



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



**Determinación de la diversidad de actinomicetes aislados de ecosistemas
glaciares de los Andes y la Antártida**

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo 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 y Biotecnología.

Autora: María Belén Chamorro Sevilla

Tutor: Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza Ph.D.

Ambato-Ecuador

Mayo 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza PhD.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 24 de abril de 2019



Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza Ph.D

C.I. 180216650-2

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, María Belén Chamorro Sevilla, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



María Belén Chamorro Sevilla

C.I. 1804664835

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Ing. Wilson Patricio Orozco Freire. MSc

C.I. 1721363008



Lic. Danae Fernández Rivero. MSc

C.I. 1757181209

Ambato, 09 de mayo del 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



María Belén Chamorro Sevilla

C.I. 1804664835

AUTORA

DEDICATORIA

Eso de triunfar ¿Cómo se logrará?

Desde niños nos dicen que en nuestro destino está,

Que los premios de la vida grandes son

sí a todas las cosas le ponemos mucho amor

Como un sueño efímero, que desaparece con parpadear

Como correr en una pista con los ojos vendados

Eso es triunfar, es sentir a tu alma vibrar,

una meta muy difícil de alcanzar,

que no sólo es anhelar y amar algo

Conlleva tener miedo y odiar

Y después de tantos errores y fracasos

Escuchar a tu corazón

y aferrarte a tu sempiterno deseo de felicidad

Porque el esfuerzo y la dedicación

Son los motores de la ciencia y el reflejo del conocimiento,

Pero la humildad, el respeto y la autenticidad

es la verdadera esencia del ser humano.

(Belén Chamorro)

Este trabajo de tesis está orgullosamente dirigido,

A mis amados padres Mami Tila y Papi Gualbo,

que sin descanso extendieron sus esfuerzos para verme superar,

a mis hermanas Luli y Pauly que son el reflejo vivo de empeño,

que no me dejaron ni un momento de acompañar.

Con todo mi amor, Belencita.

AGRADECIMIENTO

Alguna vez, alguien me dijo que la vida definida en una sola palabra sería: “GRATITUD”. Porque la gratitud es la versión perfecta y detallada de un sentimiento genuino de humildad. El agradecer por todas las cosas es un reconocimiento al mérito de ser honorable.

Agradezco en primer lugar al Padre, amigo y amor más grande, mi Jesucito del Gran Poder. Mi Salvador y mi Fé, mi esperanza, mi camino y mi futuro. Porque fue él quien me vio cuando nadie más lo hizo, me amó, cuando nadie me amó y me dio un nombre: *“La niña de sus ojos”*.

Agradezco a mis padres, por su constancia y apoyo incondicional en todo momento, sus consejos y regaños. A mis hermanas quienes son mi espejo y ejemplos para seguir. Agradezco también, a la UTA-FCIAL, mi segunda casa que me recibió como huésped, brindándome infraestructura, profesores y un ambiente de calidad.

Debo extender un agradecimiento especial a mi tutor Dr. Carlos Rodríguez por ser el mentor, instructor y sobre todo amigo, en esta etapa académica, por compartir sus conocimientos y experiencias personales como referencias de vida. A mis amigos tesisistas de la UODIDE, especialmente a mi Dieguito, por su apoyo y constancia, porque juntos, hemos construido grandes cosas. A Tefita, Dianita y Mercy, con quienes compartí un año y medio de experiencias agradables como equipo de trabajo y personas de calidad.

Adicionalmente, agradezco a Jonathan Heras, creador del software Gel J 2.02. Por su ayuda y colaboración, en el manejo del programa, ayudándome a obtener resultados más confiables.

En fin, todas y cada una de las personas que hicieron posible el llegar hasta aquí, aquellas que directa o indirectamente han formado parte esencial de mi vida personal y profesional.

Muchas Gracias.

ÍNDICE GENERAL

A. PÁGINAS PREELIMINARES

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii

B. CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.2 Generalidades de los actinomicetes	4
1.1.3 Ecosistemas glaciares y páramos	5
1.1.4 Función biológica.....	6
1.1.5 Aplicación industrial.....	8
1.1.6 Aislamiento de actinomicetes	9
1.1.7 Caracterización fenotípica de actinomicetes.....	10
1.1.8 Caracterización genotípica en actinomicetes	11
1.1.9 Patrones de Fingerprinting.....	12
1.1.10 Taxonomía microbiana	13
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo general.....	15
1.2.2 Objetivos específicos	15
CAPÍTULO II.....	16
METODOLOGÍA	16
2.1 Aislamiento selectivo de actinomicetes presentes en muestras glaciares	16
2.1.1 Caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo	16
2.1.2 Aislamiento y determinación de población microbiana.....	17
2.1.4 Determinación de población microbiana	18

2.1.5	Aislamiento selectivo, purificación y almacenamiento de los cultivos de actinomicetes.....	19
2.2	Caracterización molecular de actinomicetes aislados a partir de ecosistemas glaciares	19
2.2.2	Determinación de concentración, pureza e integridad de ADN genómico..	21
2.2.3	Dereplicación de cepas de actinomicetes mediante rep-PCR	22
2.3	Taxonomía numérica de datos genotípicos.....	23
2.4	Secuenciamiento del gen del ADNr 16S y análisis filogenético	23
2.6	Caracterización fenotípica de actinomicetes representativos	24
2.7	Taxonomía numérica de datos fenotípicos	28
2.8	Hipótesis	28
2.8.1	Hipótesis nula.....	28
2.8.2	Hipótesis alternativa.....	28
2.8.3	Señalamiento de las variables de las hipótesis.....	28
CAPÍTULO III.....		29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		29
3.1	Análisis de resultados	29
3.1.1	Caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo	29
3.1.2	Aislamiento y determinación de población microbiana.....	29
3.1.3	Aislamiento selectivo, purificación y almacenamiento de los cultivos	30
3.1.4	Caracterización molecular de actinomicetes.....	31
3.1.4.1	Dereplicación de cepas de actinomicetes mediante rep-PCR	32
3.1.5	Taxonomía numérica de datos genotípicos.....	32
3.1.6	Secuenciamiento del gen del ADNr 16S y análisis filogenético	35
3.1.7	Caracterización fenotípica de actinomicetes representativos	41
3.1.8	Taxonomía numérica de datos fenotípicos	45
3.1.9	Discusión general del trabajo.....	47
3.2	Verificación de Hipótesis.....	50
3.2.1	Hipótesis Nula (Ho)	50
3.2.2	Hipótesis Alternativa (Ha)	50
CAPÍTULO IV		51
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		51
4.1	Conclusiones	51
4.2	Recomendaciones	52
MATERIALES DE REFERENCIA		53

Referencias Bibliográficas	53
ANEXOS	65
Anexo A. Información del origen de las muestras de suelo.....	65
Anexo B. Medios de cultivo y soluciones.....	69
Anexo C. Aislamiento microbiano.....	72
Anexo D. Técnicas de biología molecular	76
Anexo E. Figuras.....	92
Anexo F. Taxonomía numérica.....	99
Anexo G. Tabla British Standard specification of colors for identification coding and special purposes	113
Anexo H. Fotografías	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de calidad de ADN genómico	21
Tabla 2. Condiciones para rep-PCR usando el primer Box	22
Tabla 3. Clasificación de los tipos de morfología de la cadena de esporas	25
Tabla 4. Clasificación de microorganismos de acuerdo con el rango de crecimiento en función a la temperatura.....	26
Tabla 5. Clasificación de microorganismos de acuerdo con el rango de crecimiento en función del pH.....	27
Tabla 6. Clasificación de microorganismos de acuerdo con el rango de crecimiento en función a la salinidad	27
Tabla 7. Grupos de color de actinomicetes aislados de la muestra MS-013 mediante DDC y método tradicional	31
Tabla 8. Grupos-especie obtenidos a partir del análisis de taxonomía numérica de datos genotípicos	34
Tabla 9. Cepas asociadas a especies cercanas basadas en su identificación molecular	37
Tabla 10. Grupos-especie obtenidos a partir de la identificación molecular de las cepas secuenciadas.....	41
Tabla 11. Caracterización fisiológica de la colección de las cepas de actinomicetes	42
Tabla 12. Grupos-especie de cepas de actinomicetes representantes, obtenidos a partir de la taxonomía numérica de datos fenotípicos	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por rep-PCR utilizando el primer Box A1R1.....	32
Figura 2. Dendrograma obtenido a partir de los patrones de fingerprinting por rep-PCR realizado a 146 cepas de actinomicetes, basado en el coeficiente de correlación de Pearson y en el algoritmo UPGMA.	33
Figura 3. Análisis filogenético de 14 cepas de actinomicetes aisladas de ecosistemas glaciares de la Antártida, Cotopaxi y Chimborazo, en base a la secuencia consenso del gen del ADNr 16S, calculado mediante Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987b). La topología fue evaluada usando el análisis de bootstrap y la escala indica el número de sustituciones por cada 100 nucleótidos.	36
Figura 4. Identificación molecular de cepas de actinomicetes, basada en el 80% de similitud entre los patrones de fingerprinting para la formación de grupos fenéticos.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 5. Dendrograma fenotípico de 67 cepas de actinomicetes, obtenido a partir del análisis de taxonómica numérica de datos fenotípicos con un corte al 89% de similitud utilizando el coeficiente de simple similaridad (S_{SM}) y el algoritmo UPGMA.	46

RESUMEN

Se identificaron molecularmente 152 cepas de actinomicetes aisladas de ecosistemas fríos de la Antártida, Cotopaxi y Chimborazo. A través de la amplificación de los patrones de fingerprinting por rep-PCR, utilizando el primer BOX A1R1, se logró construir el dendrograma genotípico generado mediante el coeficiente de Pearson y el algoritmo UPGMA, obteniendo 23 grupos-especie.

El análisis filogenético del gen del ADNr 16S fue construido mediante el cálculo de las distancias evolutivas de Jukes & Cantor y el algoritmo de Neighbour – Joining. Se logró identificar 4 especies diferentes, que pertenecieron al género *Streptomyces*, mientras que la cepa DE-067 estuvo asociada al género *Nocardia*. Por otra parte, mediante la caracterización fenotípica se determinó que la mayoría de las cepas de este estudio resultaron ser mesófilas, halófilas débiles y neutrotolerantes. Además, poseen una gran capacidad de metabolizar aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno. Con los resultados obtenidos, se construyó el dendrograma fenotípico mediante el coeficiente S_{SM} y el algoritmo UPGMA, determinando 23 grupos-especie a un 89% de similitud.

Posteriormente, se realizó la identificación molecular de la colección mediante el gen del ADNr 16S, con las cepas que compartían patrones de fingerprinting similares a las especies identificadas. Logrando posicionar taxonómicamente a 87 cepas, en 14 grupos-especie al 80% de similitud. Como es evidente, se necesita complementar los resultados obtenidos en este estudio, mediante la identificación molecular de las cepas que no se secuenciaron, para conocer con certeza la diversidad de actinomicetes en la colección.

Palabras Clave: Actinomicetes, caracterización fenotípica, caracterización genotípica, 16S, árbol filogenético, taxonomía polifásica.

ABSTRACT

Were identified 152 strains of actinomycetes molecularly isolated from cold ecosystems of Antarctica, Cotopaxi and Chimborazo. Through the amplification of the fingerprinting patterns by rep-PCR, using the first BOX A1R1, I was able to construct the genotypic dendrogram generated by the Pearson coefficient and the UPGMA algorithm, obtaining 23 species-groups.

The phylogenetic analysis of the 16S rDNA gene was constructed by calculating the evolutionary distances of Jukes & Cantor and the Neighbor - Joining algorithm. It was possible to identify 4 different species, which belonged to the genus *Streptomyces*, while the strain DE-067 was associated to the genus *Nocardia*. On the other hand, by phenotypic characterization it was determined that most of the strains of this study were mesophilic, weak halophilic and neutrotolerant. In addition, they have a great ability to metabolize amino acids as a source of carbon and nitrogen. With the obtained results, the phenotypic dendrogram was constructed by the SSM coefficient and the UPGMA algorithm, determining 23 species-groups at 89% similarity.

Subsequently, the molecular identification of the collection was carried out using the 16S rDNA gene, with the strains that shared fingerprinting patterns like the identified species. Achieving taxonomically position 87 strains, in 14 groups-species at 80% similarity. As it is evident, it is necessary to complement the results obtained in this study, by means of the molecular identification of the strains that were not sequenced, to know with certainty the diversity of actinomycetes in the collection.

Keywords: Actinomycetes, phenotypic characterization, genotypic characterization, 16S, phylogenetic tree, polyphasic taxonomy.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Generalidades

Los microorganismos son la forma de vida predominante en el planeta tanto en número como en biomasa total, exhiben una diversidad evolutiva, funcional y metabólica que supera a todos los demás organismos vivos (**Timmis et al., 2017**). Filogenéticamente existen los dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* (**Barton & Northrup, 2011**), determinados mediante el empleo de la secuencia del gen del ARNr de la subunidad pequeña del ribosoma y varias características fenotípicas distintivas. Los dominios *Archaea* y *Bacteria* están compuestos por organismos procariotes y *Eukarya* por eucariotes (**Midigan, Martinko, & Parker, 2004**).

La clasificación microbiana evidencia que el dominio *Archaea* difiere de los otros dominios en sus secuencias de ARNr 16S, ya que en su estructura secundaria presenta entre 8 a 12 subunidades, así como en la estructura de la pared celular que está compuesta por glicoproteínas, proteínas y pseudomureína. En cuanto a los microorganismos que pertenecen al dominio *Bacteria* poseen un ARNr 16S con una estructura secundaria de 4 subunidades y una morfología en su pared celular más delgada, compuesta por lipopolisacáridos y mureína. Los individuos que se han clasificado dentro de estos dos dominios poseen un solo cromosoma circular que no se encuentra encerrado dentro de un núcleo. Finalmente, en el dominio *Eukarya* el ARNr de la subunidad pequeña tiene un tamaño mayor (ARNr 18S) (**Barton & Northrup, 2011**). Los microorganismos pertenecientes a este dominio pueden o no poseer pared celular (**Cooper, 2000; Lodish, 2000**) con el material genético lineal dentro del núcleo (**Barton & Northrup, 2011**).

El dominio *Bacteria* comprende al menos 30 *phylum* (**Hogg, 2013**) que se caracterizan por el tamaño muy pequeño de sus células que presentan en promedio 1 μm de diámetro, la simplicidad de su estructura que no contienen mitocondrias ni cloroplastos y su material genético que no está contenido dentro de una membrana nuclear (**Hopwood & Chater, 1989**). Su diversidad está relacionada a su capacidad de

adaptarse a una extraordinaria variedad de hábitats, los que incluyen suelos, lagos, océanos y dentro de otros organismos vivos (**Srivastava, 2015**).

Un grupo especial de bacterias grampositivas son los actinomicetes. En 1943 Waksman y Henrici clasificaron a los actinomicetes por su capacidad de formar células ramificadas y definieron 5 grupos principales representados en los géneros *Actinomyces*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Streptomyces* (**Hopwood & Chater, 2007**). Pertenecen al orden *Actinomycetales* (**Barka et al., 2016; Bhatti, Haq, & Bhat, 2017; Hopwood & Chater, 2007**). Poseen verdaderas hifas aéreas con un tamaño entre 0,5 a 1,5 μm de diámetro. Están ampliamente distribuidos en la biósfera, siendo microorganismos ubicuos que forman poblaciones estables y persistentes en diversos ecosistemas (**Bhatti et al., 2017**). Se reproducen por fisión o por medio de esporas. La mayoría presentan un metabolismo heterótrofo (**Bhatti et al., 2017**), aunque es posible encontrar algunos actinomicetes autótrofos (**Bell, Falconer, Colby, & Williams, 1987; Bhatti et al., 2017**).

La amplia diversidad de los actinomicetes se puede evidenciar al establecer las diferentes condiciones que permiten que éstos crezcan y se desarrollen. Pueden existir en condiciones aeróbicas y anaeróbicas a temperaturas que van desde los 5°C a 7°C y hasta los 45°C a 70°C (**Bhatti et al., 2017**). Crecen en suelos ácidos en un rango de pH óptimo de 6,5 a 8,0 y en suelos alcalinos de pH 10 a 12. Viven también en suelos salinos de 5% a 10% de NaCl, principalmente en pantanos (**Akond, Jahan, Sultana, & Rahman, 2016; Bhatti et al., 2017**).

Los actinomicetes han desarrollado la capacidad de soportar temperaturas muy bajas para su supervivencia, mediante la síntesis de proteínas conocidas como proteínas de choque frío (csps), las cuales participan en la regulación de la expresión de genes que codifican proteínas de respuesta al estrés de baja temperatura. Estas proteínas se encuentran en especies de actinomicetes psicrófilos, mesófilos e incluso termófilos (**Ermolenko & Makhatadze, 2002; Phadtare, Tadigotla, Shin, Sengupta, & Severinov, 2006**). Además, las proteínas csps crean una mayor flexibilidad en porciones seleccionadas de su estructura proteica global, a través de un mayor número de residuos de glicina (Gli) y un número reducido de residuos de prolina (Pro) y

arginina (Arg). Por ejemplo, en los actinomicetes psicrófilos la adaptación al frío se lleva a cabo gracias a las proteínas asociadas a ácidos nucleicos (Singh, 2012).

La gran diversidad de microorganismos disponibles en todos los hábitats terrestres, son una valiosa fuente de moléculas con un alto potencial biotecnológico y cuyo enfoque actualmente es determinar microorganismos benéficos que viven en ambientes extremos como desiertos y glaciares (Perfumo, Banat, & Marchant, 2018).

Los glaciares representan reservorios a largo plazo de una gran diversidad microbiana con un potencial metabólico inesperado (Balcazar et al., 2015). Se han reportado cepas aisladas de actinomicetes en ecosistemas glaciares de la Antártida, especialmente en las islas Dee y Greenwich (Díaz & Estrada, 2018; Navas, 2016; Villacís, 2015). Los cuales pertenecen principalmente al género *Streptomyces*, en especies como *S. fildesensis*, *S. flavogriseus*, *S. griseus*, *S. olivochromogenes* y *S. sannanensis* (Navas, 2016). Por otro lado, también se han reportado cepas de actinomicetes aisladas de suelos de los volcanes Cotopaxi y Chimborazo, correspondientes a los páramos andinos (Díaz & Estrada, 2018; Villacís, 2015).

