 22         | 28.5      | 1.295     |           |                     |
| Total                      | 43         | 647.159   |           |           |                     |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B14. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram Positiva**

| <b>Tratamiento</b> | <b>Código</b> | <b>Diámetro (mm)</b> | <b>Rango</b> |
|--------------------|---------------|----------------------|--------------|
| 12                 | DCB-1580      | 23.5                 | a            |
| 11                 | DCB-1579      | 22.5                 | ab           |
| 16                 | DCB-1594      | 19.5                 | abc          |
| 15                 | DCB-1593      | 19.0                 | abc          |
| 18                 | Control       | 18.5                 | bcd          |
| 17                 | Control       | 16.5                 | cde          |
| 3                  | DCB-1497      | 14.0                 | def          |
| 10                 | DCB-1572      | 13.5                 | ef           |
| 4                  | DCB-1511      | 12.5                 | ef           |
| 1                  | DCB-1488      | 12.5                 | ef           |
| 0                  | DCB-1402      | 12.5                 | ef           |
| 14                 | DCB-1588      | 12.0                 | ef           |
| 13                 | DCB-1585      | 12.0                 | ef           |
| 8                  | DCB-1555      | 11.5                 | f            |
| 7                  | DCB-1552      | 11.5                 | f            |
| 6                  | DCB-1545      | 11.5                 | f            |
| 9                  | DCB-1560      | 11.0                 | f            |
| 5                  | DCB-1543      | 11.0                 | f            |
| 2                  | DCB-1490      | 11.0                 | f            |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B15. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium***

| Fuente de Variación | g.l | SC      | CM      | Fc    | Probabilidad |
|---------------------|-----|---------|---------|-------|--------------|
| Tratamientos        | 13  | 1862.86 | 143.297 | 18.58 | 0.0000       |
| Error               | 14  | 108.00  | 7.714   |       |              |
| Total               | 27  | 1970.86 |         |       |              |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B16. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium***

| Tratamiento | Código   | Diámetro (mm) | Rango |
|-------------|----------|---------------|-------|
| 11          | Control  | 43.5          | a     |
| 1           | DCB-1413 | 23.0          | b     |
| 10          | DCB-1594 | 22.0          | bc    |
| 9           | DCB-1585 | 20.5          | bcd   |
| 8           | DCB-1583 | 17.0          | bcd   |
| 0           | DCB-1412 | 15.5          | bcd   |
| 6           | DCB-1570 | 15.0          | bcd   |
| 7           | DCB-1572 | 14.0          | bcd   |
| 2           | DCB-1449 | 12.0          | bcd   |
| 3           | DCB-1450 | 11.5          | cd    |
| 5           | DCB-1497 | 11.0          | cd    |
| 4           | DCB-1486 | 10.0          | d     |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

**Tabla B17. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis***

| Fuente de Variación | g.l | SC      | CM      | Fc    | Probabilidad |
|---------------------|-----|---------|---------|-------|--------------|
| Tratamientos        | 26  | 3656.33 | 140.628 | 13.14 | 0.0000       |
| Error               | 27  | 289.0   | 107.037 |       |              |
| Total               | 53  | 3945.33 |         |       |              |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011



**Tabla B18. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis***

| Tratamiento | Código   | Diámetro (mm) | Rango |
|-------------|----------|---------------|-------|
| 0           | DCB-1402 | 43.0          | a     |
| 22          | Control  | 43.0          | a     |
| 1           | DCB-1403 | 40.0          | a     |
| 2           | DCB-1413 | 26.0          | b     |
| 17          | DCB-1585 | 24.5          | b     |
| 10          | DCB-1493 | 23.5          | b     |
| 5           | DCB-1424 | 23.0          | b     |
| 21          | DCB-1598 | 22.5          | b     |
| 9           | DCB-1486 | 22.0          | b     |
| 8           | DCB-1450 | 20.5          | b     |
| 12          | DCB-1520 | 19.5          | b     |
| 20          | DCB-1594 | 19.5          | b     |
| 6           | DCB-1441 | 19.5          | b     |
| 13          | DCB-1543 | 18.5          | b     |
| 7           | DCB-1449 | 18.0          | b     |
| 3           | DCB-1416 | 16.5          | b     |
| 14          | DCB-1548 | 15.5          | b     |
| 18          | DCB-1588 | 14.5          | b     |
| 4           | DCB-1418 | 14.5          | b     |
| 11          | DCB-1497 | 14.0          | b     |
| 16          | DCB-1571 | 14.0          | b     |
| 15          | DCB-1570 | 13.5          | b     |
| 19          | DCB-1593 | 13.0          | b     |