Los páramos andinos y las zonas altas montañosas también exhiben una gran diversidad microbiana por la gama de microclimas y zonas de vida (Cuesta, Sevink, Llambí, De Bièvre, & Posner, 2014). Por lo que las investigaciones actuales buscan aislar microorganismos correspondientes a especies de bacterias y actinomicetes con funciones biológicas (Prabakar, Dube, Reddy, & Shivaji, 2004). Debido a que, estos microorganismos se emplean cada vez más para aumentar la sostenibilidad del planeta en todas las áreas agrícola, alimentaria, ambiental e industrial (Timmis et al., 2017).

De esta manera la biotecnología ha enfocado el uso de microorganismos en procesos de elaboración o modificación de biocompuestos (Bhargava & Srivastava, 2012). Por ejemplo medicamentos, hormonas sintéticas, productos alimenticios (Lewis, 2007) y probióticos (Bhargava & Srivastava, 2012).

1.1.2 Generalidades de los actinomicetes

Los actinomicetes son bacterias grampositivas filamentosas y esporuladas, que exhiben una amplia gama de formas morfológicas (Akond et al., 2016). Poseen un patrón de ramificación y formación de esporas a partir de un micelio aéreo ramificado, el que a su vez proviene del micelio del sustrato (Chaudhary et al., 2013). Producen un olor similar al de la tierra húmeda debido a la geosmina (Minotto, Pasqualini, Trindade, & Van Der Sand, 2014).

De los principales grupos de actinomicetes que comprenden los géneros *Actinomyces*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Streptomyces*. Los grupos *Actinomyces* y *Nocardia* corresponden a células aerobias y anaerobias respectivamente. Mientras que los grupos *Streptomyces* y *Micromonospora* están constituidos por células que forman una estera densa de hifas ramificadas interconectadas que dan lugar a esporas (Hopwood & Chater, 2007). Finalmente, el grupo *Mycobacterium* comprende células con filamentos ramificados divididas en células individuales (Hopwood & Chater, 2007).

De acuerdo con la utilización del oxígeno, pueden ser actinomicetes anaerobios, aeróbicos o facultativos. Los actinomicetes aeróbicos se clasifican principalmente en función de la morfología y de la composición química de la pared celular (Schleifer & Kandler, 1972). Dependiendo la composición y estructura del peptidoglicano se distinguen cuatro principales tipos de pared celular. Pueden ser del tipo I según la posición del isómero del ácido diaminopimélico, del tipo II según el contenido de azúcar del peptidoglicano, del tipo III por la presencia de glicina en los puentes del péptido y del tipo IV por la presencia del ácido meso-diaminopimélico (Schleifer & Kandler, 1972; Sharma, Dangi, & Choudhary, 2014). Por otro lado, los grupos de actinomicetes pueden presentar similitudes en su pared celular. Por ejemplo, la pared de *Promicromonospora* tiene el mismo tipo de composición de pared celular de *Actinomyces israelii*. Así mismo, cepas de *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium tuberculosis* tienen el mismo tipo de peptidoglicano en sus paredes celulares (Schleifer & Kandler, 1972).

Del total de la población de microorganismos que habitan diferentes ecosistemas, los actinomicetes están presentes en un 20% a 60%, en casi todos los ambientes terrestres,

marinos y sedimentos (**Williams et al., 1993**). Así como también, en aguas dulces y saladas, rizósfera, los nódulos de las raíces, en los tejidos internos de las plantas, en la materia orgánica en descomposición, heces de animales, productos alimenticios (**Minotto et al., 2014**), en el compost y hasta en aguas residuales (**Akond et al., 2016**). Los actinomicetes también están presentes en ambientes generalmente fríos, a 5 °C o menos, existen bajo condiciones estresantes como aguas termales, salmueras casi saturadas, aguas ácidas, en el hielo antártico y a kilómetros debajo de la superficie de la tierra (**Srivastava, 2015**).

Su capacidad de adaptación ha permitido el desarrollo de las funciones metabólicas vitales. Poseen estrategias que alteran la composición de los ácidos grasos de su membrana celular cuando crecen en temperaturas bajas (**Beales, 2004**).

1.1.3 Ecosistemas glaciares y páramos

Los científicos han enfocado su atención hacia la búsqueda de nuevos microorganismos en las regiones glaciares y los páramos debido a su alto potencial biológico (**Nopnakorn, 2011**).

La Antártida alberga una gran biodiversidad de microorganismos, incluidas las algas, bacterias, hongos y virus, que constituyen la mayor parte de la biomasa en los ecosistemas terrestres y de agua dulce del continente (**Hughes, Cowan, & Wilmotte, 2015**).

El continente Antártico posee una superficie total de 14 millones de Km² aproximadamente y más del 98% está cubierto por una gruesa capa de hielo de un espesor promedio de 1,6 Km (**Antony et al., 2016**). El continente experimenta condiciones ambientales y climáticas severas, tales como baja humedad atmosférica, poca disponibilidad de agua líquida, temperaturas extremadamente bajas, largos periodos de radiación solar y una absoluta oscuridad (**Miller & Whyte, 2011**).

A pesar de las condiciones extremas del continente, el aislamiento de microorganismos como los actinomicetes ha sido posible. Se han aislado cepas de actinomicetes de suelos (**Encheva et al., 2014; Ganzert, Bajerski, Mangelsdorf, Lipski, & Wagner, 2011; Moncheva et al., 2000**), sedimentos marinos (**Deng et al., 2015**), arena (**De la**

Torre, Goebel, Friedmann, & Pace, 2003) y agua de mar (**Gupta, Reddy, Delille, & Shivaji, 2004**).

En la Antártida, se han reportado aislamientos de grupos de actinomicetes en zonas principalmente archipiélagos e islas, en lugares como Greenwich y Dee (**Garzón, 2013; Villacís, 2015**). En la isla Livingston, se ha encontrado cepas del género *Streptomyces* con actividades antibacterianas (**Encheva et al., 2013**). También se han reportado cepas aisladas de muestras de roca y arena correspondientes al género *Micromonospora* (**Hirsch, Mevs, Kroppenstedt, Schumann, & Stackebrandt, 2004**).

Del mismo modo, se han registrado poblaciones de actinomicetes en zonas de alta montaña en Yunnan, China, ubicada a 3000 metros sobre el nivel del mar (msnm), correspondientes a los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Nocardia*. Así como también, en montañas nevadas de 3900 a 4500 msnm, se han reportado aislamientos de actinomicetes de los géneros *Micromonospora*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces* (**Xu, Li, & Jiang, 1996**). Además, en la región del Monte Everest, en Kalapatthar, se han aislado muestras de estos microorganismos, con actividad antibacteriana (**Gurung, Sherpa, Agrawal, & Lekhak, 2010**).

Por otro lado, en zonas como los páramos andinos y nevados también se han reportado una gran biodiversidad en especies de microflora y microfauna del suelo de comunidades bacterianas, micoplasmas y levaduras (**Hofstede, Segarra, Mena, & Mena Vásconez, 2003**). Por ejemplo, se han aislado cepas de actinomicetes en suelos de los volcanes Cotopaxi y Chimborazo (**Díaz & Estrada, 2018; Garzón, 2013**).

1.1.4 Función biológica

Los actinomicetes juegan un papel importante en la biodegradación del suelo y la formación de humus, mediante el reciclaje de los nutrientes asociados con polímeros recalcitrantes, tales como quitina, queratina y lignocelulosas (**Sharma et al., 2014**). También son los encargados del mecanismo de producción de ácidos orgánicos, participando en el metabolismo y la fisiología de los microorganismos que regulan el la solubilización de fosfato mineral en el suelo (**Bhatti et al., 2017**).

En la fijación del nitrógeno, los actinomicetes forman asociaciones con algunas plantas (**Bhatti et al., 2017; Gauthier, Diem, & Dommergues, 1981**), mediante un proceso de infección. Una vez dentro del cabello de la raíz, el actinomicete ramificado crece a través de las paredes de la célula cortical externa, estimula la hipertrofia y la división celular de la corteza del huésped, formando un sitio de invasión o pre-nódulo (**Torrey, 1978**), en donde ayuda a que las plantas fijen el nitrógeno que está disponible (**Gauthier et al., 1981**)

Además, los actinomicetes son capaces de descomponer mediante enzimas hidrolíticas, la celulosa resistente y la lignina que se encuentra en la madera, papel y en la quitina de los exoesqueletos de insectos (**Bhatti et al., 2017; Singh & Nain, 2014**). Participan en la descomposición de los residuos orgánicos del suelo, produciendo un pigmento negro marrón que contribuye a la oscuridad de color del humus (**Bhatti et al., 2017**).

Los actinomicetes son uno de los grupos más importantes en la producción de sideróforos (**Lee, Soon, Keast, & Carson, 2012**). Éstos, son compuestos quelantes, solubles en agua y de bajo peso molecular, que facilitan el transporte de hierro II a los microorganismos. El proceso se lleva a cabo cuando este compuesto entra en contacto con el hierro III de la membrana celular de los actinomicetes. Una vez dentro del organismo reduce el hierro III a hierro II, que es utilizado para sus actividades biológicas (**Bhatti et al., 2017; Lee et al., 2012**). Se ha reportado que *Streptomyces* produce los sideróforos coelichelin (**Lautru, Deeth, Bailey, & Challis, 2005**) y griseobactina (**Patzer & Braun, 2010**). Mientras que la heterobactina es un tipo de sideróforo producido por miembros de los géneros *Nocardia* (**Mukai, Komaki, Takagi, & Shin-ya, 2009**) y *Rhodococcus* (**Carrano, Jordan, Drechsel, Schmid, & Winkelmann, 2001**).

Los actinomicetes son considerados bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, debido a que mejoran la disponibilidad de nutrientes y minerales e inhiben el ataque de microorganismos fitopatógenos (**Bhatti et al., 2017; El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006; Jogaiah et al., 2016; Soltanzadeh, Soltani Nejad, & Shahidi Bonjar, 2016**). Se ha reportado que el género *Streptomyces* promueve el crecimiento de varias plantas, tales como arroz (**Gopalakrishnan et al., 2014**), tomate

(El-Tarabily, 2008), trigo (Sadeghi et al., 2012) y fréjol (Nassar, El-Tarabily, & Sivasithamparam, 2003). Por otro lado, se ha reportado que *Streptomyces griseoviridis* estimula la intensidad de la formación de micorrizas y da lugar a un mejor crecimiento de la planta, además de tener capacidades antagónicas a una variedad de patógenos (Bhatti et al., 2017).

1.1.5 Aplicación industrial

El interés de los actinomicetes se enfoca principalmente en su importancia biotecnológica por la producción de una amplia gama de metabolitos secundarios, principalmente antibióticos. Por ejemplo, la eritromicina, estreptomicina, gentamicina y rifampicina han sido usados para el desarrollo de fármacos (Bhatti et al., 2017; Watve, Tickoo, Jog, & Bhole, 2001). Otros biocompuestos producidos por actinomicetes corresponden a aquellos con propiedades antihelmínticas, anticancerosas e inmunosupresoras (Bhatti et al., 2017; Borodina, Krabben, & Nielsen, 2005). Los actinomicetes también son capaces de actuar como biofertilizantes combatiendo patógenos de plantas y brindándoles resistencia (Bhatti et al., 2017). Se ha reportado que los actinomicetes tienen la capacidad de participar en la degradación de los compuestos presentes en los plaguicidas como los organoclorados, s-triazinas, triazinonas, carbamatos y diuron, reduciéndolos a formas más simples y con menos toxicidad para los cultivos (Golinska et al., 2015).

Aproximadamente el 60% de los nuevos insecticidas y herbicidas biológicos reportados en los últimos años provienen de *Streptomyces* (Sharma et al., 2014). Por ejemplo, el biofungicida mycostop contiene *Streptomyces griseoviridis* como principio activo, para el control biológico de microorganismos fitopatógenos presentes en el suelo (Bhatti et al., 2017). Así mismo, los metabolitos fúngicos como polioxina B y D provienen de *Streptomyces cacaoivar* (Sharma et al., 2014).

Los actinomicetes también son los encargados del cuidado de cultivos como el algodón, caña de azúcar, cítricos y piña, produciendo ácido indol acético (IAA) (Golinska et al., 2015). El ácido IAA es un regulador del crecimiento de las plantas que facilita el desarrollo, estimula el crecimiento del sistema radicular y alargamiento de las raíces (Bhatti et al., 2017). Se han reportado la síntesis inducida de IAA por especies diferentes de *Streptomyces exfolitus* y *Streptomyces violaceus* (Sharma et

al., 2014). Así como los géneros *Frankia sp* (Flores, Rincón, & Martín, 2003), *Nocardia* (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006; Flores et al., 2003) y *Kitasatospora* (Shrivastava, D'Souza, & Desai, 2008) son considerados productores potenciales de IAA (Bhatti et al., 2017).

Del total de metabolitos microbianos alrededor de 10000 (45%), es producido por actinomicetes, de los cuales 7600 (76%) provienen del género *Streptomyces* y 2500 (25%) provienen de los géneros *Actinomadura*, *Micromonospora* y *Streptoverticillium* (Lee et al., 2014). Estos microorganismos son una demostración de que son fuentes eficaces para la producción de compuestos bioactivos (Dhananjeya, Selvan, & Dhanapal, 2010).

En el campo de la salud humana, un grupo de actinomicetes principalmente *Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces karnatakensis* y varias especies de *Nocardia*, tienen habilidades para producir la enzima L-asparaginasa microbiana, que es usada generalmente como un agente terapéutico en el tratamiento de cáncer, principalmente en la leucemia linfoblástica aguda (Sharma et al., 2014).

Adicionalmente, los actinomicetes producen metabolitos bioactivos de interés farmacéutico, tales como antibacterianos, antimicóticos y antiparasitarios, además de enzimas que degradan compuestos orgánicos complejos (Akond et al., 2016). Por ejemplo, amilasas (*Thermomonospora curvata*), celulasas (*Thermonospora*), isomerasas (*Actinoplanes missouriensis*), ligninasas (*Nocardia autotrophica*), proteasas (*Nocardia*), quitinasa (*Streptomyces viridificans*) y xilanasas (*Microbispora*) (Sharma et al., 2014). Así como también, estos microorganismos están presentes en la producción de la kasugamicina, que es un metabolito proveniente de *Streptomyces kasugaensis*, la cual actúa como un inhibidor de la biosíntesis de proteínas en microorganismos (Sharma et al., 2014).

1.1.6 Aislamiento de actinomicetes

Existen varias técnicas de aislamiento de actinomicetes basadas en los métodos convencionales de cultivo en placas de dilución seriadas (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006). Sin embargo, las técnicas convencionales generalmente

utilizan medios no selectivos o poco selectivos, de manera que los actinomicetes pueden ser inhibidos por organismos que compiten entre sí o por microorganismos de crecimiento más rápido (**Athalye, Lacey, & Goodfellow, 1981**).

Es así que, se han desarrollado varias técnicas tales como la radiación de microondas (**Bulina, Alferova, & Terekhova, 1997**), pulsos eléctricos (**Bulina, Terekhova, & Tyurin, 1998**), la centrifugación diferencial (**Hayakawa, Otaguro, Takeuchi, Yamazaki, & Iimura, 2000**), la radiación de alta frecuencia (**Li, Terekhova, & Gapochka, 2002**) y el análisis de sucesión (**Li, Terekhova, Alferova, Galatenko, & Gapochka, 2003**), además de la utilización de un medio de cultivo de vitamina de carbón (**You & Park, 1996**) que tienen como fin incrementar la recuperación de géneros de actinomicetes a partir de placas de aislamiento (**El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006**).

La centrifugación diferencial de dispersión (DDC) fue descrita por primera vez por D. W. Hopkins, Macnaughton, & O'Donnell en (1991), tiene como finalidad, homogenizar los agregados del suelo y disociar los microorganismos de las partículas de éste. Permite aislar poblaciones microbianas a partir de muestras de suelo que se ponen en contacto con agentes quelatos, búfers, diluyentes y ultra sonido, separando la biomasa del residuo (**Hawksworth, 1995**). Se han reportado aislamientos por DDC de cepas bacterianas (**Hopkins et al., 1991**) y actinomicetes quitinolíticos de un suelo ácido de Brasil (**Gomes, Linhares, Alviano, & Linhares, 1999**).

1.1.7 Caracterización fenotípica de actinomicetes

Los fenotipos son características observables de las células que permite diferenciarlas unas de otras (**Bochner, 2009**). El rasgo fenotípico proporciona información acerca de la capacidad del microorganismo de colonizar nichos ecológicos y de sus características fisiológicas. Las cuales, incluyen el uso de diferentes fuentes de carbono y aceptores de electrones (**Brbić et al., 2016**), la resistencia a factores de estrés tales como fuentes de nitrógeno, salinidad, pH y temperatura (**Bochner, 2009**) y las interacciones moleculares con las células huésped (**Brbić et al., 2016**).

Los datos fenotípicos incluyen las características macroscópicas que proporcionan información acerca de la morfología tales como color, dimensión, forma y bordes.

Mientras que, la caracterización microscópica permite identificar la forma celular, las morfologías asociadas con las características ambientales y las interacciones entre los microorganismos y las superficies minerales (**Larry; Barton & Northup, 2011**) que pueden ser asociaciones patógenas o simbióticas (**Brbić et al., 2016**).

De esta manera, el conjunto de todos los análisis fenotípicos son la base para la identificación preliminar de grupos y taxones, además está relacionada con los análisis filogenéticos, lo que permite la creación de taxones con bases más sólidas (**Hirsch et al., 2004**).

1.1.8 Caracterización genotípica en actinomicetes

Los métodos genotípicos han evolucionado en el desarrollo de nuevas tecnologías, más rápidas y precisas. Un ejemplo, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada en 1983 por Kary Mullis. Permite la amplificación de una región específica de ADN utilizando partidores o secuencias que delimitan la zona de amplificación (**Farfán, 2015**). Esta técnica puede aumentar la cantidad de muestra inicial, obteniendo un conjunto de fragmentos de ADN para su identificación individual (**Arora & Kanta, 2006; Lorne, 1993**).