Elaborado por: Diana Tipán, 2011

# **ANEXO C**

## **GRÁFICOS**

Figura C1. Aislamiento y purificación de actinomicetes

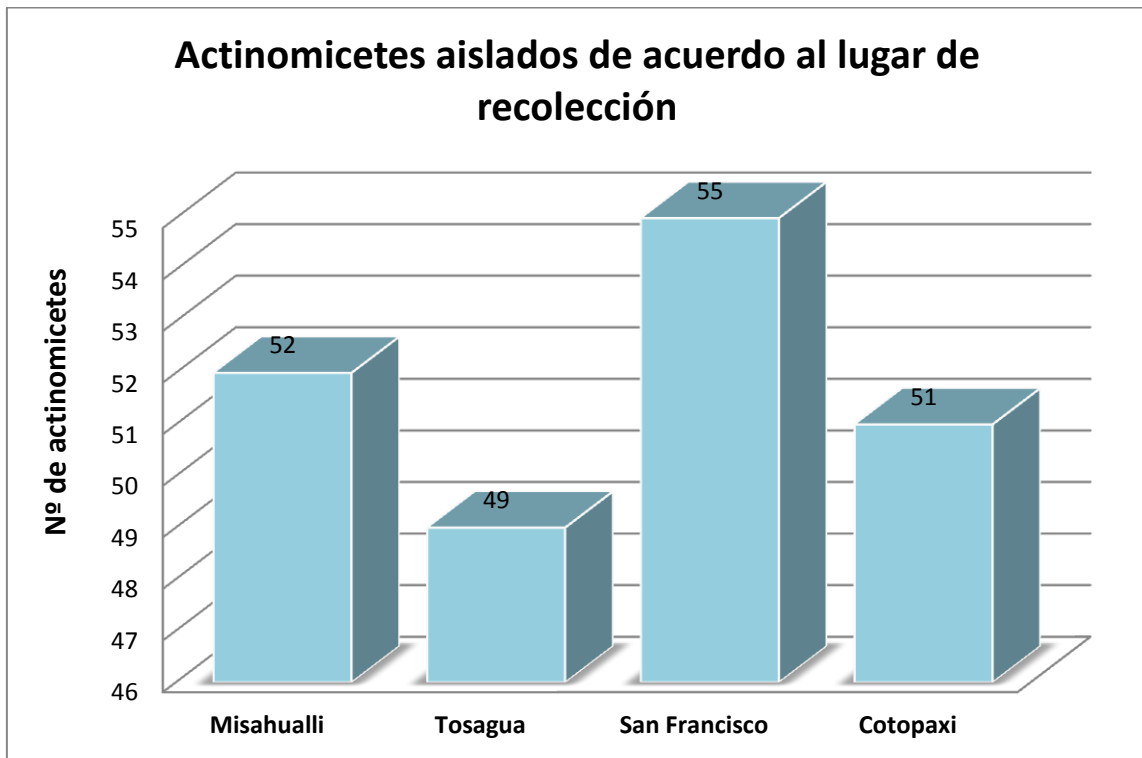


Figura C2. Caracterización microscópica

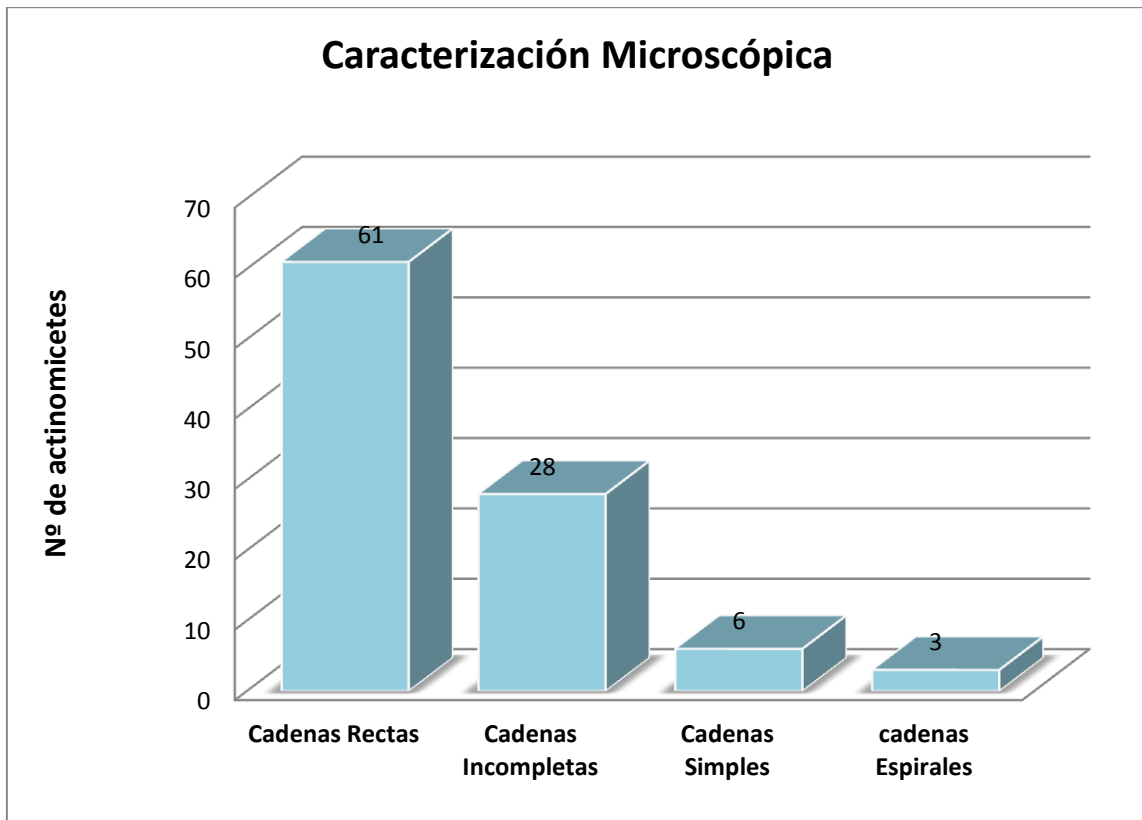


Figura C3. Rango de Crecimiento en Función de la Temperatura

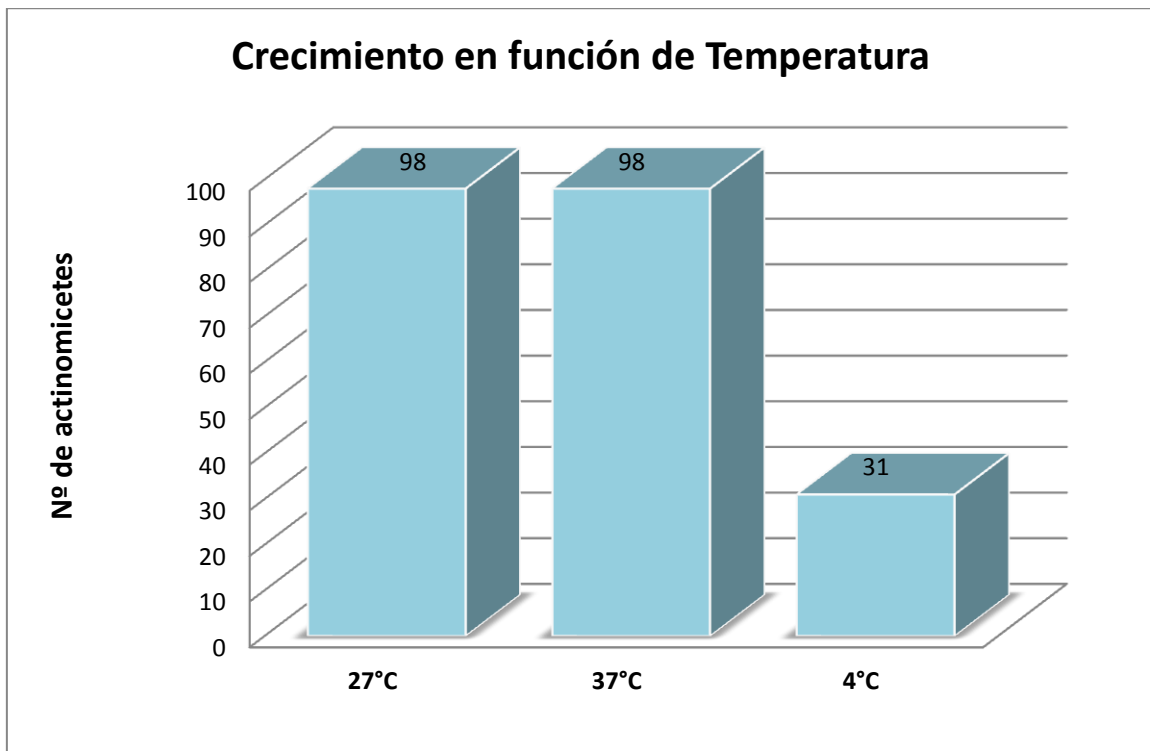


Figura C4. Crecimiento en Función del pH

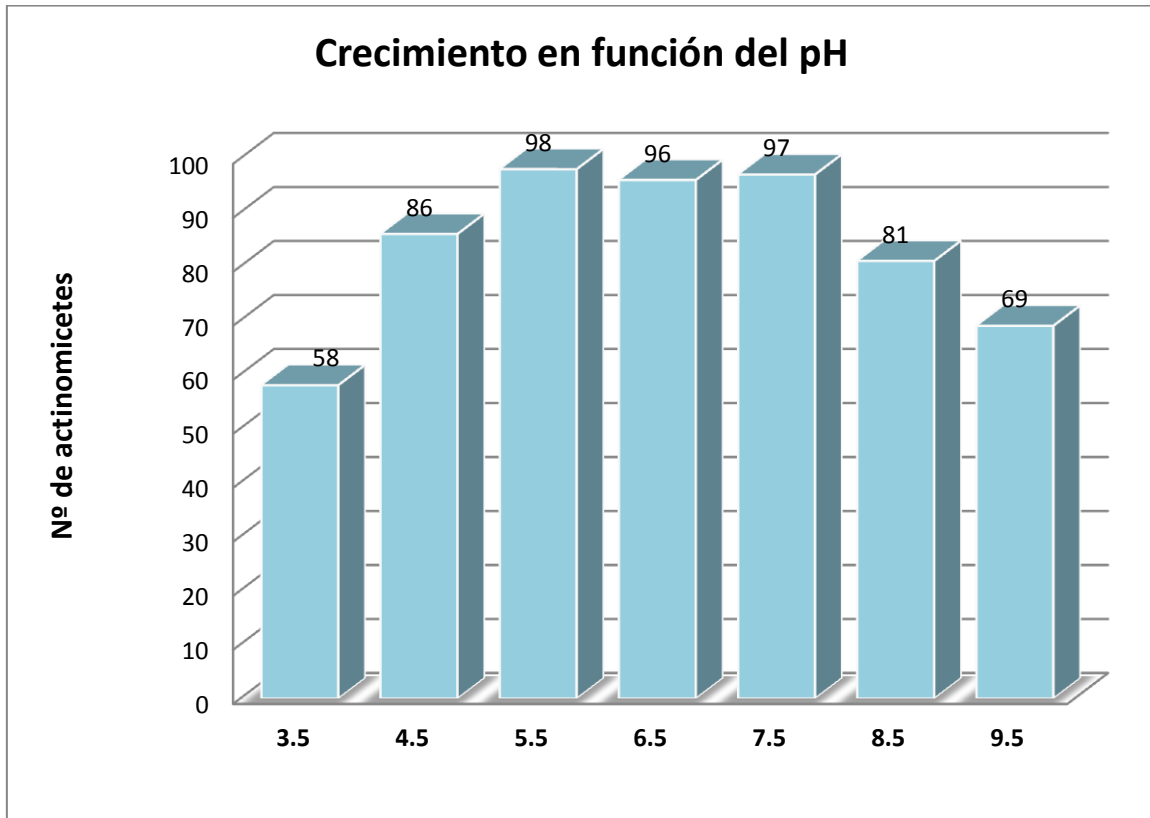


Figura C5. Crecimiento en diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno

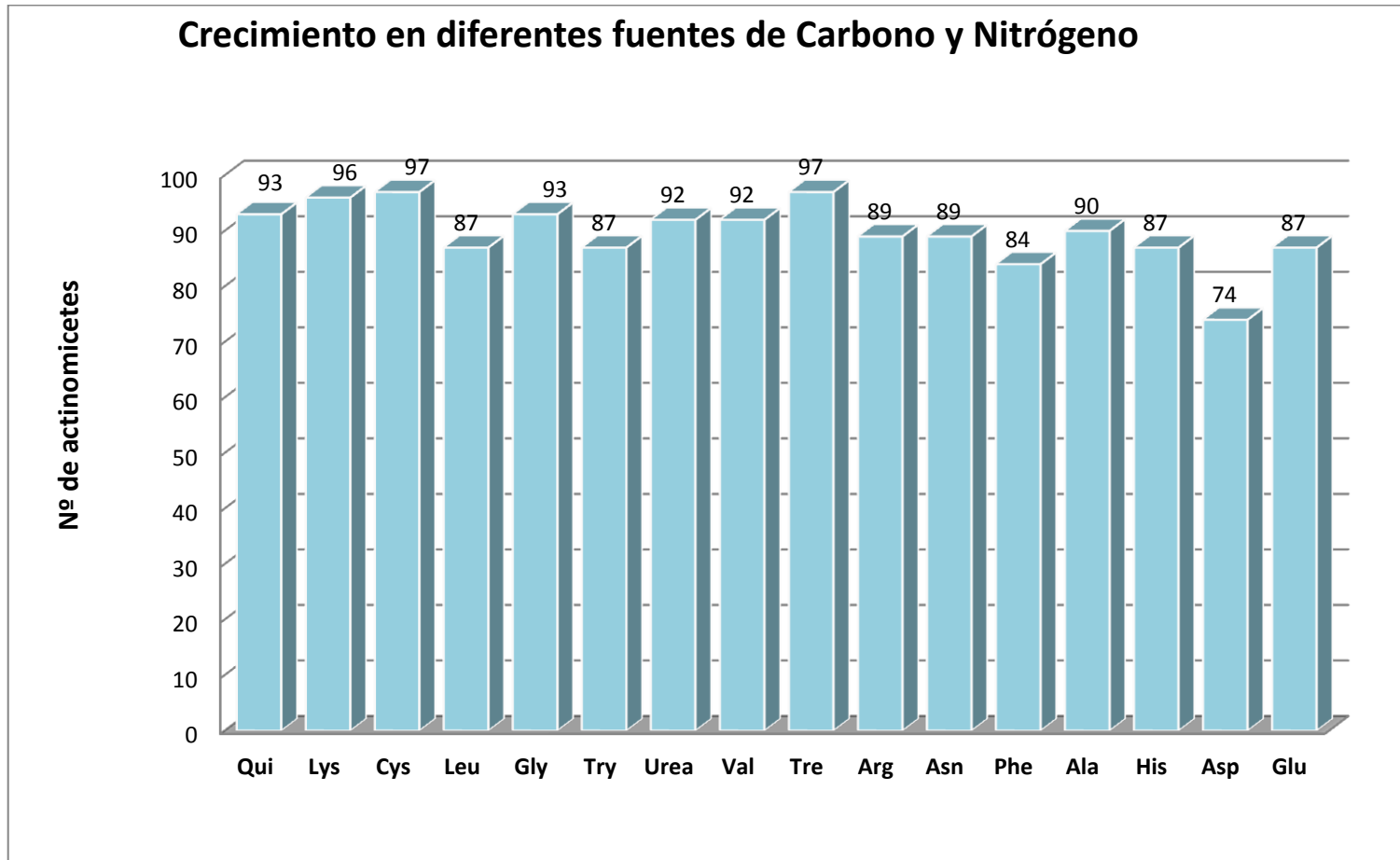


Figura C6. Dendrograma

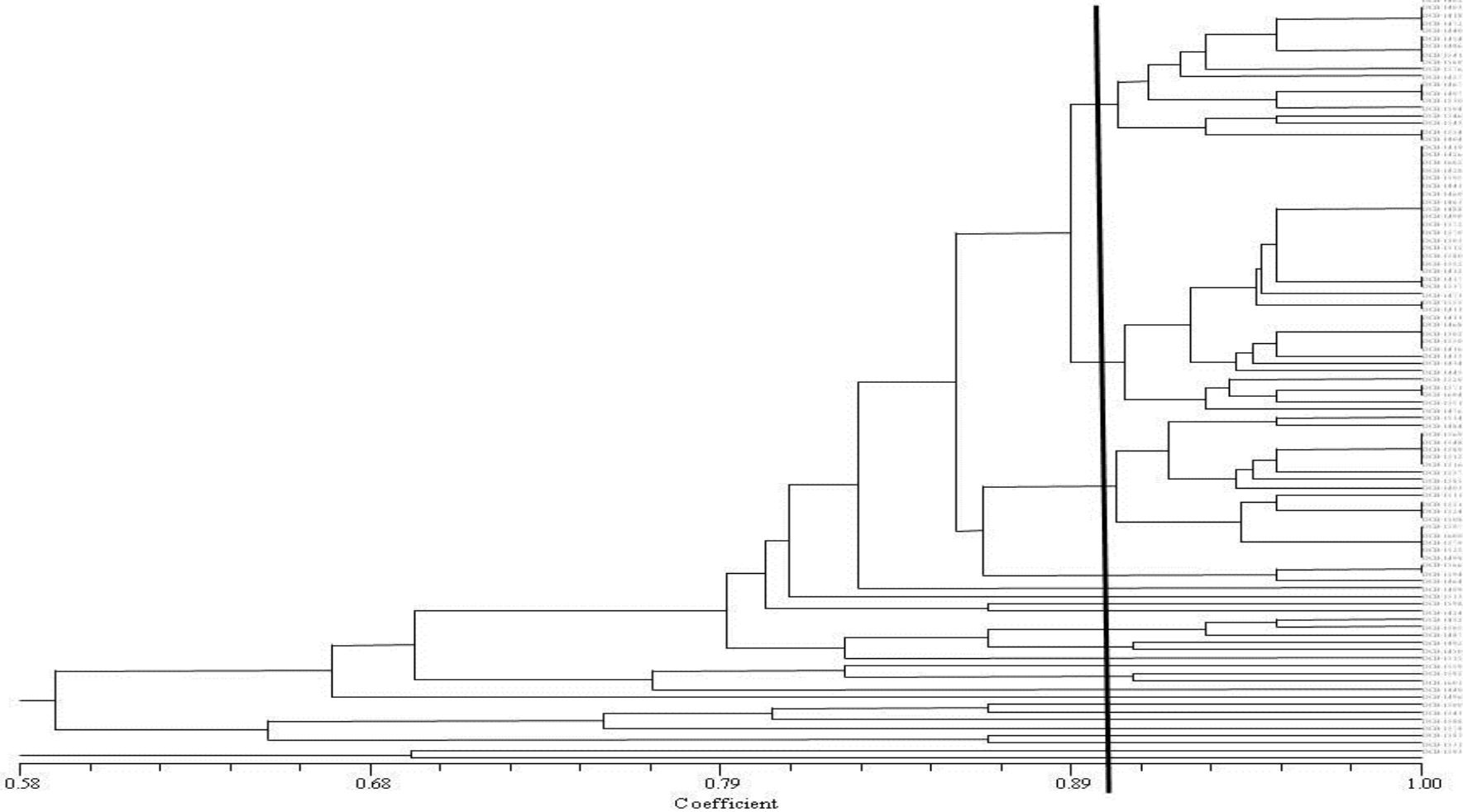


Figura C7. Formación de Grupos – Especie

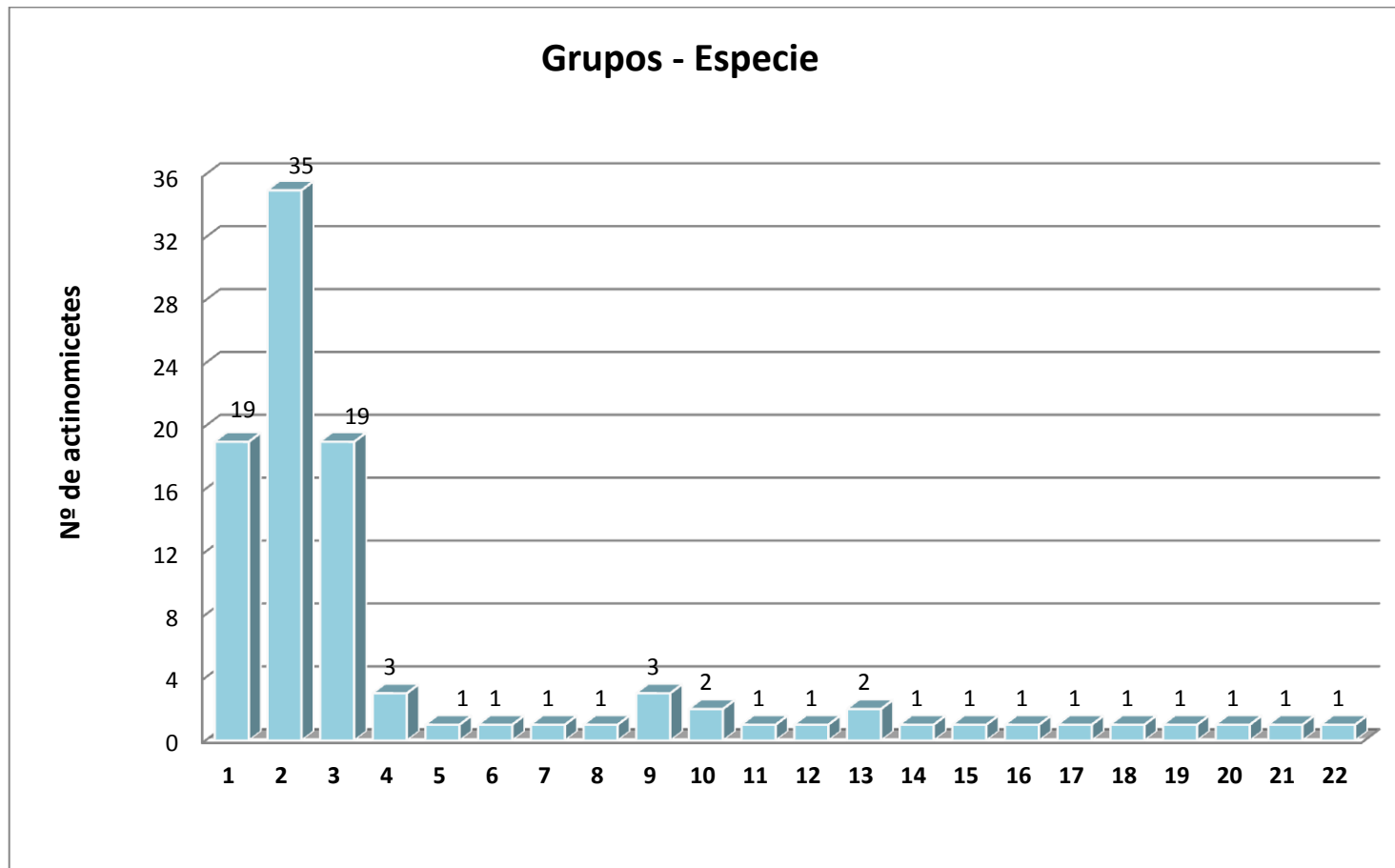
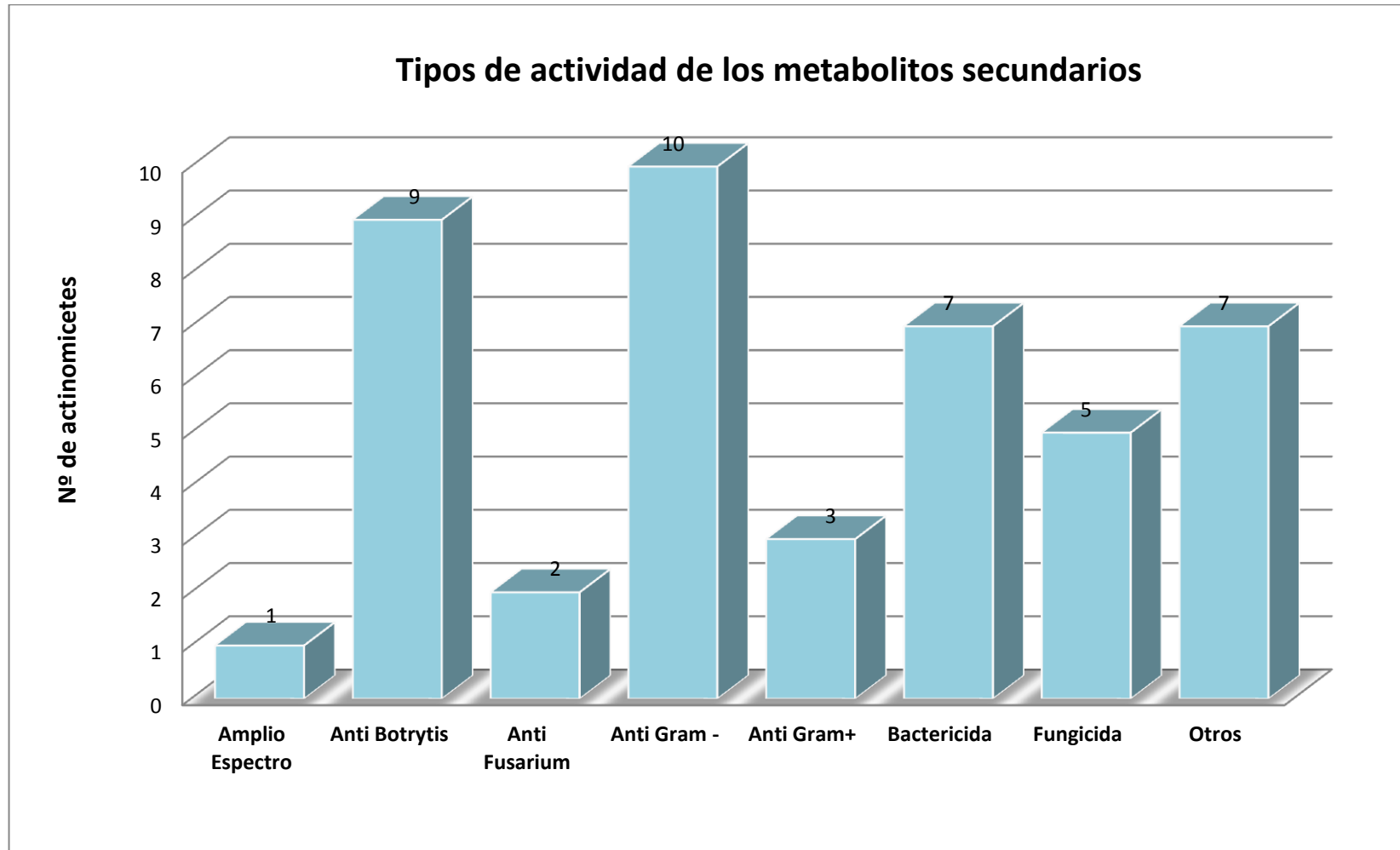