La enzima termoestable *Taq* polimerasa, aislada de *Thermus aquaticus* (**Chien, Edgar, & Trela, 1976; Saiki et al., 1988**), es la enzima que lleva a cabo la PCR y permite obtener una polimerización más eficiente, debido a que actúa mejor y la temperatura de desnaturalización no disminuye su actividad enzimática, logrando amplificar el ADN de una manera más rápida (**Gupta, 2017**).

Esta técnica se fundamenta en una reacción básica cuyo material de partida es la secuencia molde, nombrado así al gen o segmento de ADN, el cual puede amplificarse un millón de veces (**Sanders, 2007**). Las cadenas complementarias de una molécula bicatenaria de ADN se separan o desnaturalizan por calentamiento a una temperatura de 90 °C a 98 °C. Posteriormente, uno o dos primers de ADN sintético con una secuencia específica en cada extremo, se unen a su secuencia complementaria y se enfrían a una temperatura de 40 a 60 °C. De esta manera, las polimerasas comienzan en cada primer y copian la secuencia original, produciendo réplicas exactas de la secuencia molde (**Gupta, 2017; Sanders, 2007**). En ciclos posteriores, las moléculas

bicatenarias del ADN original y las copias están separadas. De manera que los primers pueden unirse nuevamente a secuencias complementarias para que la polimerasa los replique (Sanders, 2007).

1.1.9 Patrones de Fingerprinting

La distribución de los amplicones de ADN genómico, que resultan del proceso del PCR, genera un patrón de huella dactilar único para cada cepa o aislamiento bacteriano conocido como fingerprinting (Godsell, 1963).

Las técnicas como ERIC y rep-PCR, son métodos de tipificación molecular de bacterias confiables, rápidos y altamente discriminativos, así como reproducibles, siendo la técnica de rep-PCR la herramienta molecular más rápida y económica para construir una base de datos genotípica de cepas microbianas (Belkum & Hermans, 2001).

En taxonomía bacteriana se usan las secuencias repetitivas enterobacterianas BOX y ERIC (Valencia & Gómez, 2012), las secuencias palindrómicas extragenómicas repetitivas (REP), los fragmentos de restricción con endonucleasas (RFLP) (Popping, Diaz, & Hoenick, 2010) y la secuenciación del gen del ADNr 16S, usado para la identificación y el análisis comparativo de especies y poblaciones bacterianas (Ishii & Sadowsky, 2009a; Kumar, Kumar, & Pratush, 2014).

El método de tipificación molecular basado en rep-PCR fue utilizado por primera vez por Versalovic. Se emplea ampliamente para distinguir especies, cepas, serotipos, entre otros. Esta técnica utiliza tres primers específicos, denominados BOX, ERIC y REP, que se han diseñado para coincidir con las secuencias conservadas distribuidas en diversos genomas bacterianos. Estos primers amplifican las regiones genómicas ubicadas entre secuencias repetitivas, y han demostrado ser útiles en el estudio de la diversidad microbiana (Rampadarath, Puchooa, & Bal, 2015). Los primers REP-PCR tienen una secuencia de consenso de 38 pb, ERIC-PCR tiene una secuencia de 126 pb y BOX-PCR posee tres subunidades, BOX-A, BOX-B y BOX-C con longitudes de 50 nucleótidos respectivamente (Das, Dash, Mangwani, Chakraborty, & Kumari, 2014).

El primer BOX-PCR genera patrones de banda más íntegros y reproducibles, manteniendo una alta correlación entre las huellas dactilares y los datos de homología ADN-ADN. Se han reportado investigaciones utilizando primers BOX-PCR en la identificación de especies de *Streptomyces cinereorectus*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces tricolor*, *Streptomyces colombiensis*, *Streptomyces filamentosus*, *Streptomyces vinaceus* y *Streptomyces phaeopurpureus* (Lanoot et al., 2004).

La caracterización genotípica de microorganismos proporciona información que se utiliza para ampliar bancos de genes, en investigaciones de identidad de clones, patentes de plantas, procesos médicos y pruebas de paternidad (Sanders, 2007).

1.1.10 Taxonomía microbiana

La taxonomía comprende la clasificación, identificación y nomenclatura de organismos a partir de morfologías similares, rasgos fisiológicos. Así como también, rasgos genéticos para clasificarlos en grupos o taxones específicos (Bisen, 2014). Además, puede predecir las propiedades más probables entre los miembros, que incluyen a los géneros, individuos, poblaciones, secuencias moleculares y tipos de especies (Rohlf, 2013).

La taxonomía numérica o taxonomía clásica se define como el uso de métodos estadísticos y matemáticos, que requiere una información basada en las características macroscópicas y microscópicas. Así como también, de habilidades fisiológicas para convertirlas en datos numéricos (Rohlf, 2013). Tiene como objetivo, clasificar nuevos aislamientos, crear nuevos taxones, identificar especies conocidas y la nomenclatura de las mismas (Rohlf, 2013; Thompson et al., 2013).

El término taxonomía polifásica propuesto por Colwell en 1970, sirve para definir completamente la biosistemática moderna que comprende la filogenia y genética de poblaciones (Gillis, Vandamme, Vos, Swings, & Kersters, 2015). En donde, se incluyen aspectos fisiológicos, propiedades fisicoquímicas del ADN y el perfil de fragmentos moleculares principalmente AFLP, BOX, ERIC y REP, además de la secuenciación de patrones de fingerprinting que permiten obtener un alto grado de conservación de los genes ribosómicos (Barton & Northrup, 2011). Estas técnicas moleculares complementan el conjunto de herramientas necesarias para asociar las

características fenotípicas con la composición genética de los microorganismos (**Brbić et al., 2016**) y así desarrollar una taxonomía polifásica en bases sólidas (**Jones, 2012; Thompson et al., 2013**),

Con la taxonomía polifásica ha sido posible crear árboles filogenéticos, los cuales establecen las relaciones entre los niveles de individuos, especies, géneros y familias (**Goodfellow et al., 1991**). Por ejemplo, con el estudio fenotípico y genético, se analizaron las similitudes filogenéticas que mantienen los individuos del mismo género, como *Streptomyces thermodiastaticus*, *Streptomyces thermoviolaceus* y *Streptomyces thermovulgaris* (**Kim, 1999**). Así como también en especies como *Micromonospora coerulea* y *Micromonospora chersina*, (**Hirsch et al., 2004**). También se han reportado aislamientos de muestras de suelo y hojarasca de árboles, correspondientes a las familias *Micromonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* y *Streptomycetaceae*, determinados mediante taxonomía polifásica (**Van Hop et al., 2011**).

Los patrones filogenéticos indican si está presente o no, un gen homólogo y analiza cuales genes están funcionalmente relacionados entre sí (**Kensche, van Noort, Dutilh, & Huynen, 2008**). Su objetivo es determinar el nivel taxonómico y genético al que los grupos microbianos comparten rasgos de respuesta frente a nutrientes o cambios ambientales. Con las características fenotípicas y genotípicas se proporciona una información filogenética de los rasgos microbianos y sus limitaciones evolutivas (**Martiny, Jones, Lennon, & Martiny, 2015**).

De manera que, esta investigación tiene como fin realizar una caracterización polifásica de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares, representados por zonas altas montañosas de los páramos andinos (**Díaz & Estrada, 2018; Garzón, 2013**) y regiones antárticas (**Villacís, 2015**), muchos de los cuales han demostrado que poseen vías metabólicas para producir biocompuestos activos en contra de patógenos, que pueden encontrarse en plantas o alimentos de consumo humano. El identificar estas cepas de actinomicetes hasta el nivel de especie, permitirá que se puedan realizar experimentos dirigidos hacia la determinación de utilidad real en biotecnología, aportando sustancialmente hacia el posible desarrollo de productos que puedan llegar a ser usados por la industria biotecnológica. Además, se contribuirá con la

conservación del patrimonio genético del país al establecer el número de especies que crecen y se desarrollan en estos ambientes extremos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Determinar la diversidad de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de los Andes y la Antártida.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípica y genotípicamente actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y de los volcanes Cotopaxi y Chimborazo.
- Establecer mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos y moleculares la diversidad de grupos de actinomicetes.
- Identificar actinomicetes representantes de grupos hasta nivel de especie.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Aislamiento selectivo de actinomicetes presentes en muestras glaciares

Se trabajó con una muestra compuesta (MS-013) preparada a partir de suelos recolectados en la isla Greenwich, archipiélago de las Shetland del Sur, durante el verano antártico en el año 2010. Los detalles del origen de la muestra se encuentran reportados en la Tabla A1 (Anexo A)

2.1.1 Caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo

2.1.1.1 Determinación del pH y conductividad

A 20 gramos de la muestra de suelo se agregaron 20 mL de agua destilada hasta formar una solución homogénea. La suspensión de suelo se dejó reposar durante 10 minutos seguido de agitación por 1 minuto. Este proceso se repitió cada 10 minutos durante una hora. Esta suspensión se dejó en reposo por 20 minutos. A continuación, se colocaron 20 mL de una solución de CaCl_2 0,01M, con el fin de disminuir la concentración de electrolitos y mantener estable la fuerza iónica del suelo, evitando la fluctuación del valor del pH. Luego de 20 minutos de reposo, se procedió a medir los valores de conductividad y pH por triplicado, reportándose el promedio de las lecturas.

2.1.1.2 Determinación del porcentaje de humedad

En una cápsula vacía pesada previamente se colocaron 5 gramos de suelo (peso 1). La muestra fue colocada en una estufa a 105°C por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a pesar la cápsula con la muestra seca. El peso 2 se obtuvo al restar el peso de la cápsula vacía. El porcentaje de humedad fue determinado mediante la fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{\text{peso 1} - \text{peso 2}}{\text{peso 1}} \right) * 100$$

2.1.1.3 Determinación del porcentaje de materia orgánica

La muestra de suelo seco obtenida luego de la determinación de humedad fue colocada y pesada en un crisol. El peso 1 fue calculado al restar el peso del crisol vacío del peso del suelo seco. El crisol con la muestra de suelo se llevó a una mufla a 400°C por 3 horas. Terminado este tiempo, se pesó nuevamente registrándose el peso final, luego de restar el peso del crisol (peso 2). Obtenidos estos datos, el porcentaje de materia orgánica se determinó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Materia orgánica} = \frac{\text{peso 1} - \text{peso 2}}{\text{peso 1}} * 100$$

2.1.2 Aislamiento y determinación de población microbiana

2.1.2.1 Aislamiento por centrifugación diferencial de dispersión (DDC)

En un tubo de centrifugación estéril de 50 mL se colocaron 5 gramos de suelo de la muestra MS-013, de 15 a 20 perlas de vidrio estériles (3 mm), 10 mL de SDS 0,1% (p/v) y 10 mL de cloruro de benzetonio 0,03% (p/v). Esta mezcla se agitó por 30 minutos y se centrifugó a 500 gravedades por 1 minuto, después se transfirió el sobrenadante a un frasco estéril (sobrenadante S₁). Al sedimento resultante, se añadieron 10 mL de Tris búfer 0,05M (pH 5,5, 4°C, Tabla B1, Anexo B) y se agitó por 30 minutos a 500 gravedades. Seguidamente, se centrifugó por 1 minuto y se obtuvo el sobrenadante S₂, el que fue colocado en un nuevo frasco estéril.

El sedimento restante se trató con 10 mL de SDS 0,1% (p/v) y la mezcla se sometió a un proceso de ultrasonicación por 1 minuto, con el fin de homogenizar la muestra, eliminando las burbujas de aire y separando la materia orgánica de los minerales. A continuación, se añadieron nuevamente 10 mL de SDS 0,1% (p/v), se agitó por 30 minutos y se centrifugó a 500 gravedades. El sobrenadante resultante fue transferido a un nuevo frasco estéril (sobrenadante S₃). Al residuo se agregaron 10 mL de Tris búfer 0,05M, éste se agitó por 30 minutos y el sobrenadante fue transferido a un nuevo frasco estéril (sobrenadante S₄). Finalmente, se agregaron 30 mL de agua de llave estéril (4°C), al tubo final con el residuo y se agitó por 30 minutos. La suspensión obtenida se rotuló como residuo final (R). Los sobrenadantes S₂ y S₄ fueron mezclados en una sola muestra al haber sido tratados con el mismo búfer (sobrenadante S_{2.4}).

A partir de las fracciones S₁, S₂₋₄ y S₃ se realizaron las diluciones de 1/10 y 1/10², mientras que al residuo final se realizaron diluciones de 1/10² y 1/10³. Se inocularon 100 µL de las diluciones antes mencionadas en cajas Petri que contenían medios de cultivo preparados mediante un sistema de búfers (Tabla B2, Anexo B), ajustando el pH a 5,5. Los medios utilizados fueron agar aminoácidos (CRA, Tabla B3, Anexo B) y agar almidón caseína (AAC, Tabla B4, Anexo B), en éste último medio de cultivo se ajustó a dos pHs de 5,5 y 6,5. Se colocó nistatín (75 µg/mL) en los medios de cultivo, como antibiótico. Las cajas se incubaron a 20°C por 15 días.

2.1.3 Aislamiento tradicional

En una botella microbiológica de 100 mL se preparó la dilución 1/10, para lo cual se pesaron 10 g de suelo de la muestra MS-013 con 90 mL de agua de llave estéril. La suspensión resultante se agitó por 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron las diluciones 1/10² y 1/10³ y se inocularon 100 µL de éstas en cajas Petri, que contenían los medios de cultivos AAC y CRA preparados de la manera ya descrita en el párrafo anterior. Las cajas fueron incubadas a 20°C por 15 días.

2.1.4 Determinación de población microbiana

Terminado el periodo de incubación, se procedió a contar las colonias de actinomicetes presentes en los medios de cultivo AAC y CRA, usando el equipo Colony Counter CC-1 (Boeunter, Germany). El número de unidades formadoras de colonias (u.f.c) por gramo de suelo seco, fue calculado para las diluciones que tenían entre 30 a 300 colonias y se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$ufc/g \text{ de suelo} = \frac{N * FD * Vt}{Vi * S}$$

En donde:

- N Número de colonias
- FD Dilución
- Vt Volumen de la dilución 1/10
- Vi Volumen inoculado
- S Cantidad de suelo seco

2.1.5 Aislamiento selectivo, purificación y almacenamiento de los cultivos de actinomicetes

Del número total de colonias de actinomicetes obtenidas en la determinación de población microbiana, se escogieron representantes para repicarlos en cultivo puro. El método que se utilizó fue estría compuesta y los medios de cultivo fueron, agar glucosa, extracto de malta y levadura (GYM, Tabla B5, Anexo B) y agar avena (AV, Tabla B6, Anexo B). Las cajas se incubaron por 15 días a 20°C.

Una vez desarrollados los microorganismos, se comprobó que sean cultivos puros. Después se formaron grupos de color de acuerdo con las características del micelio de sustrato, micelio aéreo y pigmento difusible en base a la Tabla British Standard specification of colors for identification coding and special purposes (Anexo G). Se utilizó el micelio y esporas de los actinomicetes crecidos en agar GYM y en agar AV para preparar un stock en crioviales de 1,5 mL con glicerol al 20% (p/v) a una temperatura de -10°C, para su almacenamiento a largo plazo.

2.2 Caracterización molecular de actinomicetes aislados a partir de ecosistemas glaciares

Ciento cincuenta y dos actinomicetes fueron caracterizados molecularmente. De éstos, sesenta provinieron del estudio realizado por **Villacís (2015)**, setenta y nueve de la investigación realizada por **Díaz & Estrada (2018)** y trece del presente estudio. De las colecciones de cultivos de actinomicetes de **Villacís (2015)** y de **Díaz & Estrada (2018)**, se recibieron tubos con ADN genómico diluido en búfer TE 1X (Tabla B7, Anexo B) y extraído previamente con la metodología reportada por **Navas (2016)**, utilizando los métodos de fenol cloroformo y kit comercial (PureLink Genomic DNA Mini Kit #K1820-02, Invitrogen). Todas las muestras estuvieron almacenadas a -10°C. De los cultivos de actinomicetes aislados de la muestra MS-013, se extrajo ADN genómico mediante el método de fenol cloroformo. Los detalles relacionados a la codificación, origen y características del aislamiento de las muestras se encuentran reportados en la Tabla A2 (Anexo A).

2.2.1 Extracción de ADN genómico de actinomicetes por el método de fenol cloroformo

Los actinomicetes obtenidos del aislamiento selectivo de la muestra MS-013 fueron activados al inocular 50 μ L de la suspensión de micelio y esporas de los stocks almacenados a largo plazo, sobre la superficie de cajas Petri que contenían agar GYM y agar AV, para finalmente realizar estrías compuestas a partir del inóculo. Las cajas se incubaron por 15 días a 20°C. De los cultivos crecidos en GYM se procedió a realizar la metodología de extracción de ADN genómico, mientras que el micelio y esporas de los cultivos crecidos en agar AV fueron usados para preparar una suspensión en glicerol (20%, p/v), como un segundo stock de almacenamiento a largo plazo.