Figura C8. Tipos de actividad de los metabolitos secundarios producidos por actinomicetes





# **ANEXO D**

## **MEDIOS DE CULTIVOS Y SOLUCIONES**

### **Agar GYM**

---

|                      |            |
|----------------------|------------|
| GLUCOSA              | 4.00 G     |
| EXTRACTO DE LEVADURA | 10.00 G    |
| EXTRACTO DE MALTA    | 10.00 G    |
| CACO <sub>3</sub>    | 2.00 G     |
| AGAR                 | 15.00 G    |
| AGUA                 | 1000.00 ML |

---

### **Agar Sucrosa Aminoácido (ASA)**

---

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| GLUCOSA                              | 10.00 G    |
| L-ÁCIDO ASPÁRTICO                    | 0.10 G     |
| L-ÁCIDO GLUTÁMICO                    | 0.10 G     |
| CACO <sub>3</sub>                    | 0.02 G     |
| FESO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 0.01 G     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 2.00 G     |
| MGSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 0.05 G     |
| AGAR                                 | 15.00 G    |
| AGUA                                 | 1000.00 ML |

---

### **Agar PDA**

---

|      |            |
|------|------------|
| Agar | 39.00 g    |
| Agua | 1000.00 ml |

---

### **Agar Benedict**

---

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| Extracto de carne                 | 1.00 g     |
| Glucosa                           | 10.00 g    |
| Hidrolizado Enzimático de Caseína | 2.00 g     |
| Extracto de levadura              | 1.00 g     |
| Almidón o Celulosa                | 1.00 g     |
| Agar                              | 15.00 g    |
| Agua                              | 1000.00 ml |

---

### **Medio Basal para Aminoácidos**

---

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| Aminoácidos                          | 1.00 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0.50 g     |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 0.50 g     |
| Agar                                 | 15.00 g    |
| Agua                                 | 1000.00 ml |

---

### **Soluciones Buffers**

---

| pH  | 0.1M C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> | 0.2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|-----|---|---------------------------------------|
| 3.5 | 69.75   | 30.25                                 |
| 4.5 | 54.57   | 45.43                                 |
| 5.5 | 43.13   | 56.87                                 |
| 6.5 | 29.04   | 70.96                                 |
| 7.5 | 7.62  | 92.38                                 |

---

|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| 0.1M Acido Cítrico                    | 21.014 g en 1000 ml |
| 0.2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 28.400 g en 1000 ml |

---

# **ANEXO E**

## **FOTOGRAFÍAS**

## Recolección de muestras de Suelos

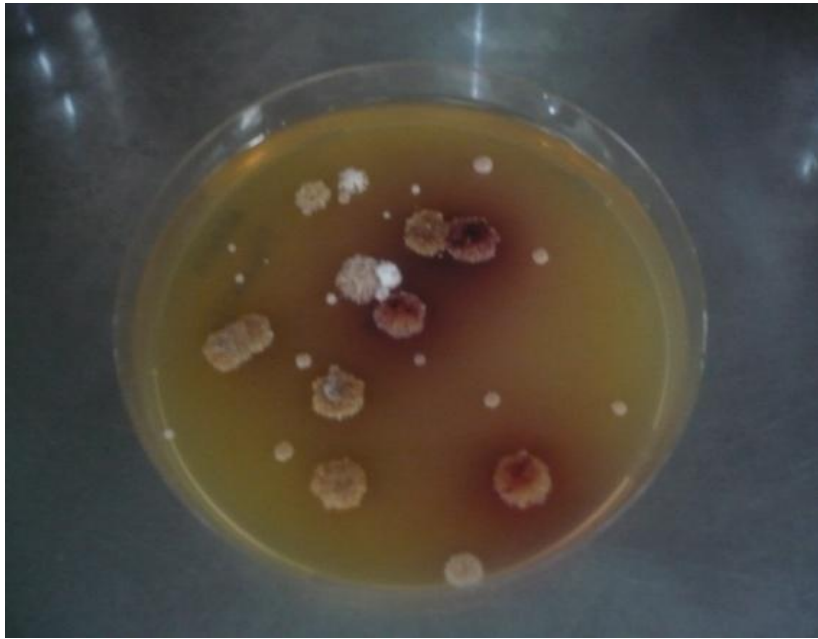


Fotografía 1. Bosque de Pinos

## Determinación de la población de actinomicetes acidofílicos



Fotografía 2. 1/100

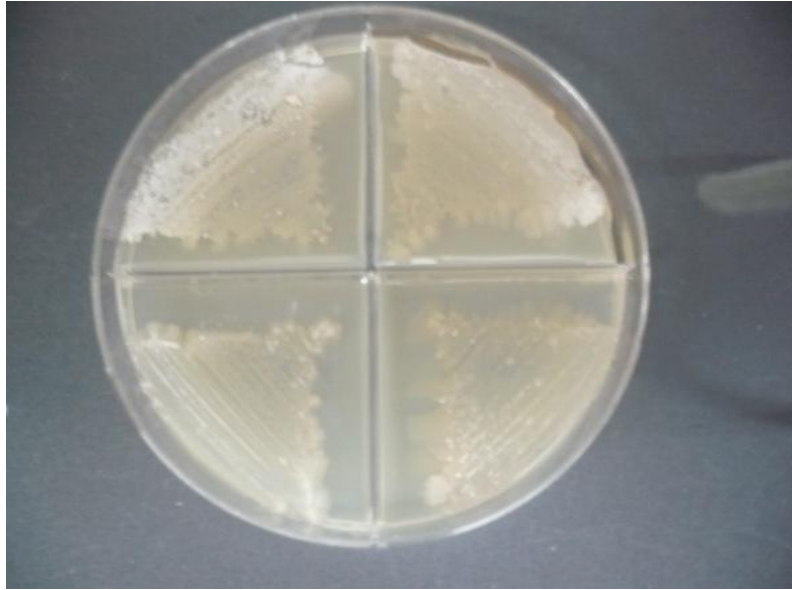


**Fotografía 3. 1/1000**



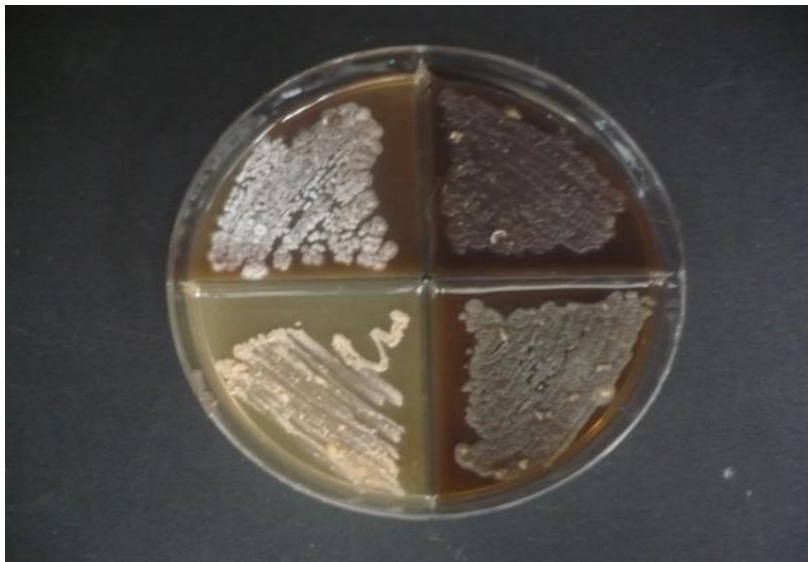
**Fotografía 4. 1/10000**

## Aislamiento y purificación de actinomicetes acidofílicos

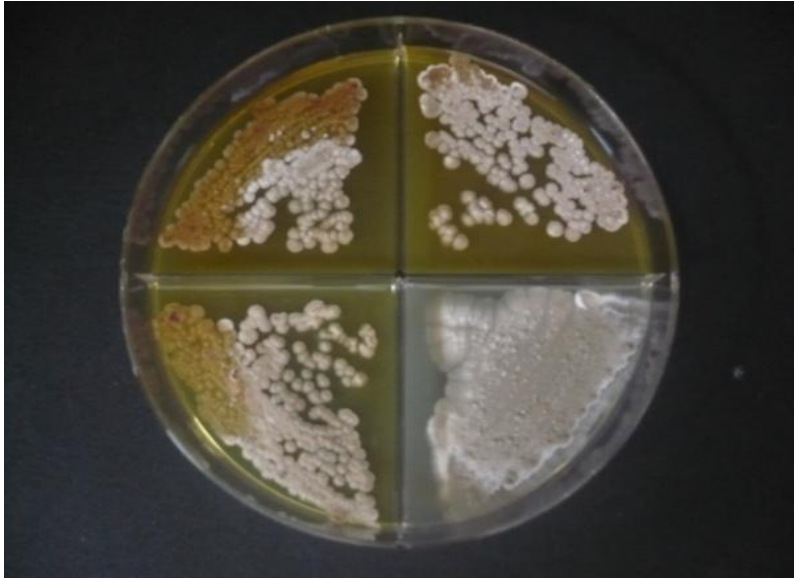


Fotografía 5. Purificación de actinos

## Caracterización macroscópica



Fotografía 6. San Francisco



Fotografía 7. Tosagua



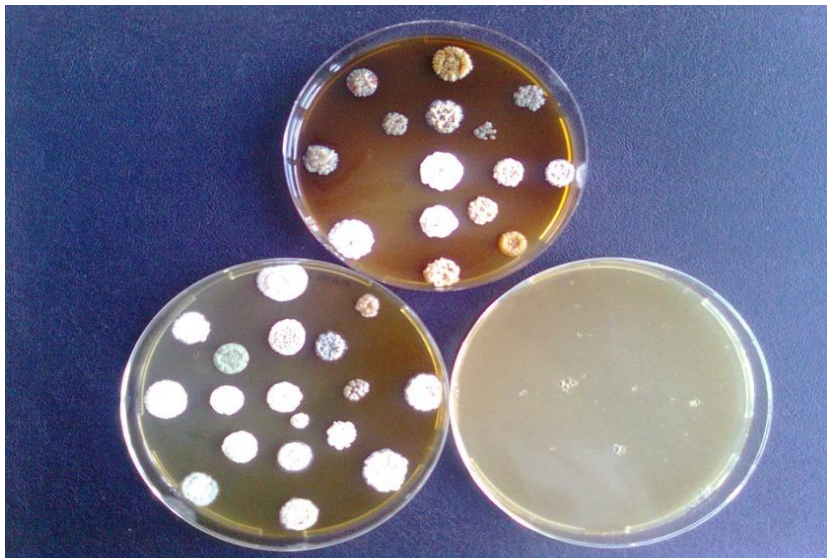
Fotografía 8. Cotopaxi





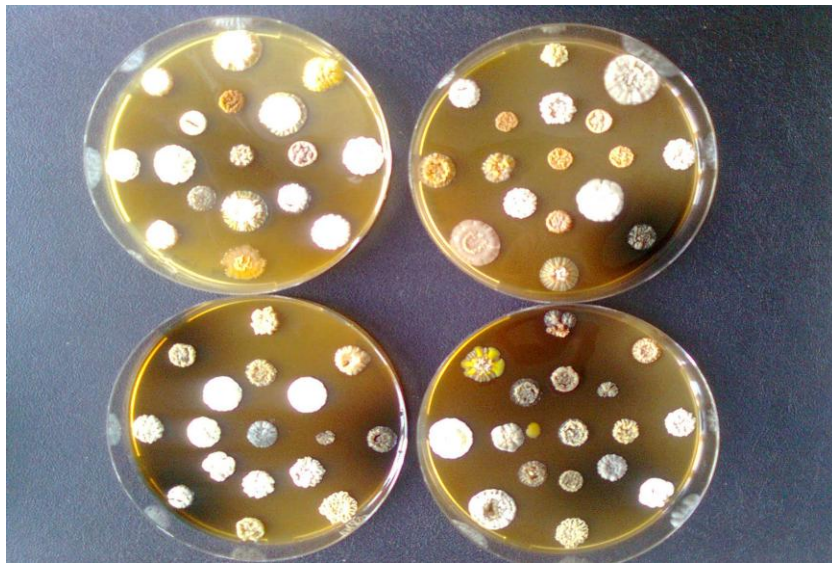
Fotografía 9. Misahualli

### Crecimiento en Función de la Temperatura



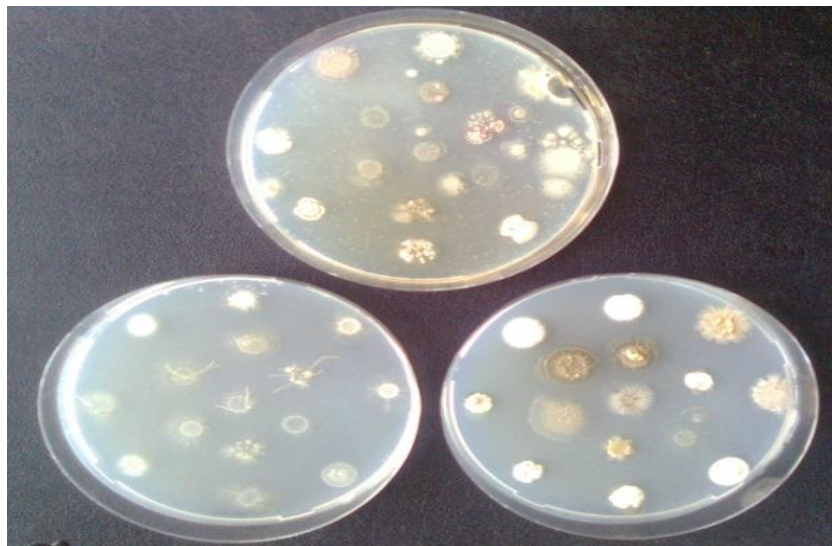
Fotografía 10. 4°C, 28°C y 50°C

### Crecimiento en Función del pH

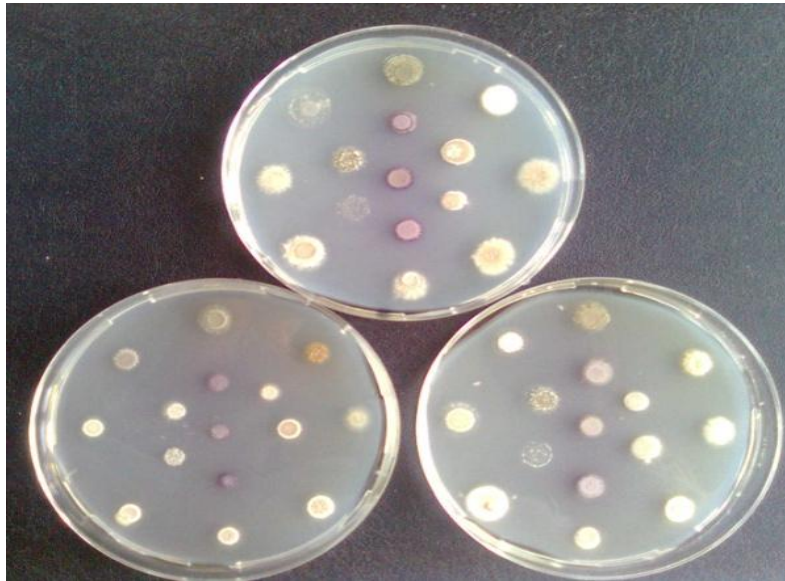


Fotografía 11. 3,5; 4,5; 5,5; 6,5;