Para el aislamiento de ADN genómico, los actinomicetes fueron crecidos sobre membranas de nitrato de celulosa estériles (0,45 μ m de diámetro de poro, Millipore), colocadas sobre la superficie de agar no esporulante (ANE, Tabla B8, Anexo B), a partir del micelio y esporas de los cultivos repicados en agar GYM. Se usó esta metodología para obtener solamente biomasa y evitar la presencia de esporas y medio de cultivo. Las cajas fueron incubadas por 4 días a 20°C, para permitir el crecimiento máximo de los microorganismos y así obtener una cantidad abundante de biomasa. Pasado este tiempo, con la ayuda de un palillo estéril se recogió toda la biomasa de la membrana de nitrato de celulosa y se colocó en un tubo de centrifugación de 1,5 mL que contenía 450 μ L de búfer de extracción (Tabla B9, Anexo B) y 0,05 g de microesferas de vidrio estériles (106 μ m de diámetro, lavadas en HCl). Esta mezcla se vortizó por 1 minuto y se llevó al congelador por 24 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se colocaron en un vórtex por 10 minutos a velocidad máxima con el fin de lisar las células y posteriormente se centrifugó por 20 minutos a 15000 rpm. Del sobrenadante obtenido se transfirieron 200 μ L a un nuevo tubo de centrifugación de 1,5 mL y se añadieron 200 μ L de fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1, v/v). La mezcla se agitó lentamente hasta formar una solución blanquecina homogénea que fue centrifugada por 15 minutos a 15000 rpm. A continuación, 150 μ L del sobrenadante fueron transferidos a un nuevo tubo de centrifugación de 1,5 mL, al que se añadieron 300 μ L de etanol absoluto (4°C)

para precipitar el ADN. Esta solución se centrifugó por 20 minutos a 15000 rpm y se desechó todo el sobrenadante evitando perder el precipitado. Posteriormente, se realizaron 2 lavados consecutivos con etanol al 70% (4°C) con un intervalo de centrifugación de 20 minutos a 15000 rpm. Finalmente, los tubos se colocaron boca abajo y se dejaron secar de 3 a 4 horas para que el etanol se evapore. Terminado este tiempo, se resuspendió el ADN en 40 µL de búfer TE 1X.

2.2.2 Determinación de concentración, pureza e integridad de ADN genómico

La cantidad y calidad del ADN genómico de las 152 muestras de actinomicetes fue evaluada utilizando el espectrofotómetro UV-Vis (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific). Previamente, se limpiaron las superficies ópticas del equipo, para luego calibrar con un blanco de agua ultra pura y de búfer TE 1X. A continuación, se colocó 1,5 µL de ADN de las muestras en el sistema óptico y la concentración fue medida por triplicado, reportándose el promedio de las lecturas. La pureza se determinó mediante los parámetros de calidad que brinda el equipo de la relación 260/280 como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de calidad de ADN genómico

Radio	Valor	Pureza
260/280	1,8-2	Óptima
	1,6-1,8	Aceptable
	< 1,6	Compuestos aromáticos
	> 2,1	ARN

(Desjardins & Conklin, 2010)

Para la determinación de la integridad de ADN genómico, se preparó un gel de agarosa al 1% (p/v) en búfer TBE 0,5X (Tabla B10, Anexo B). Luego de diluir la agarosa mediante calor, se añadió 1 µL de SYBRSafe™ (Invitrogen) por cada 10 mL de agarosa. El gel fue colocado en la cámara de electroforesis, cubierto con búfer TBE 0,5X. Para cargar las muestras se utilizaron 0,5 µL del loading BlueJuice™ (10X, Invitrogen) y 4 µL de ADN genómico. Este volumen total fue colocado en el pozuelo. El marcador de peso molecular de 1 Kb (TrackIt DNA, Invitrogen) se colocó en una cantidad de 4 µL. La corrida electroforética se llevó a cabo durante 35 minutos a 100 voltios. Las imágenes fueron visualizadas en el transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDoc TMMP Imaging System-BioRad). El ADN con alta integridad se observó

como una sola banda compacta, mientras que el ADN fragmentado como un barrido en el gel, como se muestra en la Figura E1 (Anexo E).

Después estudiar todas las muestras de ADN, se determinó que 21 no cumplieron con los parámetros aceptables de calidad, por lo que se procedió a extraer nuevamente el ADN genómico de cada una, mediante la metodología de fenol cloroformo antes mencionada. Una vez realizada la extracción, se comprobó que los parámetros de calidad sean adecuados, para posteriormente utilizarlas en las pruebas pertinentes.

2.2.3 Dereplicación de cepas de actinomicetes mediante rep-PCR

Ciento cincuenta y dos muestras de ADN genómico fueron utilizadas para la obtención de patrones de fingerprinting mediante la técnica rep-PCR. La concentración de ADN genómico usada en las reacciones de PCR fue de 50 ng/μL.

La técnica de rep-PCR inició con la preparación de la mezcla de Máster Mix. Para ello, se colocaron 20 μL de Super Mix Platinum™ Multiplex (Invitrogen) y 1 μL del primer Box A₁R₁ (5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC³), por cada una de las muestras a analizar. A continuación, en tubos de PCR de 200 μL, se colocaron 21 μL de la mezcla y 1 μL de ADN genómico, además de una gota de aceite mineral para evitar la evaporación de la mezcla. Finalmente, las muestras fueron colocadas en el termociclador (Multigene Labnet) con las condiciones descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones para rep-PCR usando el primer Box

Proceso		Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Activación de <i>Taq</i>		94	2'	1
Desnaturalización		94	45''	
Amplificación	Alineamiento	52	1' 15''	35
	Elongación	70	8'	
Extensión Final		72	10'	1
Refrigeración		4		∞

(Baquero, 2018)

Después del proceso de PCR, se determinó el patrón de bandas (fingerprinting), mediante un gel de agarosa al 1,285% (p/v), el que fue teñido con SYBR Safe™ (Invitrogen). Para la electroforesis se utilizaron 18 μL de la reacción PCR y en los extremos y medio del gel de agarosa fueron colocados 4 μL del marcador molecular

de 100 bp (TrackIT Invitrogen). La corrida electroforética se llevó a cabo durante 4 horas a 75 voltios y el gel se visualizó en el transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDoc TMMP Imaging System-BioRad). Las imágenes se almacenaron en formato TIFF para su análisis posterior.

De las 152 muestras amplificadas, 6 muestras presentaron un número de bandas amplificadas menor a 3, por lo que fueron descartadas del análisis de taxonomía numérica final. El estudio continuó con 146 muestras de actinomicetes.

2.3 Taxonomía numérica de datos genotípicos

El dendrograma del análisis de taxonomía numérica de patrones de fingerprinting de 146 muestras fue construido usando el programa GEL J (versión 6.06 de Java 64 MB) (Heras et al., 2015). Se utilizaron las imágenes obtenidas con el primer BOX A1R1, en formato TIFF, las cuales tenían igual tamaño y resolución. En el programa se realizaron los ajustes de imagen para mejorar el contraste de las fotografías y poder visualizar cada una de las bandas obtenidas. Después de analizar todos los geles correspondientes a las muestras de actinomicetes en estudio, se elaboró el dendrograma usando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), basado en la similaridad calculada por el coeficiente de correlación de Pearson. Posteriormente, en base a las agrupaciones más coherentes, se seleccionaron representantes de los grupos-especie, para el secuenciamiento del gen del ADNr 16S y para caracterización fenotípica.

2.4 Secuenciamiento del gen del ADNr 16S y análisis filogenético

Veinte y tres cepas representativas de los grupos-especie identificados en el dendrograma de la taxonomía numérica de datos genotípicos, fueron activadas nuevamente en medio de cultivo GYM a partir de los stocks de glicerol almacenados a largo plazo. Se inocularon 50 µL y se realizaron estrías compuestas. Posteriormente, fueron repicadas en ANE, utilizando la metodología antes mencionada con el fin de realizar una nueva extracción de ADN genómico mediante el método de fenol cloroformo descrito anteriormente. Cabe mencionar que se realizó un cambio en el paso final de resuspensión, en donde se utilizó agua ultra pura en lugar de búfer TE 1X, debido a los requerimientos exigidos por la empresa MacroGen Inc. USA. Seguido esto, se comprobó la calidad, pureza e integridad de los ADNs. En donde se encontró,

que 4 muestras no presentaron los parámetros de calidad adecuados, por lo que fueron descartadas del análisis final.

Para cada uno de los 19 ADNs obtenidos, se preparó una muestra de 30 μL a una concentración 40 ng/ μL en tubos de centrifugación de 1,5 mL. Estas muestras fueron enviadas a la empresa MacroGen Inc. USA para secuenciarlas, utilizando los primers externos 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT^{3'}) y el 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCA^{3'}) para la amplificación del gen, y los primers internos 518F (5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG^{3'}) y 800R (5' TACCAGGGTATCTAATCC^{3'}) para el secuenciamiento.

Las secuencias obtenidas del gen del ADNr 16S se recibieron en cromatogramas y formato ABI. Las cuales fueron ensambladas mediante el programa PHYDIT (**Chun, 1995**) para obtener secuencias casi completas del gen codificante del ADNr 16S, en promedio de 1400 nucleótidos (nt). En los casos en que sólo funcionó un primer o se obtuvieron secuencias cortas de cada primer, o secuencias parciales entre 750 a 1300 nt, se alinearon manualmente usando la opción “pairwise alignment”. El análisis filogenético fue realizado al comparar las secuencias obtenidas en el presente estudio con aquellas que se identificaron como las más cercanas, usando el programa BLAST-N disponible en el GenBank del National Center For Biotechnology Information (NCBI) (**Benson et al., 2012**). El árbol filogenético fue construido mediante el algoritmo Neighbour – Joining (**Saitou & Nei, 1987**) y las distancias evolutivas se calcularon mediante **Jukes & Cantor (1969)**.

2.5 Identificación molecular de la colección mediante el gen del ADNr 16S

Una vez realizado el análisis filogenético, se seleccionaron en el dendrograma de datos genotípicos aquellos individuos que compartían patrones de fingerprinting similares. Posteriormente, se realizó un segundo análisis genotípico con el fin de obtener una mejor representación de la diversidad existente entre las cepas en estudio.

2.6 Caracterización fenotípica de actinomicetes representativos

De las 146 cepas con las que se trabajó inicialmente, se seleccionaron 67 de los grupos definidos en la taxonomía numérica de datos genotípicos. Los cultivos fueron activados al inocular 50 μL de las suspensiones de micelio y esporas de los crioviales

almacenados a largo plazo, en cajas Petri que contenían medio de cultivo GYM. Las cajas se incubaron por 15 días a 20°C. Después de este tiempo, se comprobó que los cultivos crecidos cumplan con las características de cultivo puro. A partir del crecimiento obtenido se realizaron suspensiones de esporas en agua de llave estéril, para usarlas como inóculo en las diferentes pruebas fenotípicas. Para ello, una suspensión de micelio y esporas fue preparada en 750 µL de agua de llave estéril, la que fue filtrada con la ayuda de un pequeño algodón colocado en la parte externa de una punta de 1000 µL y transferida en un nuevo tubo. Las suspensiones de esporas se almacenaron a 4°C.

2.6.1 Caracterización macroscópica y microscópica

Se formaron grupos de acuerdo con el color del micelio de sustrato y micelio aéreo, utilizando la Tabla British Standard specification of colors for identification coding and special purposes (Anexo G).

Para determinar la morfología de la cadena de esporas en los cultivos de actinomicetes que presentaron micelio aéreo, se colocó un cubreobjetos estéril sobre el cultivo con la ayuda de una pinza, en cajas Petri que contenían medio de cultivo GYM. Las cajas fueron incubadas por 15 días a 20°C. Luego, el cubreobjetos con el micelio adherido se colocó en un portaobjetos y se observó la morfología de la cadena de esporas en el microscopio con el lente de inmersión de 100X. El tipo de morfología fue registrado de acuerdo con la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de los tipos de morfología de la cadena de esporas

Símbolo	Tipo	Descripción
S	Espiral	Cadenas de esporas formando espirales abiertas o cerradas en el micelio aéreo.
R	Rectas	Cadenas de esporas rectas, cortas o largas.
RA	Incompletas	Cadenas de esporas en forma de ganchos, espirales incompletas u onduladas.
E	Esporangios	Estructuras en forma de saco o bolsa que contiene en su interior esporas.
M	Espiral	Esporas individuales que aparecen en las hifas del micelio aéreo.
F	Flexous	Cadena de espóra en forma sinuosa, no espiral.

(Curipallo & Rodriguez, 2011)

2.6.2 Caracterización fisiológica de actinomicetes

Para cada prueba fisiológica se inocularon 5 μ L de las suspensiones de esporas en cajas Petri con medio de cultivo GYM y se incubaron por 8 días a 20°C.

2.6.3 Determinación del rango de crecimiento en función de la temperatura

Las cepas de actinomicetes fueron evaluadas de acuerdo al rango de crecimiento a temperaturas de 4°C, 20°C, 26°C, 37°C y 50°C. Posteriormente, las cepas que presentaron crecimiento se asignaron con 1, mientras que las que no crecieron se asignaron con 0. Se determinó la clasificación de acuerdo con la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de microorganismos de acuerdo con el rango de crecimiento en función a la temperatura

Clasificación	4°C	20°C	26°C	37°C	50°C
Termófilo	-	-	-	+	+
Mesófilo extremo	+	+	+	+	-
Mesófilo	-	+	+	+	-
Psicrótrofo	+	+	+	-	-
Psicrófilo	+	+	-	-	-

(Garzón, 2013)

2.6.4 Determinación del rango de crecimiento en función del pH

El pH del medio de cultivo fue modificado mediante un sistema de búfers (Tabla B2, Anexo B), ajustando a 4,5, 5,5, 6,5 7,5 y 8,5. A continuación, las cepas de actinomicetes se evaluaron mediante código binario, de modo que, las que presentaron crecimiento se asignaron con 1, mientras que, aquellas que no crecieron se asignaron con 0. Luego, la clasificación de las cepas en función del pH se determinó de acuerdo con la Tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de microorganismos de acuerdo con el rango de crecimiento en función del pH

Clasificación	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5
Acidófilo	+	+	-	-	-
Neutrotolerante	+	+	+	-	-
Neutrotolerante	+	+	+	+	-
Neutrófilo	-	+	+	+	-
Neutrófilo	-	-	+	+	-
Neutrófilo	-	-	+	-	-
Alcalitolerante	-	+	+	+	+
Alcalitolerante	-	-	+	+	+
Alcalófilo	-	-	-	+	+

(Garzón, 2013)

2.6.5 Determinación del rango de crecimiento en función de la salinidad

El medio de cultivo GYM se suplementó con 1%, 5%, 10% y 15% de NaCl (p/v). A continuación, las cepas de actinomicetes se evaluaron mediante código binario, de modo que, las que presentaron crecimiento se asignaron con 1, mientras que, aquellas que no crecieron se asignaron con 0. La clasificación de los actinomicetes se determinó de acuerdo con la Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de microorganismos de acuerdo con el rango de crecimiento en función a la salinidad

Clasificación	1%	5%	10%	15%
Halófilo débil	+	-	-	-
Halófilo	+	+	-	-
Halófilo extremo	-	+	+	+
Halófilo extremo	+	+	+	+
No tolerante	-	-	-	-

(Garzón, 2013)

2.6.6 Determinación de la utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno

Se preparó medio de cultivo basal (Tabla 11, Anexo B) que contenía 0,1% (p/v) de los aminoácidos ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, histidina, leucina, lisina, tirosina, treonina y valina. Posteriormente, las cepas de actinomicetes se evaluaron mediante código binario, de modo que, las que

presentaron crecimiento se asignaron con 1, mientras que, aquellas que no crecieron se asignaron con 0.

2.6.7 Determinación de la utilización de aminoácidos como única fuente de nitrógeno

Se preparó medio de cultivo basal (Tabla B12, Anexo B) que contenía una solución base de nitrógeno, levadura y cas-aminoácidos, como fuente única de nitrógeno y 0,1% (p/v) de los aminoácidos ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, histidina, leucina, lisina, tirosina, treonina y valina. Finalmente, las cepas de actinomicetes se evaluaron mediante código binario, de modo que, las que presentaron crecimiento se asignaron con 1, mientras que, aquellas que no crecieron se asignaron con 0.

2.7 Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica de las 67 cepas de actinomicetes fueron utilizados para construir una matriz de código binario. La cual fue usada para obtener el dendrograma fenotípico mediante el programa estadístico NTSys (Rohlf, 1988). El dendrograma fue generado mediante el algoritmo UPGMA y el coeficiente de simple similitud (S_{SM}). Los grupos-especie fueron determinados a un corte de similitud al 89%.

2.8 Hipótesis

2.8.1 Hipótesis nula

No existe diversidad genética y fenotípica entre las cepas de actinomicetes estudiados

2.8.2 Hipótesis alternativa

Existe diversidad genética y fenotípica entre las cepas de actinomicetes estudiados.

2.8.3 Señalamiento de las variables de las hipótesis

- Aislamiento selectivo de actinomicetes
- Extracción del ADN genómico de actinomicetes
- Caracterización molecular de ADN genómico
- Secuenciamiento del gen ADNr 16S para la identificación hasta el nivel de especie

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis de resultados

3.1.1 Caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo

La caracterización fisicoquímica realizada a la muestra compuesta MS-013, mostró un porcentaje de humedad de 0,88%. Se ha encontrado investigaciones, en donde los suelos recolectados en este sector presentan una humedad por debajo del 10% (**Bialkowska et al., 2012**) y en algunos casos es 2,60% a 5,41% (**Chong, Convey, Pearce, & Tan, 2012**). Teniendo su influencia en la química, distribución y abundancia de los organismos (**Jordanova, 2017**). Por otro lado, la materia orgánica presentó un porcentaje del 5,85%, indicativo de que la descomposición orgánica es lenta como consecuencia de las características medioambientales de temperatura y humedad (**Jordanova, 2017**).

Se obtuvo una conductividad de 738,8 $\mu\text{s}/\text{cm}$ (0,739 dS/m) que indica que existe poca cantidad de solutos disueltos en la muestra, correspondiendo a un suelo no salino. Se ha reportado que los suelos de la península antártica y de la antártica costera oriental generalmente tienen una conductividad eléctrica, menores a 2 dS/m, a diferencia de los suelos de las montañas del interior del continente que a menudo poseen valores superiores a 4 dS/m (**Cowan, 2014**). En cuanto al pH, se tuvo un valor de 5,10 que concuerda con investigaciones similares en donde muestras de agua, suelos y sedimentos antárticos presentaron valores de pH casi neutro, variando entre 5,0 y 6,0 durante las épocas de verano y en algunos casos fue de 7,0 (**Arcos, 1990; Chong et al., 2012; Jordanova, 2017**).

3.1.2 Aislamiento y determinación de población microbiana

3.1.2.1 Aislamiento por centrifugación diferencial de dispersión (DDC)

El cálculo de ufc/g de suelo seco, no se logró realizar en ningún medio debido al crecimiento escaso de las colonias de actinomicetes sobre los medios de cultivo. Cuarenta y nueve colonias de microorganismos se obtuvieron en los medios CRA (pH 5,5), AAC (pH 5,5) y AAC (pH 6,5) como se reporta en la Tabla C1 (Anexo C).

3.1.2.2 Aislamiento Tradicional

Un total de 64 colonias de actinomicetes fueron aisladas de los medios CRA y AAC, las cuales se reportan en la Tabla C2 (Anexo C). En el medio de cultivo AAC se encontró un valor de $5,60 \times 10^3$ ufc/g de suelo seco, mientras en el medio de cultivo CRA no se obtuvo el número aceptable de colonias para realizar el cálculo de este valor.

Según el número de colonias obtenidas, se puede inferir que la metodología DDC no funcionó para el aislamiento de actinomicetes, de manera que se necesita de estudios posteriores para validar esta técnica. Atribuyendo esto, a investigaciones en donde el método DDC en su procedimiento convencional ha permitido aislar grandes poblaciones de actinomicetes de muestras de suelos, siendo hasta nueve veces más eficiente que el método tradicional (**Gomes et al., 1999**).

Respecto a la influencia del tipo de medio de cultivo utilizado para el aislamiento selectivo de los actinomicetes, el agar AAC al ser un medio general complejo, es rico en nutrientes y compuestos fácilmente asimilables, por lo que permitió obtener 72 colonias de actinomicetes en comparación con el agar CRA en donde se obtuvieron 41 colonias, el cual podría considerarse como un medio de cultivo sintético debido a que su composición es más específica.

3.1.3 Aislamiento selectivo, purificación y almacenamiento de los cultivos

Ciento trece colonias de actinomicetes fueron aisladas a partir de los medios CRA y AAC. La información detallada de las características del aislamiento de las colonias de actinomicetes, se encuentra reportada en la Tabla C3 (Anexo C). Del número total de colonias obtenidas, 36 cepas fueron descartadas por contaminación y de las 77 cepas restantes se formaron 13 grupos de color que se muestran en la Tabla 7. A partir de cada grupo obtenido se seleccionó un representante para realizar los estudios taxonómicos posteriores de caracterización molecular.

Tabla 7. Grupos de color de actinomicetes aislados de la muestra MS-013 mediante DDC y método tradicional

Grupo de color	Color		Códigos
	Micelio aéreo	Micelio de sustrato	
1	(363) Bold yellow	(320-410) Ligth Brown	ATL-050*
2	(369) Biscuit	(367) Manilla	ATD-018*
3	(414) Golden Brown	(541) Maroon	ATL-010, BCE-009, BCL-012, BCL-005*
4	(414) Golden Brown	(320-410) Light Brown	ATL-016*, BCL-029, BCL-011
5	(210) Sky	(541) Maroon	BCL-018*
6	(367) Manilla	(367) Manilla	ATL-005*
7	(356) Golden yellow	(541) Maroon	BCE-011, BCE-013, BCE-030*, BCL-002, BCL-028
8	(356) Golden yellow	(414) Golden Brown	BCE-022, BCL-027*
9	(356) Golden yellow	(320-410) Light Brown	BCE-017, BCL-006*, BCL-024
10	(320-410) Light Brown	(499) Service Brown	BCL-003*
11	(320-410) Light Brown	(320-410) Light Brown	ATD-011*, BCE-021, BCL-015*
12	(414) Golden Brown	(414) Golden Brown	BCL-004, ATL-015*
13	Blanco	(541) Maroon	ATL-006, BCE-014*

*Cepas seleccionadas como representantes para estudios taxonómicos posteriores

3.1.4 Caracterización molecular de actinomicetes

Los resultados de la cuantificación del ADN genómico de las 152 cepas de actinomicetes se encuentran reportados en la Tabla D1 (Anexo D). Se determinó que la mayoría de las cepas tenían concentraciones suficientes y relaciones 260/280 aceptables para ser utilizadas en la taxonomía molecular de patrones de fingerprinting por rep-PCR. Además, la integridad de los ADNs genómicos de las muestras estudiadas se observan en la Figura 1 (Anexo E). En donde se evidenció que, la mayoría de las muestras presentaron ADN genómico en una sola banda, aunque algunas presentaron también barrido en el gel, debido a una fragmentación excesiva del ADN. Además, se identificó presencia de ARN ribosomal, como consecuencia de que la extracción de ADN se realizó cuando el cultivo de actinomicetes se encontraba metabólicamente activo.

3.1.4.1 Dereplicación de cepas de actinomicetes mediante rep-PCR

Los patrones de fingerprinting de todas las muestras en estudio, se encuentran reportados en la Figura E2 (Anexo E). Se evidenció que la amplificación por rep-PCR generó entre 4 y 15 bandas con tamaños que oscilaron entre 100 pb a 2000 pb, como se observa en la Figura 1. Cabe mencionar que la presencia de ADN fragmentado o la posible contaminación con carbohidratos, proteínas o ARN ribosomal, no inhibieron la PCR. Además, 6 muestras fueron eliminadas del análisis final de taxonomía numérica de datos genotípicos, debido a que presentaron un número menor a 3 bandas. En un estudio similar, los patrones de fingerprinting que tuvieron bandas menores a 4 fueron excluidos del análisis final de taxonomía de datos genotípicos, debido a que éstos pueden ser un factor que limita la información final e influye negativamente en la obtención del dendrograma genético (Vinueza & Rodríguez, 2010).

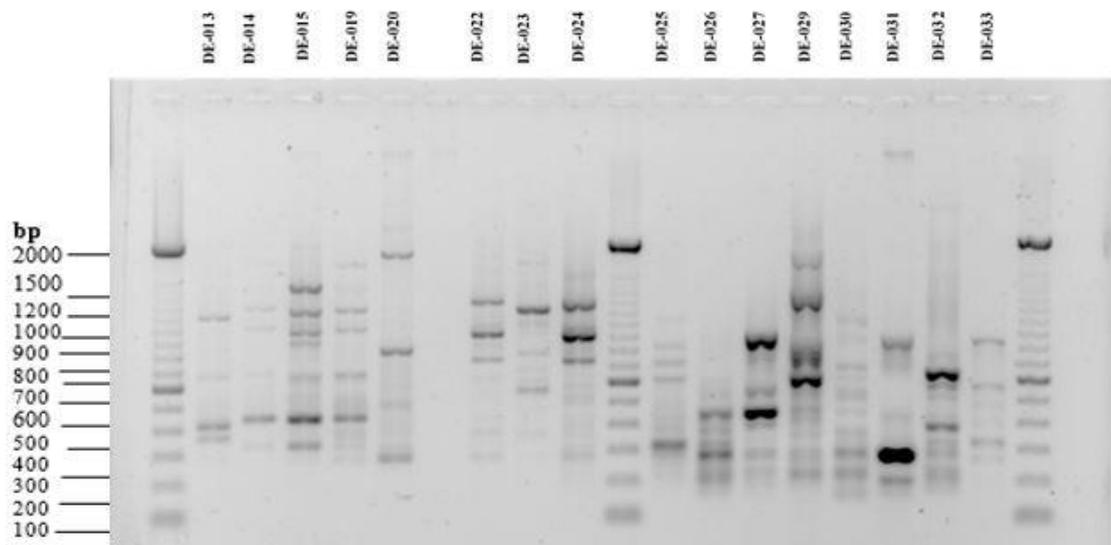


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por rep-PCR utilizando el primer Box A1R1.

3.1.5 Taxonomía numérica de datos genotípicos

En la Figura 2 se muestra el dendrograma del análisis de taxonomía numérica de patrones de fingerprinting de 146 cepas de actinomicetes. Se formaron 23 grupos-especie. El detalle de las cepas asignadas a cada grupo y aquellas seleccionadas para estudios posteriores, se reportan en la Tabla 8.

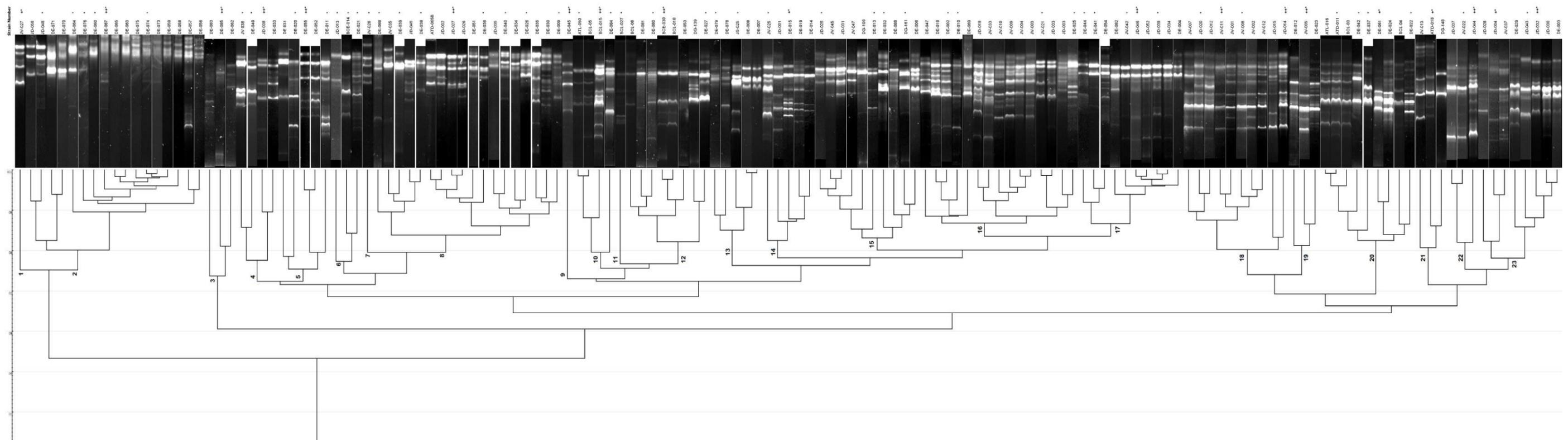


Figura 2. Dendrograma obtenido a partir de los patrones de fingerprinting por rep-PCR realizado a 146 cepas de actinomicetes, basado en el coeficiente de correlación de Pearson y en el algoritmo UPGMA.

(+) Cepas representantes de los grupos-especie utilizadas en el secuenciamiento del gen del ADNr 16S. (++) Cepas usadas para la identificación molecular del gen del ADNr 16S. (*) Cepas seleccionadas para la caracterización fenotípica final.

Tabla 8. Grupos-especie obtenidos a partir del análisis de taxonomía numérica de datos genotípicos

Grupos-especie	Códigos
1	JV-027 †*
2	JD-058, JD-048*, DE-071, DE-070, DE-064*, DE-076*, DE-060*, DE-067 ††*, DE-065, DE-063, DE-075, DE-074*, DE-073, DE-059, DE-058, DE-057, DE-056
3	DE-083, DE-085 ††*, DE-062
4	JV-038*, DE-049*, JD-038 ††*, DE-033
5	DE-031, DE-020*, DE-055 ††*, DE-052, DE-011*
6	JD-013*, BCE-014*, DE-021*
7	JV-026*
8	DE-068*, JV-035, DE-039*, JD-045, DE-038*, ATD-005, JD-002, JD-027 ††*, JD-026, DE-051, DE-036*, JD-035, DE-040*, DE-034, DE-026*, DE-035, DE-030, DE-009*
9	DE-045 ††*
10	ATL-050*, BCL-005, BCL-015 ††*, DE-084*
11	BCL-027*
12	BCL-006, DE-081, DE-080*, BCE-030 ††*, BCE-018, DE-053, DG-139, DE-027*
13	DE-079*, DE-078, JS-025*, DE-008, DE-007
14	JV-025*, JD-001, DE-015 †*, DE-019, DE-014
15	JD-025*, JV-045, JD-031, JV047, DG-106, DE-013*, DE-032*, DE-088, DG-161*, DE-006
16	DE-047, DE-018, DE-002*, DE-010, DE-069, JD-019, JV-033, JV010*, JV-009, JV-004, JV003, JV-021*, JD-033, JD-003, DE-025*
17	DE-044*, DE-041*, DE-054, DE-082, JV-042*, JD-046 †*, JD-052, JD-039*, JD-034, DE-004
18	JV-007, JD-020*, JD-012, JV-011 †*, JV-001, JV-008*, JV-002, JV-012
19	JD-015, JD-014 ††*, DE-012, JV-005 ††*, DE-023
20	ATL-016, ATD-011*, BCL-003, DE-042*, DE-037*, DE-061 ††*, DE-024, BCL-004, DE-022*
21	JV-013, ATD-018 †*, DG-148
22	JD037, JV022*, JD044 ††*
23	JD-028, JD-004 †*, JV-037, DE-029, JD-043*, JD-032 ††*, JD-030, DE-003

(†) Cepas representantes de los grupos-especie seleccionadas para el secuenciamiento del gen del ADNr 16S.

(††) Cepas usadas para la identificación molecular del gen del ADNr 16S.

(*) Cepas seleccionadas para la caracterización fenotípica final.

3.1.6 Secuenciamiento del gen del ADNr 16S y análisis filogenético

Los parámetros de calidad de las 19 cepas enviadas para el secuenciamiento del gen del ADNr 16S se encuentran reportados en la Tabla D2 (Anexo D). Se evidenció concentraciones de ADN genómico superiores a 90 ng/μL y una alta pureza de valores entre 1,6 a 2,0 para la relación 260/280. Cabe mencionar que del total de cepas de actinomicetes secuenciadas, solamente 14 presentaron resultados adecuados (Tabla D8, Anexo D), las 5 cepas restantes fueron descartadas del análisis filogenético, debido a que la calidad de los cromatogramas obtenidos del gen del ADNr 16S no permitieron establecer secuencias consenso del gen completo.

El árbol filogenético se muestra en la Figura 3 y corresponde a un análisis preliminar de la diversidad existente entre las cepas de actinomicetes en estudio. Se puede notar que los actinomicetes estudiados fueron ubicados como pertenecientes a los géneros *Nocardia* y *Streptomyces*. En la Tabla 9 se detallan las especies identificadas a nivel molecular, además del número de nucleótidos de la secuencia del gen del ADNr 16S y las fotografías de sus características morfológicas, las cuales se asocian a la diversidad existente entre especies, así como también a la diversidad intra-especie. Se determinó que la mayoría de actinomicetes son cercanas a la especie *Streptomyces fildesensis*, a la cual se asociaron 10 miembros. En menor proporción estuvieron presentes las especies *Streptomyces niveus*, *Streptomyces wistariopsis* y *Streptomyces rhizophaeerihabitans*, asociadas a un sólo miembro. Por otro lado, solamente la cepa DE-067 se ubicó como perteneciente al género *Nocardia*.

0.1 substitutions/site

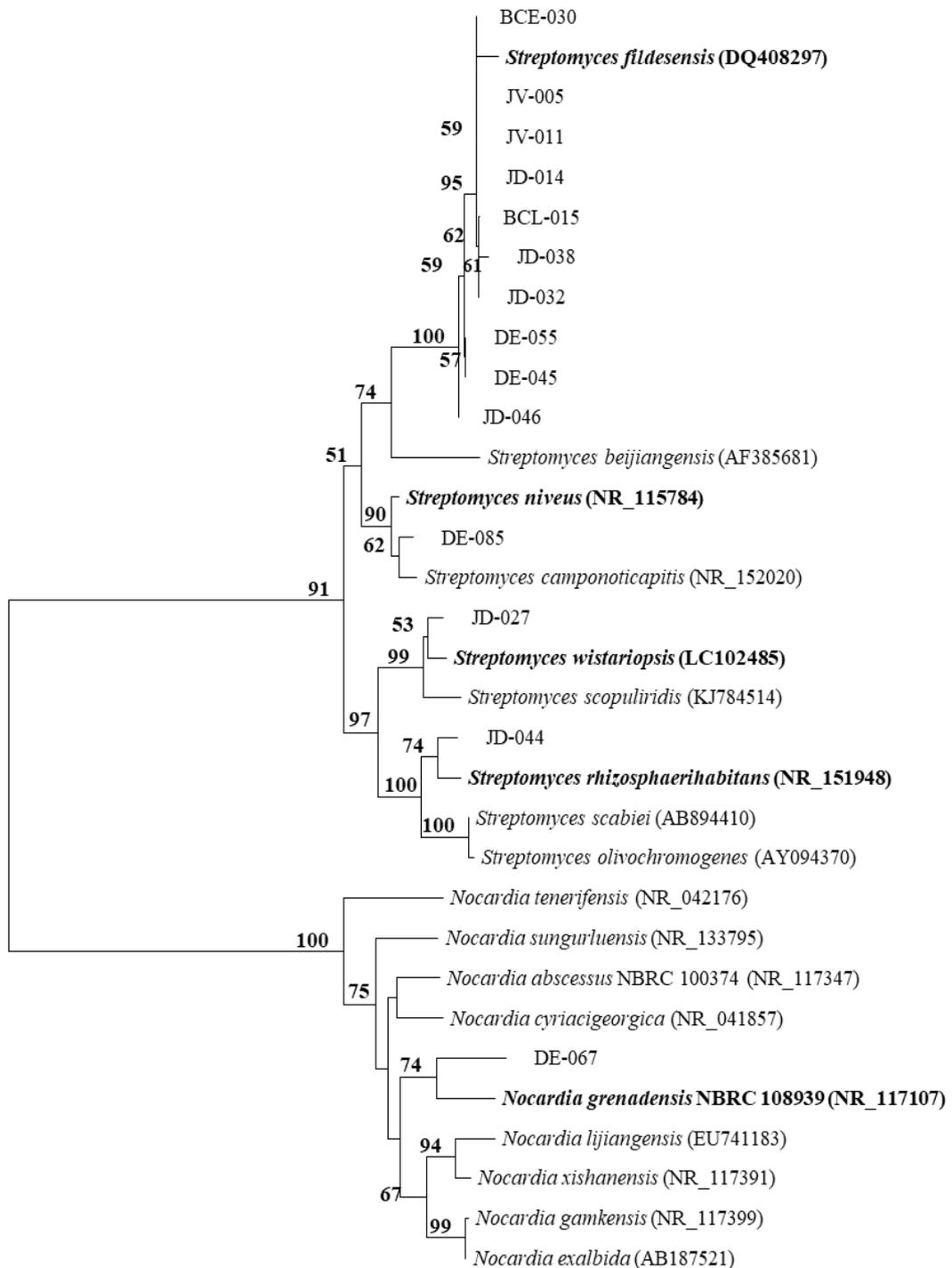
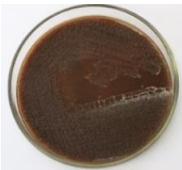


Figura 3. Análisis filogenético de 14 cepas de actinomicetes aisladas de ecosistemas glaciares de la Antártida, Cotopaxi y Chimborazo, en base a la secuencia consenso del gen del ADNr 16S, calculado mediante Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987b). La topología fue evaluada usando el análisis de bootstrap y la escala indica el número de sustituciones por cada 100 nucleótidos. Las posibles especies más cercanas a las cepas estudiadas se enmarcan con negrilla.