### Uso de Diferentes Fuentes de Carbono y Nitrógeno

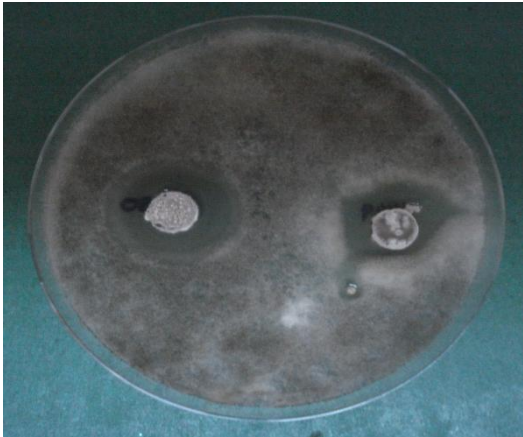


Fotografía 12. Pruebas Taxonómica

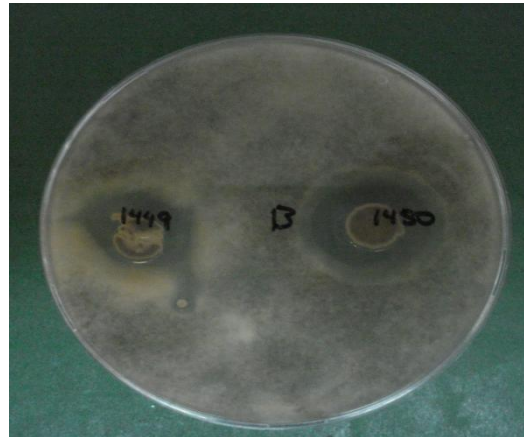


. Fotografía 13. Pruebas Taxonómicas

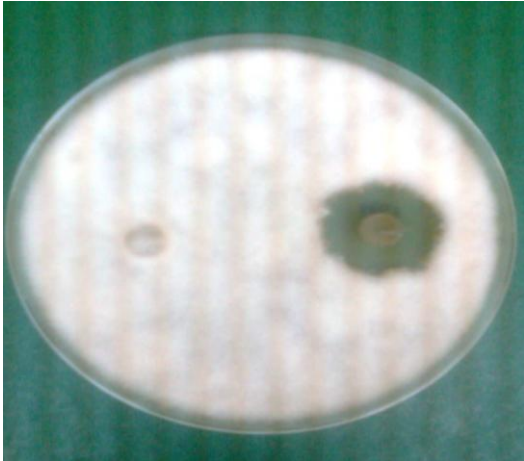
### Antagonismo Microbiano



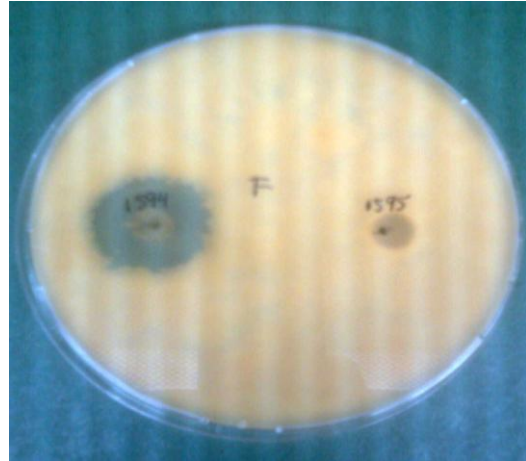
Fotografía 14. *Botrytis*



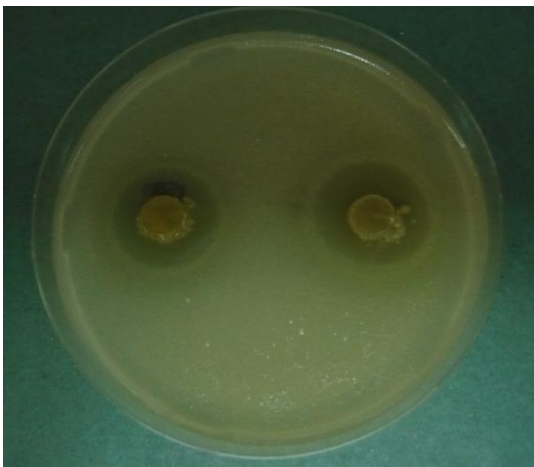
Fotografía 15. Reverso



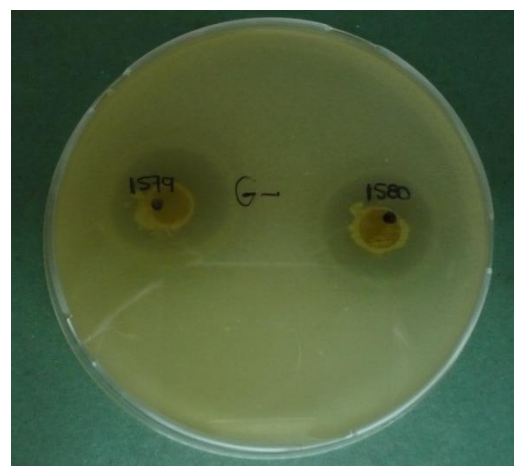
Fotografia 16. *Fusarium*



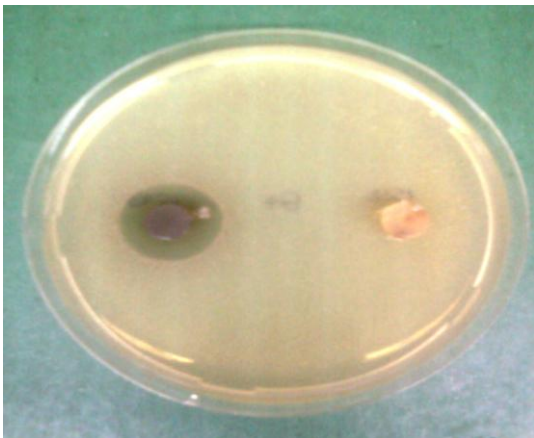
Fotografia 17. Reverso



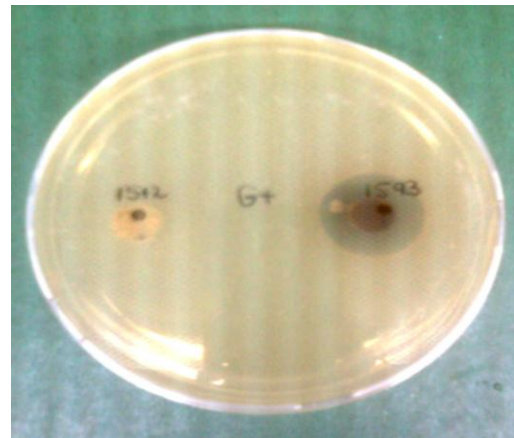
Fotografia 18. Gram -



Fotografia 19. Reverso



Fotografia 20. Gram +



Fotografia 21. Reverso

# **ANEXO F**

## **TABLA DE COLORES**

**(British Standard  
Specification for colours for  
identification, coding and  
special purposes)**

**Table 1. Standard colours**

| Ref. No. | Name                   | Surface finish of individual colour cards | Colorimetric values under CIE standard illumination D <sub>65</sub> |       |                           | Approximate Munsell reference | Page with colour sample |
|----------|------------------------|---|---|-------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|
|          |                        |   | Chromaticity coordinates  |       | Luminance factor, $\beta$ |                               |                         |
|          |                        |   | x   | y     |                           |                               |                         |
| 101      | Sky blue               | gloss                                     | 0.287   | 0.351 | 0.345                     | 5BG 6/4                       | 7                       |
| 103      | Peacock blue           | gloss                                     | 0.240   | 0.302 | 0.116                     | 5B 3/6                        | 7                       |
| 104      | Azure blue             | gloss                                     | 0.226   | 0.233 | 0.083                     | 5PB 3/6                       | 7                       |
|          |                        | matt                                      | 0.218   | 0.223 | 0.073                     | 5PB 3/6                       | —                       |
| 105      | Oxford blue            | gloss                                     | 0.248   | 0.245 | 0.049                     | 7.5PB 2/6                     | 7                       |
| 106      | Royal blue             | gloss                                     | 0.291   | 0.296 | 0.039                     | 10PB 1/1                      | 7                       |
| 107      | Strong blue            | gloss                                     | 0.209   | 0.240 | 0.148                     | 2.5PB 4/10                    | 17                      |
| 108      | Aircraft blue          | gloss                                     | 0.219   | 0.196 | 0.060                     | 7.5PB 2/10                    | 17                      |
|          |                        | matt                                      | 0.221   | 0.199 | 0.057                     | 7.5PB 2.5/8                   | —                       |
| 109      | Middle blue            | gloss                                     | 0.214   | 0.249 | 0.095                     | 10B 3/8                       | 7                       |
| 110      | Roundel blue           | gloss                                     | 0.232   | 0.214 | 0.064                     | 7.5PB 2/8                     | 7                       |
|          |                        | matt                                      | 0.230   | 0.212 | 0.059                     | 7.5PB 2.5/6                   | —                       |
| 112      | Arctic blue            | gloss                                     | 0.246   | 0.300 | 0.314                     | 7.5B 6/6                      | 7                       |
| 113      | Deep Saxe blue         | gloss                                     | 0.239   | 0.292 | 0.112                     | 7.5B 3/6                      | 7                       |
| 166      | French blue            | gloss                                     | 0.205   | 0.195 | 0.120                     | 7.5PB 3.5/12                  | 17                      |
|          |                        | matt                                      | 0.202   | 0.190 | 0.115                     | 7.5PB 3/12                    | —                       |
| 172      | Pale roundel blue      | matt                                      | 0.265   | 0.287 | 0.431                     | 2.5PB 7/4                     | 7                       |
| 175      | Light French blue      | gloss                                     | 0.215   | 0.227 | 0.191                     | 5PB 4.5/12                    | 17                      |
| 210      | Sky                    | gloss                                     | 0.331   | 0.366 | 0.426                     | 5GY 7/2                       | 9                       |
|          |                        | matt                                      | 0.331   | 0.368 | 0.437                     | 5GY 7/2                       | —                       |
| 216      | Eau-de-Nil             | gloss                                     | 0.335   | 0.405 | 0.444                     | 7.5GY 7/4                     | 9                       |
| 217      | Sea green              | gloss                                     | 0.343   | 0.441 | 0.326                     | 7.5GY 6/6                     | 9                       |
| 218      | Grass green            | gloss                                     | 0.328   | 0.459 | 0.177                     | 7.5GY 4.5/8                   | 17                      |
| 220      | Olive green            | gloss                                     | 0.338   | 0.406 | 0.085                     | 5GY 3/6                       | 9                       |
| 221      | Brilliant green        | gloss                                     | 0.309   | 0.457 | 0.136                     | 10GY 4/8                      | 17                      |
|          |                        | matt                                      | 0.307   | 0.457 | 0.133                     | 10GY 4/8                      | —                       |
| 223      | Middle bronze green    | gloss                                     | 0.334   | 0.383 | 0.078                     | 5GY 3/2                       | 9                       |
| 224      | Deep bronze green      | gloss                                     | 0.324   | 0.368 | 0.061                     | 2.5GY 2/4                     | 9                       |
|          |                        | matt                                      | 0.323   | 0.365 | 0.063                     | 2.5GY 2/2                     | —                       |
| 225      | Light Brunswick green  | gloss                                     | 0.314   | 0.441 | 0.105                     | 7.5GY 3.5/7                   | 9                       |
| 226      | Middle Brunswick green | gloss                                     | 0.292   | 0.389 | 0.073                     | 5G 2/6                        | 9                       |
| 227      | Deep Brunswick green   | gloss                                     | 0.294   | 0.364 | 0.060                     | 10GY 2/4                      | 9                       |
| 228      | Emerald green          | gloss                                     | 0.259   | 0.414 | 0.173                     | 7.5G 4/8                      | 17                      |
| 241      | Dark green             | gloss                                     | 0.330   | 0.361 | 0.090                     | 10Y 3/2                       | 9                       |
|          |                        | matt                                      | 0.331   | 0.360 | 0.086                     | 10Y 3/2                       | —                       |
| 262      | Bold green             | gloss                                     | 0.262   | 0.438 | 0.191                     | 2.5G 5/8                      | 17                      |
| 267      | Deep chrome green      | gloss                                     | 0.288   | 0.391 | 0.104                     | 2.5G 3/4                      | 9                       |
| 280      | Verdigris green        | gloss                                     | 0.283   | 0.403 | 0.251                     | 5G 5/6                        | 9                       |
| 283      | Aircraft grey green    | gloss                                     | 0.322   | 0.376 | 0.207                     | 7.5GY 5/2                     | 9                       |
|          |                        | matt                                      | 0.321   | 0.379 | 0.195                     | 7.5GY 5/2                     | —                       |