Tabla 9. Cepas asociadas a especies cercanas basadas en su identificación molecular

Códigos	Número de nucleótidos	Especie cercana	Fotografías
BCE-030	1439	<i>Streptomyces fildesensis</i> (DQ408297)	
JV-005	1439		
JV-011	1439		
JD-014	1439		
BCL-015	1439		
JD-038	1437		
JD-032	1437		
DE-055	1437		
DE-045	1437		
JD-46	1294		
DE-085	1433	<i>Streptomyces niveus</i> (NR_115784)	
JD-027	1441	<i>Streptomyces wistariopsis</i> (LC102485)	
JD-044	1444	<i>Streptomyces rhizophaeerihabitans</i> (NR_151948)	
DE-067	1429	<i>Nocardia grenadensis</i> NBRC 108939	

3.1.6.1 Descripción Taxonómica

Las cepas que se identificaron como *Streptomyces fildesensis* presentaron un porcentaje de similitud entre el 99,46% y 99,72% (Tabla D3, Anexo D). Esta especie fue aislada en el 2011 de una muestra de suelo recolectada en la península Fildes, isla King George, Antártida occidental. Se caracteriza por poseer micelios aéreos de color blanco a gris, cadenas de esporas rectas a flexuosas, generalmente es mesófila y puede tolerar 0 a 3% (p/v) de NaCl (**J. Li, Tian, Zhu, Yang, & Li, 2011**). Estas características se confirmaron con las cepas asociadas a esta especie. Además, es importante mencionar que a pesar de que se reporta que *S. fildesensis* crece a un pH entre 6,0 a 9,0, en éste estudio la mayoría de estas cepas crecieron desde un pH de 4,5, y concuerda con las descripciones de actinomicetes de ésta misma especie realizadas en los estudios de **Baquero, (2018)** y **Villacís, (2015)**.

La cepa DE-085 se identificó como *Streptomyces niveus* por poseer un porcentaje de similitud del 99,72% (Tabla D4, Anexo D). Esta especie fue aislada de una muestra de suelo por Smith, Dietz, Sokolski, & Savage en 1956. Generalmente se caracteriza por crecer a una temperatura de 30°C, tener un micelio de sustrato de color beige y un micelio aéreo de color blanco con cadenas de esporas rectiflexibles, además tolera hasta un 5% de salinidad (**Wink, 2019**). Algunas de las características que presentó la cepa en estudio son similares a esta especie. entre ellas, tiene un micelio de sustrato de color naranja claro y un micelio aéreo de color blanco, mientras que la cadena de esporas es recta. Es mesófila, neutrotolerante y halófila. Por lo que se confirmó su cercanía.

De igual manera, con un porcentaje del 98,58% de similitud la cepa JD-027 fue identificada como *Streptomyces wistariopsis* (Tabla D5, Anexo D). Esta especie se aisló en 1969 de suelos de latitudes altas, bajo cubierta forestal y se caracterizó como un actinomicete mesófilo, que presenta un micelio aéreo de color amarillo claro y ligera esporulación, con una morfología de esporas rectas. También se menciona su capacidad de tolerancia de hasta un 4% de salinidad (**Tresner, Hayes, & Backus, 1969**). El actinomicete en estudio presentó un micelio aéreo de color blanco amarillento y un micelio de sustrato de color naranja claro, es mesófilo, neutrotolerante y soporta hasta 5% de salinidad. Según las características fenotípicas obtenidas se confirma su cercanía con la especie *S. wistariopsis*.

Adicionalmente, la cepa JD-044 que presentó un porcentaje de similitud de 99,45% fue identificada como miembro de la especie *Streptomyces rhizophaeerihabitans* (Tabla D6, Anexo D). Fue aislada en el año 2016 de un suelo de rizósfera de bambú en Damyang, Corea del Sur. Este actinomicete se caracteriza por formar un micelio de sustrato ampliamente ramificado e hifas aéreas rectiflexibles, crece a temperaturas de 4°C a 37°C, en un rango de pH entre 4,0 a 9,0 y soporta concentraciones de NaCl de 0 a 5% (**Lee & Whang, 2016**). Se comprobó que la cepa JD-044 identificada con esta especie, compartió algunas de las características, entre ellas, es mesófila, halófila y neutrotolerante, mientras que la morfología de la cadena de las esporas es recta.

Por otro lado, se encontró que la cepa DE-067 fue cercana a *Nocardia grenadensis* debido a que presentó un porcentaje del 98,39% de similitud (Tabla D7, Anexo D). Esta especie fue aislada en el 2012 de una muestra de arena en el Mar Caribe. Generalmente es mesófila, forma un micelio vegetativo de color amarillo a naranja claro y un micelio aéreo de color blanco amarillento con esporas rectas en forma de varilla (**Kampfer, Lodders, Grun-Wollny, Martin, & Busse, 2012**). Se confirmó algunas de las características en la cepa DE-067, la cual presentó un color naranja claro, es mesófila, neutrotolerante y soporta concentraciones hasta 5% de salinidad. Sin embargo, es importante mencionar que de acuerdo con el porcentaje de similitud obtenido en la secuencia del gen del ADNr 16S, probablemente estaríamos en presencia de una nueva especie asociada a este género. Según los parámetros taxonómicos establecidos, para que una cepa se relacione con un especie identificada debe presentar un valor de similitud de secuencia de genes entre el 98,5% al 99%, caso contrario podría catalogarse como una especie nueva y después de realizar experimentos de hibridación ADN-ADN o mediante el secuenciamiento del genoma completo, podría confirmarse (**Kampfer & Glaeser, 2011; Stackebrandt & Ebers, 2006**).

3.1.6.2 Identificación molecular de la colección mediante el gen del ADNr 16S

En la Figura 4 se muestra el dendrograma realizado a partir de la identificación molecular de las cepas secuenciadas, determinándose 14 grupos fenéticos con un corte de similitud del 80%, los cuales se encuentran detallados en la Tabla 10. Se evidencia la similaridad de los patrones de fingerprinting y la formación de grupos más coherentes. Se puede notar

claramente la amplia distribución de la especie *Streptomyces fildesensis* en toda la colección. Además de la gran diversidad intra-especie existente. De esta manera, de 146 cepas de actinomicetes de la colección, se logró posicionar a 87 cepas en grupos taxonómicos probables y su cercanía con las especies identificadas.

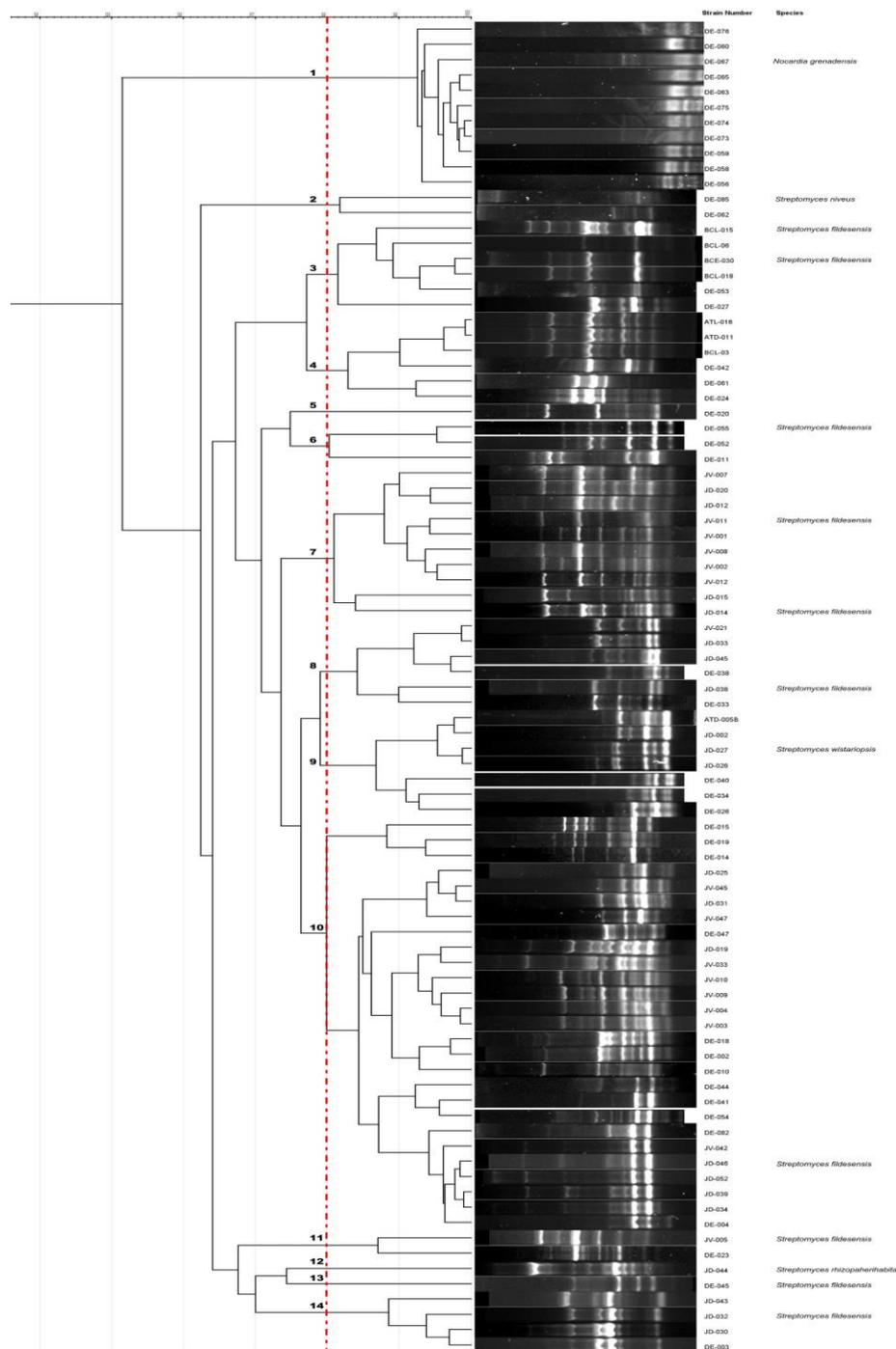


Figura 4. Identificación molecular de cepas de actinomicetes, basada en el 80% de similitud entre los patrones de fingerprinting para la formación de grupos fenéticos.
 (††) Cepas secuenciadas usadas para la identificación molecular del gen del ADNr 16S.

Tabla 10. Grupos-especie obtenidos a partir de la identificación molecular de las cepas secuenciadas

Grupos-especie	Códigos	Especie Cercana
1	DE-076, DE-060, DE-067 ++, DE-065, DE-063, DE-075, DE-074, DE-073, DE-059, DE-058, DE-056	<i>Nocardia grenadensis</i>
2	DE-085 ++, DE-062	<i>Streptomyces niveus</i>
3	BCL-015 ++, BCL-006, BCE-030 ++, BCL-018, DE-053, DE-027	<i>Streptomyces fildesensis</i>
4	ATL-016, ATD-011, BCL-003, DE-042, DE-061, DE-024	<i>Streptomyces fildesensis</i>
5	DE-020	<i>Streptomyces fildesensis</i>
6	DE-055 ++, DE-052, DE-011	<i>Streptomyces fildesensis</i>
7	JV-007, JD-020, JD-012, JV-011 ++, JV-001, JV-008, JV-002, JV-012, JD-015, JD-014 ++	<i>Streptomyces fildesensis</i>
8	JV-021, JD-033, JD-045, DE-038, JD-038, DE-033	<i>Streptomyces fildesensis</i>
9	ATD-005B, JD-002, JD-027 ++, JD-026, DE-040, DE-034, DE-026	<i>Streptomyces wistariopsis</i>
10	DE-015, DE-019, DE-014, JD-025, JV-045, JD-031, JV-047, DE-047, JD-019, JV-033, JV-010, JV-009, JV-004, JV-003, DE-018, DE-002, DE-010, DE-044 ++, DE-041, DE-054, DE-082, JV-042, JD-046 ++, JD-052, JD-039, JD-034, DE-004	<i>Streptomyces fildesensis</i>
11	JV-005 ++, DE-023	<i>Streptomyces fildesensis</i>
12	JD-044 ++	<i>Streptomyces rhizophaeerihabitans</i>
13	DE-045 ++,	<i>Streptomyces fildesensis</i>
14	JD-043, JD-032 ++, JD-030, DE-003	<i>Streptomyces fildesensis</i>

(++) Cepas secuenciadas usadas para la identificación molecular del gen del ADNr 16S.

3.1.7 Caracterización fenotípica de actinomicetes representativos

La información detallada de las pruebas de taxonomía numérica se encuentra reportada en la Tabla F1 (Anexo F).

3.1.7.1 Caracterización macroscópica y microscópica

Se realizó la caracterización macroscópica a las 67 cepas seleccionadas en la taxonomía numérica de datos genotípicos, obteniendo los grupos de color reportados en la Tabla F2 (Anexo F). Se determinaron 23 grupos de color, en donde la mayoría de las cepas se distribuyeron en dos grupos múltiples formados por los colores (320-341) Light Brown, (541) Maroon y el color Blanco. Mientras que, catorce cepas se ubicaron en grupos individuales y las restantes se encontraron en agrupamientos más pequeños. Las variaciones

de color depende de los nutrientes presentes en el medio, el cual está asociado a la coloración de esporas, micelio aéreo y pigmento difusible (Navas, 2016).

Según la caracterización microscópica, se determinó que la mayoría de las cepas de actinomicetes presentaron cadenas de esporas rectas, entre ellas 20 correspondían a cadenas cortas y 17 a cadenas largas, 11 presentaron una forma incompleta de cadena, 9 fueron esporas individuales y las 9 cepas restantes eran flexuosas, además la cepa correspondiente a DE-061 presentó una forma de esporangio. El detalle de la morfología de la cadena de esporas de cada muestra se encuentra reportada en la Tabla F3 (Anexo F).

3.1.7.2 Caracterización fisiológica de actinomicetes

Las características que se muestran en la Tabla 11 son un resumen de los datos obtenidos en la caracterización fisiológica de los actinomicetes. En donde se evidenció que no hubo crecimiento de ninguna cepa a 50°C, ni en pH 8,5, así como tampoco en medios suplementados con NaCl al 10% y 15% (p/v). Además, solamente 4 cepas crecieron a 4 °C. Adicionalmente, es importante recalcar que, las muestras DE-036, DE-037, DE-049 y DE-079, no evidenciaron crecimiento en estas pruebas fisiológicas, debido a su lento desarrollo por lo que se asignaron como no determinadas.

Tabla 11. Caracterización fisiológica de la colección de las cepas de actinomicetes

Pruebas Fisiológicas	Clasificación	Número de actinomicetes
Temperatura	Termófilo	0
	Mesófilo	47
	Mesófilo extremo	3
	Psicrótrofo	13
	Psicrófilo	0
	No determinado	4
pH	Acidófilo	10
	Neutrotolerante	50
	Neutrófilo	0
	Alcalitolerante	0
	Alcalófilo	0
	No determinado	7
Salinidad	Halófilo débil	48
	Halófilo	12
	Halófilo extremo	2
	No tolerante	1
	No determinado	4

Tabla 11. (Continuación)

	Aminoácidos	%
Aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno	Lisina	79,71
	Cisteína	84,06
	Histidina	86,96
	Leucina	91,30
	Arginina	82,61
	Tirosina	91,30
	Acido aspártico	89,86
	Alanina	91,30
	Acido glutámico	8,70
	Valina	91,30
	Asparagina	85,51
	Treonina	86,96
	Fenilalanina	88,41
		Aminoácidos
Aminoácidos como fuente única de nitrógeno	Lisina	62,32
	Cisteína	63,77
	Histidina	60,87
	Leucina	53,62
	Arginina	59,42
	Tirosina	65,22
	Acido aspártico	28,99
	Alanina	56,52
	Acido glutámico	7,25
	Valina	65,22
	Asparagina	65,22
	Treonina	62,32
Fenilalanina	60,87	

De acuerdo con los rangos de temperatura, se determinó que 47 actinomicetes pertenecen al grupo de los mesófilos, 18 cepas son psicótrofas y 3 mesófilas extremas. Datos que coinciden con investigaciones en donde se encontró que la temperatura óptima para el crecimiento de actinomicetes, puede variar entre las especies de un género, pudiendo tener un crecimiento óptimo a temperaturas entre 25 a 30°C, siendo mesófilos y correspondiendo a los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Nocardia* (Akond et al., 2016; Williams & Cross, 1971). Por otro lado, se menciona que los actinomicetes también pueden crecer óptimamente a temperaturas de alrededor de 20 a 25°C, siendo psicótrofos (Barka et al., 2016). La información detallada de la clasificación de las cepas en función de la temperatura se encuentra reportada en la Tabla F4 (Anexo F).

De la misma manera, el análisis del crecimiento en función del pH evidenció que la mayoría de las cepas resultaron ser neutrotolerantes y en menor proporción fueron acidófilas. Estos resultados se encuentran reportados en la Tabla F5 (Anexo F). en estudios similares, se han

registrado un buen crecimiento de cepas de actinomicetes aisladas de suelo en pH 4, 6 y 8 (**Pathalam et al., 2017**). Por ejemplo, los géneros *Nocardia* y *Streptomyces*, han registrado crecimientos adecuados a pH 7,0 (**Akond et al., 2016**).

En cuanto a la tolerancia a la salinidad, la mayoría de las cepas correspondientes a 48, resultaron ser halófilas débiles, mientras que 12 pertenecen al grupo de halófilos, 2 cepas son halófilas extremas y la cepa ATD-011 no es tolerante a este estrés fisiológico. La información detallada de esta prueba se encuentra reportada en la Tabla F6 (Anexo F). Datos que coinciden con estudios en donde varias cepas de actinomicetes fueron sometidas a diferentes concentraciones de NaCl, determinándose un crecimiento óptimo entre valores de 4% y 7% (p/v) y un crecimiento pobre o no crecieron a una concentración de 10% (p/v) (**Pathalam et al., 2017**). También, cabe recalcar que el género *Streptomyces* ha registrado crecimiento de cepas de actinomicetes en concentraciones alcalinas de NaCl, variando entre rangos de 0,5 a 1,5% e incluso a 3% (p/v) (**Akond et al., 2016**).

Por otro lado, se evidenció que entre el 79,51 % y 91,30 % de las cepas presentaron crecimiento en los aminoácidos, ácido aspártico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, histidina, leucina, lisina, tirosina, treonina y valina. El análisis detallado de todas las muestras se encuentra reportado en la Tabla F7 (Anexo F). En donde, 63 cepas (91,30 %) de actinomicetes crecieron de manera adecuada en alanina, leucina y tirosina. Considerándose propicios porque se los utilizan fácilmente como fuente de carbono y nitrógeno (**Hoskisson, Sharples, & Hobbs, 2003**). Por otro lado, se registró el crecimiento solamente de 6 cepas (8,70%) de actinomicetes en ácido glutámico. Esto concuerda con un estudio similar, en donde se reporta que de una colección de 30 cepas de actinomicetes, ninguna cepa fue capaz de metabolizar el ácido glutámico (**Baquero, 2018**).

Del mismo modo, en relación a la utilización de los aminoácidos como fuente única de nitrógeno. Se determinó que entre el 53,62% y 65,22% de las cepas de actinomicetes metabolizaron eficientemente los aminoácidos, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, histidina, leucina, lisina, tirosina, treonina y valina. Considerándose fuentes adecuadas de crecimiento (**Gottlieb & Ciferri, 1956; Waksman, 1979**). Por ejemplo, se ha reportado que leucina y asparagina ofrecen buenas fuentes de nitrógeno para los

actinomicetes como *Actinomyces bobili*, *Actinomyces griseus*, *Actinomyces reticuli* y *Actinomyces scabies* que también crecieron fácilmente en tirosina (**Waksman, 1979**).

Por otro lado, en el caso del ácido aspártico y ácido glutámico, se obtuvo porcentajes del 28,99% y 7,25% respectivamente. Lo que indica que las cepas de actinomicetes no pudieron convertir el ácido aspártico en ácido oxalacético, o metabolizar el ácido glutámico, que están involucrados en la generación de energía por medio del ciclo de Krebs (**Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002**). Por lo tanto, los actinomicetes no tuvieron las enzimas necesarias para degradar estos aminoácidos. El detalle de cada muestra se encuentra reportada en la Tabla F8 (Anexo F).

3.1.8 Taxonomía numérica de datos fenotípicos

En la Figura 5 se observa el dendrograma obtenido a partir de los datos fenotípicos con un corte del 89% de similitud, en donde se identificaron 23 grupos-especie, los cuales se muestran en la Tabla 12. Se determinaron 3 grupos que se atribuyeron como los más grandes por tener 35 miembros, 8 se incluyeron como grupos pequeños y 12 se identificaron como grupos individuales.

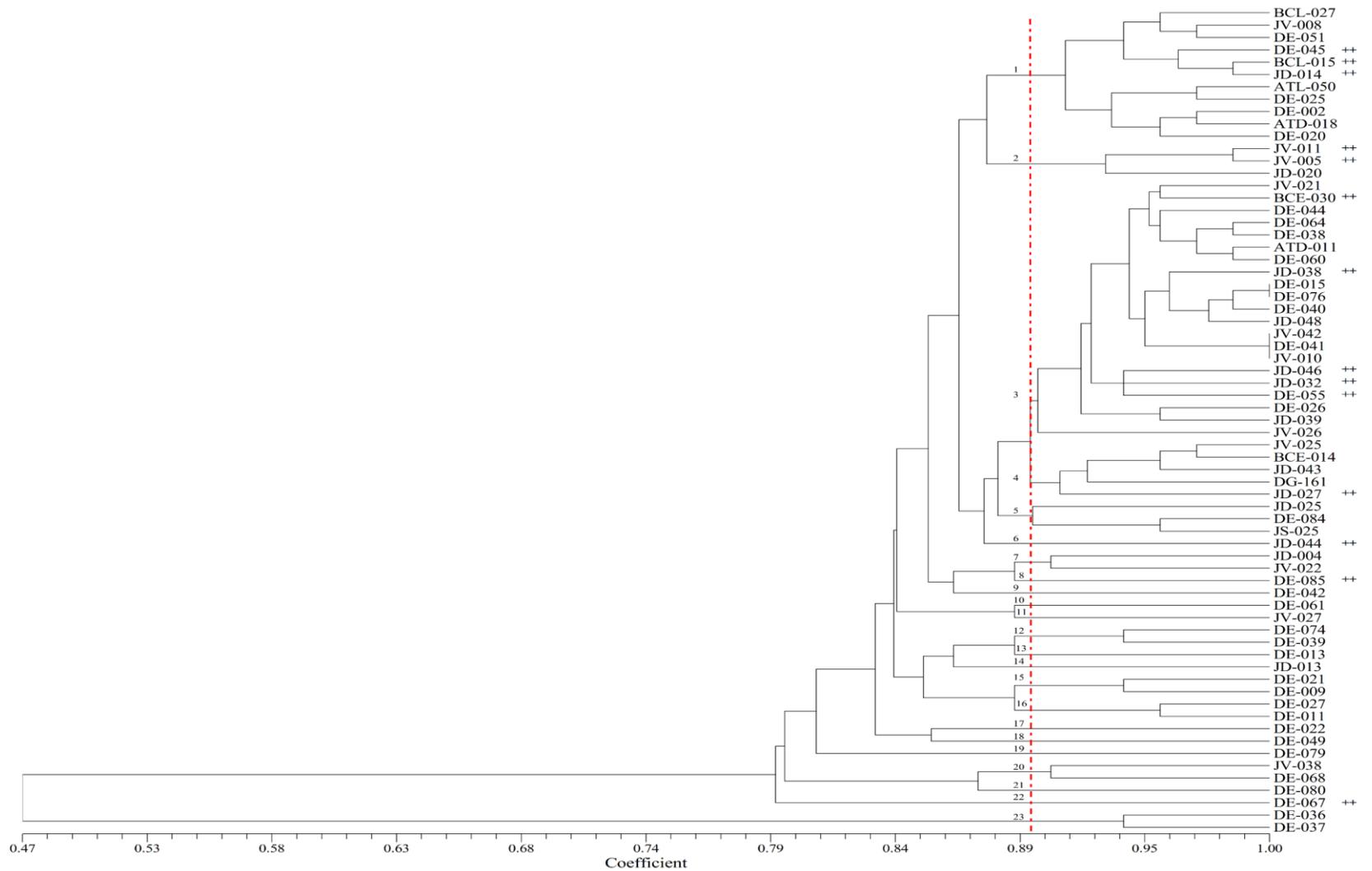


Figura 5. Dendrograma fenotípico de 67 cepas de actinomicetes, obtenido a partir del análisis de taxonomía numérica de datos fenotípicos con un corte al 89% de similitud utilizando el coeficiente de simple similitud (S_{SM}) y el algoritmo UPGMA.
 (++) Cepas secuenciadas usadas para la identificación molecular del gen del ADNr 16S

Tabla 12. Grupos-especie de cepas de actinomicetes representantes, obtenidos a partir de la taxonomía numérica de datos fenotípicos

Grupos-especie	Códigos
1	BCL-027, JV-008, DE-051, DE-045 ++, BCL-015 ++, JD-014 ++, ATL-050, DE-025, DE-002, ATD-018, DE-020
2	JV-011 ++, JV-005 ++, JD-020
3	JV-021, BCE-030 ++, DE-044 ++, DE-064, DE-038, ATD-011, DE-060, JD-038 ++, DE-015, DE-076, DE-040, JD-048, JV-042, DE-041, JV-010, JD-046 ++, JD-032 ++, DE-055 ++, DE-026, JD-039, JV-026
4	JV-025, BCE-014, JD-043, DG-161, JD-027 ++
5	JD-025, DE-084, JS-025
6	JD-044 ++
7	JD-004, JV-022
8	DE-085 ++
9	DE-042
10	DE-074, DE-039
11	DE-013
12	JD-013
13	DE-021, DE-009
14	DE-027, DE-011
15	DE-061
16	JV-027
17	DE-022
18	DE-049
19	DE-079
20	JV-038, DE-068
21	DE-080
22	DE-067 ++
23	DE-036, DE-037

(++) Cepas secuenciadas usadas para la identificación molecular del gen del ADNr 16S

3.1.9 Discusión general del trabajo

El presente estudio se enfocó en determinar la diversidad biológica de cepas de actinomicetes que crecen en ecosistemas fríos, como la Antártida, Cotopaxi y Chimborazo, a través de una caracterización polifásica. Se analizaron datos genotípicos, fenotípicos y mediante el secuenciamiento del gen del ADNr 16S, se identificó a las cepas con posibles especies cercanas. Además, se pretende ampliar el banco genético de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos con una colección

de especies de actinomicetes identificadas, siendo una base para posteriores investigaciones relacionadas con la variedad de comunidades microbianas.

En el análisis molecular de los fingerprintings del primer box, se encontró poca diversidad genética, debido a que el dendrograma obtenido mostró que las cepas formaron una cantidad muy reducida de grupos. Es probable que exista una alta variación intra-especie, en las pocas especies de *Streptomyces* y *Nocardia* que se identificaron, lo cual, contribuyó a este resultado. Cabe mencionar que la técnica de rep-PCR es una herramienta muy útil al momento de amplificar el ADN genómico como medio de replicación (Ishii & Sadowsky, 2009b). Sin embargo, claramente se debe estandarizar o mejorar la técnica, debido a que no cuenta con el poder discriminativo suficiente para lograr obtener un alto número de bandas en todas las cepas, lo cual podría limitar la identificación molecular. Por otro lado, se evidenció la sensibilidad del coeficiente de Pearson en cuanto a la comparación de intensidad y número de bandas entre las cepas, lo que permitió formar los grupos-especie bien definidos en este estudio (Baquero, 2018).

En relación a los resultados del análisis filogenético basado en la comparación de las secuencias del gen del ADNr 16S, se encontró que *Streptomyces fildesensis*, es la especie que más predominó en los diferentes cultivos de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares. El clúster formado por miembros de esta especie fue altamente congruente ya que presentó un valor de bootstrap de 95. Es importante mencionar que las cepas asociadas a *S. fildesensis* provienen de la Antártida, Cotopaxi y Chimborazo, ecosistemas claramente distantes con alturas que van desde los 20 hasta los 4500 msnm, haciendo evidente que la diversidad genética y metabólica intra-especie también está asociada a una distribución geográfica que se ubica a lo largo del planeta. Es posible que debido a su gran capacidad para desarrollar mecanismos de adaptación a ecosistemas glaciares, hayan sido capaces de crecer y desarrollarse en estos ambientes, que comparten características fisicoquímicas, pero que están separados por miles de kilómetros (Navas, 2016).

Por otro lado, con los resultados de la taxonomía de datos fenotípicos, se encontró congruencia entre el número de grupos fenéticos formados, con la agrupación por color. Esto podría validar la determinación preliminar de los grupos de color como una

metodología para observar una posible diversidad de especies en una colección de cultivos. Sin embargo, se debe recalcar que la caracterización fenotípica es una metodología un tanto subjetiva, en donde las propiedades de pigmentación, morfología y características fisiológicas, dependen de la temperatura, tiempo de incubación y de la interpretación del investigador, lo que podría generar errores al momento de comparar con la taxonomía numérica de datos moleculares (**Díaz & Estrada, 2018**).

De manera general, la colección de cepas estudiadas en el presente trabajo resultó ser en su gran mayoría, mesófilas, halófilas débiles y neutrotolerantes. Además, más del 90% fueron capaces de utilizar aminoácidos como fuente única de carbono y nitrógeno o sólo como fuente única de nitrógeno, lo que podría atribuirse como característica metabólica importante.

Finalmente, mediante la identificación molecular de las cepas y la similitud de los patrones de fingerprinting, se reveló que de un total de 146 cepas de actinomicetes estudiadas, se logró elucidar solamente la posición taxonómica de aproximadamente 87, correspondiente al 59,58% de la colección. Como es evidente, se necesita ampliar la búsqueda de las cepas que no se secuenciaron a través de un estudio más profundo, en donde se complete la información mediante la identificación molecular, para conocer con certeza si estos microorganismos pertenecen o no a las especies obtenidas. Además, se podría encontrar otras especies que probablemente sean nuevas o poco identificadas y de esta manera conocer la verdadera diversidad de la colección.

Todos los resultados sirven como un punto de partida para investigaciones posteriores que tenga como fin la búsqueda de utilidades biotecnológicas de los actinomicetes, ayudando a perfilar las características que los hacen una fuente importante de compuestos bioactivos para el desarrollo de productos (**Bhatti et al., 2017**).

Por ejemplo, en el caso de *Streptomyces fildesensis*, podría estudiarse la utilización de los pigmentos que produce como posible respuesta a la alta radiación solar. Esta característica está siendo estudiada en la elaboración de celdas solares o fotovoltaicas, para la generación de electricidad (**Silva et al., 2019**). Si se suma a la gran diversidad intra-especie y distribución geográfica que ha sido demostrada en este estudio, se podría encontrar una cepa altamente eficiente para este proceso.

Es importante recalcar que los métodos de caracterización fenotípica y las herramientas moleculares son sin duda procesos evidentemente valiosos, que juntamente con el secuenciamiento del gen del ADNr 16S, permiten darle robustez a este trabajo investigativo, de manera que resulta difícil desvincularlos. Por lo que, a pesar de haber encontrado poca diversidad de actinomicetes en el presente trabajo, se resalta su importancia de conocer al menos las especies probables más predominantes de estos ecosistemas y su diversidad intra-especie existente. No obstante, mediante trabajos posteriores, se podrá elucidar el potencial biotecnológico que poseen estos microorganismos, puesto que son evidentemente una fuente de bioproductos sin explotar.

3.2 Verificación de Hipótesis

3.2.1 Hipótesis Nula (H₀)

No existe diversidad genética y fenotípica entre las cepas de actinomicetes estudiados

3.2.2 Hipótesis Alternativa (H_a)

Existe diversidad genética y fenotípica entre las cepas de actinomicetes estudiados

Después del análisis realizado, se obtuvo 4 especies diferentes y 23 grupos en el análisis genotípico y fenotípico respectivamente, así como también en los grupos de color. Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, verificando que, si existe diversidad genética entre las cepas de actinomicetes estudiados.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se determinó la diversidad de las cepas de actinomicetes mediante la secuencia de la molécula del gen del ADNr 16S, evidenciándose que existió poca diversidad filogenética, sin embargo, a pesar de que las cepas provienen de lugares geográficos distintos, *Streptomyces fildesensis*, fue ubicada tanto en la Antártida, así como también en el Cotopaxi y Chimborazo, comprobándose la ubicuidad de esta especie a lo largo del planeta.
- Se caracterizó fenotípicamente y genotípicamente actinomicetes aislados de la Antártida y de los volcanes Cotopaxi y Chimborazo, encontrándose que la mayoría de las cepas de la colección estudiada resultaron ser mesófilas, halófilas débiles y neutrotolerantes, además el 90% de estas, son capaces de metabolizar los aminoácidos como fuentes de carbono y nitrógeno, a excepción de los aminoácidos ácidos aspártico y glutámico, en donde presentaron un crecimiento pobre.
- Se estableció mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos y moleculares la diversidad de grupos de actinomicetes. Encontrando 23 grupos genotípicos, así como también 23 grupos fenotípicos y de color. Los datos moleculares mostraron una homogeneidad de patrones de fingerprinting, dando como resultado, una gran cantidad de grupos intra-especie similares.
- Se identificó actinomicetes representantes de grupos hasta nivel de especie. Determinándose 4 del género *Streptomyces*, entre ellas *S. wistariopsis*, *S. niveus*, *S. rhizophaeerihabitans* y *S. fildesensis*, siendo esta última especie, la más predominante en toda la colección. Además, la cepa DE-067 resultó ser cercana a la especie *Nocardia grenadensis* y posiblemente podría considerarse como una especie nueva debido al porcentaje del 98,39% de similitud con esta especie.
- Se complementó el análisis de patrones de fingerprinting y la caracterización fenotípica, para realizar un análisis polifásico de las cepas secuenciadas, logrando posicionar taxonómicamente a 87 actinomicetes, en grupos filogenéticos probables.