| 285      | NATO green             | matt                                      | 0.334   | 0.362 | 0.091                     | 10Y 3/1                       | 9                       |
| 298      | Olive drab             | gloss                                     | 0.341   | 0.375 | 0.078                     | 10Y 3/2                       | 9                       |
|          |                        | matt                                      | 0.339   | 0.375 | 0.075                     | 10Y 3/2                       | —                       |

Table 1. (continued)

| Ref. No. | Name                  | Surface finish of individual colour cards | Colorimetric values under CIE standard illumination D <sub>65</sub> |       |                           | Approximate Munsell reference | Page with colour sample |
|----------|-----------------------|---|---|-------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|
|          |                       |   | Chromaticity coordinates  |       | Luminance factor, $\beta$ |                               |                         |
|          |                       |   | x   | y     |                           |                               |                         |
| 309      | Canary yellow         | gloss                                     | 0.447   | 0.483 | 0.624                     | 5Y 9/14                       | 17                      |
|          |                       | matt                                      | 0.448   | 0.487 | 0.657                     | 5Y 9/14                       | —                       |
| 310      | Primrose              | gloss                                     | 0.403   | 0.448 | 0.664                     | 7.5Y 8.5/8                    | 11                      |
| 320      | Light brown           | gloss                                     | 0.429   | 0.398 | 0.179                     | 7.5YR 4.5/6                   | 11                      |
| 337      | Very dark drab        | gloss                                     | 0.336   | 0.357 | 0.081                     | 7.5Y 2/2                      | 11                      |
|          |                       | matt                                      | 0.338   | 0.358 | 0.079                     | 7.5Y 3/2                      | —                       |
| 352      | Pale cream            | gloss                                     | 0.380   | 0.401 | 0.626                     | 5Y 9/6                        | 11                      |
| 353      | Deep cream            | gloss                                     | 0.409   | 0.421 | 0.648                     | 2.5Y 8.5/8                    | 11                      |
| 355      | Lemon                 | gloss                                     | 0.471   | 0.471 | 0.532                     | 2.5Y 8/12                     | 17                      |
|          |                       | matt                                      | 0.467   | 0.468 | 0.553                     | 2.5Y 8/12                     | —                       |
| 356      | Golden yellow         | gloss                                     | 0.485   | 0.454 | 0.496                     | 10YR 7/14                     | 17                      |
|          |                       | matt                                      | 0.485   | 0.456 | 0.484                     | 10YR 7/12                     | —                       |
| 358      | Light buff            | gloss                                     | 0.415   | 0.407 | 0.470                     | 10YR 7/6                      | 11                      |
|          |                       | matt                                      | 0.416   | 0.406 | 0.459                     | 10YR 7/6                      | —                       |
| 361      | Light stone           | gloss                                     | 0.384   | 0.388 | 0.393                     | 10YR 7/4                      | 11                      |
|          |                       | matt                                      | 0.389   | 0.392 | 0.376                     | 10YR 7/4                      | —                       |
| 363      | Bold yellow           | gloss                                     | 0.471   | 0.475 | 0.615                     | 2.5Y 8/14                     | 17                      |
| 365      | Vellum                | gloss                                     | 0.344   | 0.369 | 0.627                     | 7.5Y 8.5/2                    | 11                      |
|          |                       | matt                                      | 0.345   | 0.371 | 0.606                     | 7.5Y 8.5/2                    | —                       |
| 367      | Manilla               | gloss                                     | 0.354   | 0.371 | 0.681                     | 2.5Y 8.5/2                    | 11                      |
| 368      | (See 568)             |   |   |       |                           |                               |                         |
| 369      | Biscuit               | gloss                                     | 0.373   | 0.380 | 0.651                     | 10YR 8/4                      | 11                      |
| 384      | Light straw           | gloss                                     | 0.360   | 0.381 | 0.569                     | 5Y 8/4                        | 11                      |
| 388      | Beige                 | gloss                                     | 0.370   | 0.382 | 0.495                     | 2.5Y 7/4                      | 11                      |
| 389      | Camouflage beige      | matt                                      | 0.343   | 0.364 | 0.315                     | 5Y 6/2                        | 11                      |
| 410      | (See 320)             |   |   |       |                           |                               |                         |
| 411      | Middle brown          | gloss                                     | 0.413   | 0.380 | 0.100                     | 7.5YR 3/6                     | 13                      |
| 412      | Dark brown            | gloss                                     | 0.382   | 0.351 | 0.068                     | 5YR 2/4                       | 13                      |
| 414      | Golden brown          | gloss                                     | 0.461   | 0.397 | 0.163                     | 5YR 4/8                       | 13                      |
| 436      | Dark camouflage brown | matt                                      | 0.345   | 0.346 | 0.074                     | 5YR 3/1                       | 13                      |
| 437      | (See 337)             |   |   |       |                           |                               |                         |
| 445      | Venetian red          | gloss                                     | 0.451   | 0.350 | 0.094                     | 10R 3/8                       | 13                      |
| 447      | Salmon pink           | gloss                                     | 0.400   | 0.361 | 0.421                     | 2.5YR 7/6                     | 13                      |
| 454      | Pale roundel red      | matt                                      | 0.378   | 0.327 | 0.360                     | 10RP 7/6                      | 13                      |
| 499      | Service brown         | gloss                                     | 0.360   | 0.357 | 0.074                     | 10YR 2.5/4                    | 11                      |
|          |                       | matt                                      | 0.365   | 0.360 | 0.069                     | 10YR 2.5/2                    | —                       |
| 537      | Signal red            | gloss                                     | 0.548   | 0.334 | 0.144                     | 7.5R 4.5/16                   | 17                      |
|          |                       | matt                                      | 0.555   | 0.331 | 0.149                     | 7.5R 4.5/14                   | —                       |
| 538      | Cherry                | gloss                                     | 0.529   | 0.322 | 0.104                     | 5R 3.5/16                     | 17                      |
|          |                       | matt                                      | 0.534   | 0.325 | 0.116                     | 5R 3.5/14                     | —                       |
| 539      | Currant red           | gloss                                     | 0.539   | 0.325 | 0.123                     | 7.5R 4/14                     | 17                      |
| 541      | Maroon                | gloss                                     | 0.353   | 0.325 | 0.046                     | 5R 2/8                        | 13                      |
| 542      | Ruby                  | gloss                                     | 0.403   | 0.274 | 0.087                     | 7.5RP 3/10                    | 13                      |

**Table 1. (concluded)**

| Ref. No. | Name                   | Surface finish of individual colour cards | Colorimetric values under CIE standard illumination D <sub>65</sub> |       |                           | Approximate Munsell reference | Page with colour sample |
|----------|------------------------|---|---|-------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|
|          |                        |   | Chromaticity coordinates  |       | Luminance factor, $\beta$ |                               |                         |
|          |                        |   | x   | y     |                           |                               |                         |
| 557      | Light orange           | gloss                                     | 0.517   | 0.393 | 0.274                     | 2.5YR 6/14                    | 17                      |
|          |                        | matt                                      | 0.517   | 0.392 | 0.284                     | 2.5YR 6/14                    | —                       |
| 564      | Bold red               | gloss                                     | 0.553   | 0.330 | 0.147                     | 8.75R 4/14                    | 17                      |
| 568      | Apricot                | gloss                                     | 0.502   | 0.421 | 0.334                     | 7.5YR 6/14                    | 17                      |
| 592      | International orange   | gloss                                     | 0.545   | 0.355 | 0.184                     | 10R 5/16                      | 17                      |
| 593      | Rail red               | gloss                                     | 0.561   | 0.345 | 0.181                     | 8.75R 5/17                    | 17                      |
| 626      | Camouflage grey        | matt                                      | 0.304   | 0.328 | 0.321                     | 10B 6/1                       | 15                      |
| 627      | Light aircraft grey    | gloss                                     | 0.317   | 0.338 | 0.435                     | N 7.25                        | 15                      |
|          |                        | matt                                      | 0.319   | 0.339 | 0.428                     | N 7                           | —                       |
| 630      | French grey            | gloss                                     | 0.323   | 0.356 | 0.327                     | 5GY 6/1                       | 15                      |
| 631      | Light grey             | gloss                                     | 0.308   | 0.341 | 0.310                     | 7.5G 6/1                      | 15                      |
|          |                        | matt                                      | 0.308   | 0.342 | 0.314                     | 7.5G 6/1                      | —                       |
| 632      | Dark Admiralty grey    | gloss                                     | 0.299   | 0.321 | 0.149                     | 10B 4/0.5                     | 15                      |
|          |                        | matt                                      | 0.300   | 0.322 | 0.146                     | 10B 4/0.5                     | —                       |
| 637      | Medium sea grey        | gloss                                     | 0.301   | 0.324 | 0.273                     | 10B 5.5/1                     | 15                      |
|          |                        | matt                                      | 0.303   | 0.326 | 0.270                     | 10B 6/1                       | —                       |
| 638      | Dark sea grey          | gloss                                     | 0.300   | 0.318 | 0.142                     | 5PB 4/1                       | 15                      |
|          |                        | matt                                      | 0.299   | 0.316 | 0.139                     | 2.5PB 4/2                     | —                       |
| 641      | (See 241)              |   |   |       |                           |                               |                         |
| 642      | Night                  | gloss                                     | 0.310   | 0.327 | 0.047                     | N 1                           | 15                      |
|          |                        | matt                                      | 0.310   | 0.326 | 0.039                     | N 1.75                        | —                       |
| 676      | Light weatherwork grey | gloss                                     | 0.300   | 0.325 | 0.382                     | 2.5PB 6.5/2                   | 15                      |
| 677      | Dark weatherwork grey  | gloss                                     | 0.296   | 0.315 | 0.146                     | 5PB 4/2                       | 15                      |
| 692      | Smoke grey             | gloss                                     | 0.272   | 0.303 | 0.237                     | 10B 5/4                       | 15                      |
| 693      | Aircraft grey          | gloss                                     | 0.307   | 0.334 | 0.234                     | 10BG 5/1                      | 15                      |
| 694      | Dove grey              | gloss                                     | 0.313   | 0.339 | 0.261                     | 5GY 5/1                       | 15                      |
| 697      | Light Admiralty grey   | gloss                                     | 0.297   | 0.334 | 0.479                     | 10BG 7.5/2                    | 15                      |
|          |                        | matt                                      | 0.298   | 0.336 | 0.490                     | 10BG 7.5/2                    | —                       |
| 796      | Dark violet            | gloss                                     | 0.304   | 0.244 | 0.092                     | 7.5P 3/7                      | 17                      |
| 797      | Light violet           | gloss                                     | 0.304   | 0.286 | 0.359                     | 5P 6.5/6                      | 13                      |



**Table 2. Obsolescent colours**

| Ref. No. | Name                | Surface finish of individual colour cards | Colorimetric values under CIE standard illumination D <sub>65</sub> |       |                           | Approximate Munsell reference |
|----------|---------------------|---|---|-------|---------------------------|-------------------------------|
|          |                     |   | Chromaticity coordinates  |       | Luminance factor, $\beta$ |                               |
|          |                     |   | x   | y     |                           |                               |
| 102      | Turquoise blue      | gloss                                     | 0.254   | 0.332 | 0.213                     | 7.5BG 5/5                     |
| 111      | Pale blue           | gloss                                     | 0.281   | 0.347 | 0.414                     | 5BG 7/4                       |
| 114      | Rail blue           | gloss                                     | 0.233   | 0.290 | 0.068                     | 2.5B 2/6                      |
| 115      | Cobalt blue         | gloss                                     | 0.236   | 0.250 | 0.221                     | 5PB 5/8                       |
| 174      | Oriental blue       | gloss                                     | 0.242   | 0.315 | 0.247                     | 2.5B 5.5/6                    |
| 222      | Light bronze green  | gloss                                     | 0.371   | 0.431 | 0.129                     | 2.5GY 4/6                     |
|          |                     | matt                                      | 0.368   | 0.429 | 0.130                     | 2.5GY 4/4                     |
| 275      | Opaline green       | gloss                                     | 0.305   | 0.386 | 0.383                     | 2.5G 7/6                      |
| 278      | Light olive green   | gloss                                     | 0.352   | 0.413 | 0.232                     | 5GY 5/4                       |
| 350      | Dark earth          | gloss                                     | 0.367   | 0.370 | 0.145                     | 10YR 4/2                      |
|          |                     | matt                                      | 0.374   | 0.374 | 0.141                     | 10YR 4/2                      |
| 359      | Middle buff         | gloss                                     | 0.435   | 0.413 | 0.349                     | 10YR 6/8                      |
| 360      | (See 460)           |   |   |       |                           |                               |
| 366      | Light beige         | gloss                                     | 0.371   | 0.385 | 0.593                     | 2.5Y 8/4                      |
| 446      | Red oxide           | gloss                                     | 0.428   | 0.348 | 0.081                     | 10R 2.5/7                     |
| 450      | (See 350)           |   |   |       |                           |                               |
| 453      | Shell pink          | gloss                                     | 0.335   | 0.332 | 0.594                     | 10RP 8/3                      |
| 460      | Deep buff           | gloss                                     | 0.420   | 0.394 | 0.270                     | 7.5YR 5.5/6                   |
| 473      | Gulf red            | gloss                                     | 0.429   | 0.335 | 0.073                     | 10R 2/6                       |
| 489      | Leaf brown          | gloss                                     | 0.421   | 0.367 | 0.120                     | 5YR 3/6                       |
| 540      | Crimson             | gloss                                     | 0.447   | 0.319 | 0.065                     | 5R 2/8                        |
| 633      | RAF blue grey       | gloss                                     | 0.291   | 0.315 | 0.073                     | 7.5B 2/2                      |
|          |                     | matt                                      | 0.289   | 0.315 | 0.067                     | 7.5B 2/2                      |
| 634      | Slate               | gloss                                     | 0.325   | 0.358 | 0.146                     | 5GY 4/1                       |
| 635      | Lead                | gloss                                     | 0.309   | 0.344 | 0.010                     | 5G 3/1                        |
| 636      | PRU blue            | gloss                                     | 0.274   | 0.307 | 0.155                     | 10B 4/3                       |
|          |                     | matt                                      | 0.273   | 0.308 | 0.151                     | 10B 4/3                       |
| 640      | Extra dark sea grey | gloss                                     | 0.296   | 0.317 | 0.112                     | 10B 3.5/1                     |
|          |                     | matt                                      | 0.296   | 0.315 | 0.108                     | 10B 3.5/1                     |
| 671      | Middle graphite     | gloss                                     | 0.303   | 0.323 | 0.092                     | 10B 3/1                       |



172 Pale roundel blue



112 Arctic blue



101 Sky blue



103 Peacock blue



104 Azure blue



109 Middle blue



113 Deep Saxe blue



110 Roundel blue



105 Oxford blue



106 Royal blue



216 Eau-de-Nil



210 Sky



217 Sea green



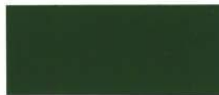
280 Verdigris green



283 Aircraft grey green



267 Deep chrome green



225 Light Brunswick green



285M NATO green



220 Olive green



241 (641) Dark green



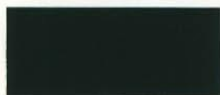
298 Olive drab



226 Middle Brunswick green



223 Middle bronze green



227 Deep Brunswick green



224 Deep bronze green



310 Primrose



367 Manila



365 Vellum



353 Deep cream



369 Biscuit



352 Pale cream



384 Light straw



389 Camouflage beige



388 Beige



358 Light buff



361 Light stone



320 (410) Light brown



337 (437) Very dark drab



499 Service brown



447 Salmon pink



797 Light violet



454 Pale roundel red



414 Golden brown



411 Middle brown



445 Venetian red



542 Ruby



436M Dark camouflage brown



412 Dark brown



541 Maroon



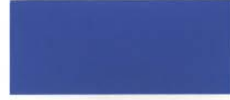
796 Dark violet



108 Aircraft blue



166 French blue



175 Light French blue



107 Strong blue



228 Emerald green



262 Bold green



221 Brilliant green



218 Grass green



309 Canary yellow



363 Bold yellow



355 Lemon



356 Golden yellow



568 (368) Apricot



557 Light orange



592 International orange



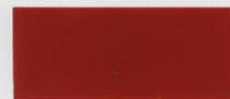
593 Rail red



537 Signal red



564 Bold red



539 Currant red



538 Cherry