4.2 Recomendaciones

- Estandarizar las condiciones de la técnica rep-PCR, para la obtención de un número mayor de bandas y la formación de grupos más congruentes.
- Complementar el análisis de datos genotípicos con el uso de los primers ERIC y REP, para realizar un análisis comparativo de los patrones de fingerprinting, generado por los 3 primers y generar un valioso criterio discriminatorio de la diversidad de la colección.
- Determinar la diversidad de la colección, mediante la identificación molecular de más cepas, para identificar su posición taxonómica.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Akond, M. A., Jahan, M. N., Sultana, N., & Rahman, F. (2016). Effect of Temperature, pH and NaCl on the Isolates of Actinomycetes from Straw and Compost Samples from Savar, Dhaka, Bangladesh. *American Journal of Microbiology and Immunology*, 1(2), 10–15. Retrieved from <http://www.aiscience.org/journal/ajmihttp://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
- Antony, R., Sanyal, A., Kapse, N., Dhakephalkar, P. K., Thamban, M., & Nair, S. (2016). Microbial communities associated with Antarctic snow pack and their biogeochemical implications. *Microbiological Research*, 192, 192–202. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2016.07.004>
- Arcos, F. (1990). Estudios preliminares en un cuerpo de agua dulce de Punta Williams, Isla Greenwich. *INAE*, 1, 10. Retrieved from <http://www.inae.gob.ec/wp-content/uploads/2016/03/Acta-2-Articulo-7.pdf>
- Arora, M. P., & Kanta, C. (2006). Biotechnology. In Chander Kanta (Ed.), *Biotechnology* (2007th ed., pp. 01-30). Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3011278&query=Biotechnology>
- Athalye, M., Lacey, J., & Goodfellow, M. (1981). Selective Isolation and Enumeration of Actinomycetes using Rifampicin. *Journal of Applied Bacteriology*, 51(2), 289–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1981.tb01244.x>
- Balcazar, W., Rondón, J., Rengifo, M., Ball, M. M., Melfo, A., Gómez, W., & Yarzabal, L. A. (2015). Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. *Microbiological Research*, 177, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2015.05.001>
- Baquero Vayas, D. E. (2018). Taxonomía polifásica de actinomicetes útiles en biotecnología. Retrieved from <http://repo.uta.edu.ec/handle/123456789/29128>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., ... van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Barton, L., & Northrup, D. (2011). Diversity of microorganisms. In Wiley (Ed.), *Microbial Ecology* (p. 400). United States of America. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=697468&query=bacterium+domain>
- Beales, N. (2004). Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY—Vol. 3*. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>

- Bell, J. M., Falconer, C., Colby, J., & Williams, E. (1987). CO Metabolism by a Thermophilic Actinomycete, *Streptomyces* Strain G26. *Microbiology*, *133*(12), 3445–3456. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-12-3445>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D36–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Amino Acids Are Made from Intermediates of the Citric Acid Cycle and Other Major Pathways. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22459/>
- Bhargava, A., & Srivastava, S. (2012). Introduction to Biotechnology. In I. Nova Science Publishers (Ed.), *Biotechnology: New Ideas, New Development* (pp. 1–26). India. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3021352&query=Biotechnology>
- Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis*, *111*, 458–467. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2017.09.036>
- Białkowska, A. M., Grzelczyk, A., Długolecka, A., Cieśliński, H., Kalinowska, H., Kur, J., & Turkiewicz, M. (2012). *Biotechnology and Food Science Physicochemical and biological characterization of soils from the vicinity of the Arctowski Polish Antarctic Station. Biotechnol Food Sci.* Retrieved from <http://www.bfs.p.lodz.pl>
- Bisen, P. (2014). *MICROBIAL TAXONOMY*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/279530726_MICROBIAL_TAXONOMY/references
- Bochner, B. R. (2009). Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *33*(1), 191–205. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00149.x>
- Borodina, I., Krabben, P., & Nielsen, J. (2005). Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Research*, *15*(6), 820–9. <https://doi.org/10.1101/gr.3364705>
- Brbić, M., Piškorec, M., Vidulin, V., Kriško, A., Šmuc, T., & Supek, F. (2016). The landscape of microbial phenotypic traits and associated genes. *Nucleic Acids Research*, *44*(21), 10074–10090. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw964>
- Bulina, T. I., Alferova, I. V., & Terekhova, L. P. (1997). A novel approach to isolation of actinomycetes involving irradiation of soil samples with microwaves. *Microbiology* (Vol. 66). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/289119957_A_novel_approach_to_isolation_of_actinomycetes_involving_irradiation_of_soil_samples_with_microwaves
- Bulina, T. I., Terekhova, L. P., & Tyurin, M. V. (1998). Use of electric pulses for selective isolation of actinomycetes from soil. *Microbiology* (Vol. 67). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/298143406_Use_of_electric_pulses_f

or_selective_isolation_of_actinomycetes_from_soil

- Carrano, C. J., Jordan, M., Drechsel, H., Schmid, D. G., & Winkelmann, G. (2001). Heterobactins: A new class of siderophores from *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 containing both hydroxamate and catecholate donor groups. *BioMetals*, 14(2), 119–125. <https://doi.org/10.1023/A:1016633529461>
- Chaudhary, H. S., Yadav, J., Shrivastava, A. R., Singh, S., Singh, A. K., & Gopalan, N. (2013). Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(2), 118–23. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.111528>
- Chien, A., Edgar, D. B., & Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1550–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8432>
- Chong, C., Convey, P., Pearce, D., & Tan, I. K.-P. (2012). *Assessment of soil bacterial communities on Alexander Island (in the maritime and continental Antarctic transitional zone)*. *Polar Biology* (Vol. 35). <https://doi.org/10.1007/s00300-011-1084-0>
- Chun, J. (1995). *Computer Assisted Classification and Identification of Actinomycetes*. Retrieved from <https://theses.ncl.ac.uk/dspace/bitstream/10443/410/1/Chun95.pdf>
- Cooper, G. M. (2000). *The cell : a molecular approach*. ASM Press. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>
- Cowan, D. (2014). *Antarctic terrestrial microbiology : physical and biological properties of Antarctic soils*. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=tGW5BQAAQBAJ&pg=PA305&lpg=PA305&dq=determination+of+conductivity+in+antarctica+soils&source=bl&ots=TkHMaaKIgB&sig=ACfU3U3Js0oTNI3_ZFzyKVZvRqrSHR4h6w&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj90sv8p6XhAhXOuFkKHdb7BKAQ6AEwAHoECAgQAQ#v=
- Cuesta, F., Sevink, J., Llambí LD, De Bièvre, B., & Posner, J. (2014). Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos. *CONDESAN*, 337. Retrieved from <ftp://ftp.puce.edu.ec/Facultades/CienciasExactas/EscuelaCienciasBiologicas/Profesores/Quintana Catalina/Publicaciones/2014 Avances en Investigación para la Conservación de los Páramos Andinos.pdf>
- Curipallo, L., & Rodriguez, C. (2011). *CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BACTERIAS RESPONSABLES DE LA DESCOMPOSICIÓN DE MATERIA ORGÁNICA DURANTE LA FABRICACIÓN DE COMPOST*. Universidad Técnica de Ambato. Retrieved from <http://repo.uta.edu.ec/handle/123456789/830>
- Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of*

- de la Torre, J. R., Goebel, B. M., Friedmann, E. I., & Pace, N. R. (2003). Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3858–67. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3858-3867.2003>
- Deng, S., Chang, X., Zhang, Y., Ren, L., Jiang, F., Qu, Z., & Peng, F. (2015). *Nocardioides antarcticus* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(8), 2615–2621. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000309>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (45). <https://doi.org/10.3791/2565>
- Devi Gurung, T., Sherpa, C., Prasad Agrawal, V., & Lekhak, B. (2010). *Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. Nepal Journal of Science and Technology* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3126/njst.v10i0.2957>
- Dhananjeya, V., Selvan, N., & Dhanapal, K. (2010). Isolation, Characterization, Screening and Antibiotic Sensitivity of Actinomycetes from Locally (Near MCAS) Collected Soil Samples. *Journal of Biological Sciences*, 10(6), 514–519. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.514.519>
- Díaz, A., & Estrada, M. (2018). *Determinación preliminar de producción de compuestos bioactivos de actinomicetes y bacterias aislados de ecosistemas glaciares andinos y antárticos*. Universidad Tecnica de Ambato. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/27508>
- El-Tarabily, K. (2008). *Promotion of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing Streptomyces Actinomycetes*. *Plant and Soil* (Vol. 308). <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9616-2>
- El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2006). Non-streptomyces actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1505–1520. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2005.12.017>
- Encheva, M., Stoyanova, M., Avramova, H., Pavlova, Y., Gocheva, B., Ivanova, I., & Moncheva, P. (2014). Antibacterial potential of streptomyces strains from Antarctic soils. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 28(4), 721–727. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.947066>
- Encheva, M., Zaharieva, N., Kenarova, A., Chipev, N., Chipeva, V., Hristova, P., ... Moncheva, P. (2013). *Agricultural Academy. Bulgarian Journal of Agricultural Science* (Vol. 19). Retrieved from <https://www.agrojournal.org/19/02-16s.pdf>
- Ermolenko, D. N., & Makhatadze, G. I. (2002). Bacterial cold-shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 59(11), 1902–13. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12530521>

- Farfán, J. (2015). BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 788–793. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.11.007>
- Flores, F. J., Rincón, J., & Martín, J. F. (2003). Characterization of the iron-regulated desA promoter of *Streptomyces pilosus* as a system for controlled gene expression in actinomycetes. *Microbial Cell Factories*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-2-5>
- Ganzert, L., Bajerski, F., Mangelsdorf, K., Lipski, A., & Wagner, D. (2011). salt-tolerant and psychrotolerant species from Antarctic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.021022-0>
- Garzón, C. (2013). “ DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA EN ECOSISTEMAS GLACIARES DE LA ANTÁRTIDA ”. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.
- Gauthier, D., Diem, H. G., & Dommergues, Y. (1981). In vitro nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from casuarina nodules. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 306–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16345698>
- Gillis, M., Vandamme, P., Vos, P. De, Swings, J., & Kersters, K. (2015). Polyphasic Taxonomy. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–10). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.bm00021>
- Godsell, J. (1963). Fingerprint Techniques. *Journal of the Forensic Science Society*, 3(2), 79–87. [https://doi.org/10.1016/S0015-7368\(63\)70113-7](https://doi.org/10.1016/S0015-7368(63)70113-7)
- Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H., & Rai, M. (2015). Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(2), 267–89. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0502-7>
- Gomes, R. C., Linhares, A. A., Alviano, C. S., & Linhares, L. F. (1999). Efficiency of the dispersion and differential centrifugation technique in the isolation of chitinolytic actinomycetes from soil. *Microbiologia (Madrid)*, 47–50. <https://doi.org/10.1023/A:1008872208785>
- Goodfellow, M., Zakrzewska-Czerwinska, J., Thomas, E. G., Mordarski, M., Ward, A. C., & James, A. L. (1991). Polyphasic Taxonomic Study of the Genera *Gordona* and *Tsukamurella* Including the Description of *Tsukamurella wratislaviensis* sp. nov. *Zentralblatt Für Bakteriologie*, 275(2), 162–178. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80063-0](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80063-0)
- Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Bandikinda, P., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Rupela, O., ... Varshney, R. K. (2014). Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research*, 169(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.008>
- Gottlieb, D., & Ciferri, O. (1956). Deamination and Degradation of Amino Acids by *Streptomyces*. *Mycologia*, 48(2), 253. <https://doi.org/10.2307/3755473>

- Gupta, P. (2017). Molecular Biology. In Global Media (Ed.), *Molecular Biology and Genetic Engineering: A Comprehensive Review* (pp. 340–350). New Delhi. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3011567&query=molecular+genetic#>
- Gupta, P., Reddy, G. S. N., Delille, D., & Shivaji, S. (2004). *Arthrobacter gangotriensis* sp. nov. and *Arthrobacter kerguelensis* sp. nov. from Antarctica. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 54(6), 2375–2378. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63110-0>
- Hawksworth, D. L. (1995). *Biodiversity measurement and estimation*. Royal Society. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=E0F7zhnx1cgC&pg=PA68&lpg=PA68&dq=A+dispersion+and+differential+centrifugation+technique+for+representative+sampling+microorganisms+from+soil&source=bl&ots=8JKGCJfEvq&sig=bsGr5ymgLfxfkHKS6cYQMPTuNw&hl=es-419&sa=X&ved=2>
- Hayakawa, M., Otaguro, M., Takeuchi, T., Yamazaki, T., & Iimura, Y. (2000). Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(2), 171–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204769>
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2015). GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>
- Hirsch, P., Mevs, U., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., & Stackebrandt, E. (2004). Cryptoendolithic Actinomycetes from Antarctic Sandstone Rock Samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two Isolates Related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(2), 166–174. <https://doi.org/10.1078/072320204322881781>
- Hofstede, R., Segarra, P., Mena, P., & Mena Vásquez, P. (2003). Los Páramos del Mundo, 297. Retrieved from <http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56486.pdf>
- Hogg, S. (2013). *Essential Microbiology*. (Wiley, Ed.). Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1169503&query=MICROBIAL+DIVERSITY#>
- Hopkins, D., Macnaughton, S., & O'Donnell, A. (1991). A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(3), 217–225. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90055-O](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90055-O)
- Hopwood, & Chater, K. (1989). Introductory Chapters—the Diversity of Bacteria and of Bacterial Genetics. In *Genetics of bacterial diversity* (1988th ed., p. 449). Reino Unido: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2013-0-10863-X>
- Hopwood, D., & Chater, K. (2007). Actinomycetes and Antibiotics. In I. Oxford University Press (Ed.), *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic*

- Makers* (pp. 8–20). Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=2012788&query=actinomycetes#>
- Hoskisson, P. A., Sharples, G. P., & Hobbs, G. (2003). The importance of amino acids as carbon sources for *Micromonospora echinospora* (ATCC 15837). *Letters in Applied Microbiology*, *36*, 268–271. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1472-765X.2003.01306.x>
- Hughes, K. A., Cowan, D. A., & Wilmotte, A. (2015). Protection of Antarctic microbial communities - “out of sight, out of mind”. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 151. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00151>
- Ishii, S., & Sadowsky, M. J. (2009a). Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental Microbiology*, *11*(4), 733–740. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01856.x>
- Ishii, S., & Sadowsky, M. J. (2009b). Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental Microbiology*, *11*(4), 733–740. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01856.x>
- Jogaiah, S., Kurjogi, M., Govind, S. R., Huntrike, S. S., Basappa, V. A., & Tran, L.-S. P. (2016). Isolation and evaluation of proteolytic actinomycete isolates as novel inducers of pearl millet downy mildew disease protection. *Scientific Reports*, *6*, 30789. <https://doi.org/10.1038/srep30789>
- Jones, A. L. (2012). The Future of Taxonomy. *Advances in Applied Microbiology*, *80*, 23–35. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394381-1.00002-7>
- Jordanova, N. (2017). Magnetism of soils from the Antarctic Peninsula (pp. 331–347). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809239-2.00007-3>
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of Protein Molecules. In *Mammalian Protein Metabolism* (pp. 21–132). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7>
- Kampfer, P., & Glaeser, S. (2011). *Molecular taxonomic parameters*. Retrieved from <http://www.bergeys.org/index.html>
- Kampfer, P., Lidders, N., Grun-Wollny, I., Martin, K., & Busse, H.-J. (2012). *Nocardia grenadensis* sp. nov., isolated from sand of the Caribbean Sea. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, *62*(Pt 3), 693–697. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030684-0>
- Kensche, P. R., van Noort, V., Dutilh, B. E., & Huynen, M. A. (2008). Practical and theoretical advances in predicting the function of a protein by its phylogenetic distribution. *Journal of the Royal Society, Interface*, *5*(19), 151–70. <https://doi.org/10.1098/rsif.2007.1047>
- Kim, B. (1999). *Polyphasic Taxonomy of Thermophilic*. University of Newcastle upon Tyne, U. K. Retrieved from [https://theses.ncl.ac.uk/dspace/bitstream/10443/1757/1/Kim 99.pdf](https://theses.ncl.ac.uk/dspace/bitstream/10443/1757/1/Kim%2099.pdf)
- Kumar, A., Kumar, A., & Pratush, A. (2014). Molecular diversity and functional

- variability of environmental isolates of *Bacillus* species. *SpringerPlus*, 3(1), 312. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-312>
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, J., Huang, Y., ... Swings, J. (2004). BOX-PCR Fingerprinting as a Powerful Tool to Reveal Synonymous Names in the Genus *Streptomyces*. Emended Descriptions are Proposed for the Species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. pha*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 84–92. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00257>
- Larry L; Barton, & Northup, D. E. (2011). Microbial Ecology. In *Microbial Ecology* (Wiley, pp. 20-50/ 130-135). Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=697468&query=classification+microbial>
- Lautru, S., Deeth, R. J., Bailey, L. M., & Challis, G. L. (2005). Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nature Chemical Biology*, 1(5), 265–269. <https://doi.org/10.1038/nchembio731>
- Lee, H. J., & Whang, K. S. (2016). *Streptomyces rhizosphaerihabitans* sp. nov. and *Streptomyces adustus* sp. nov., isolated from bamboo forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(9), 3573–3578. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001236>
- Lee, J., Postmaster, A., Soon, H. P., Keast, D., & Carson, K. C. (2012). Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. *BioMetals*, 25(2), 285–296. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9503-9>
- Lee, L.-H., Zainal, N., Azman, A.-S., Eng, S.-K., Goh, B.-H., Yin, W.-F., ... Chan, K.-G. (2014). Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 698178. <https://doi.org/10.1155/2014/698178>
- Lewis, C. (2007). Details about Biotechnology. In Global Media (Ed.), *Biotechnology*. Delhi. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3011085&query=Biotechnology>
- Li, J., Tian, X.-P., Zhu, T.-J., Yang, L.-L., & Li, W.-J. (2011). *Streptomyces fildesensis* sp. nov., a novel streptomycete isolated from Antarctic soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(4), 537–543. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9609-7>
- Li, Y. V., Terekhova, L. P., Alferova, I. V., Galatenko, O. A., & Gapochka, M. G. (2003). The Application of Succession Analysis in Combination with EHF Irradiation to the Selective Isolation of Actinomycetes from Soil. *Microbiology*, 72(1), 114–117. <https://doi.org/10.1023/A:1022246610901>
- Li, Y. V., Terekhova, L. P., & Gapochka, M. G. (2002). Isolation of Actinomycetes from Soil Using Extremely High Frequency Radiation. *Microbiology*, 71(1), 105–108. <https://doi.org/10.1023/A:1017962619473>
- Lodish, H. F. (2000). *Molecular cell biology*. W.H. Freeman. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>
- Lorne, T. K. (1993). DNA amplification. In Oxford University Press USA - OSO (Ed.),

- DNA Fingerprinting: An Introduction* (p. 300). New York. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3051933>
- Martiny, J. B. H., Jones, S. E., Lennon, J. T., & Martiny, A. C. (2015). Microbiomes in light of traits: A phylogenetic perspective. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6261), aac9323. <https://doi.org/10.1126/science.aac9323>
- Midigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Biología de los Microorganismos BROCK.pdf* (10th ed.).
- Miller, R. V., & Whyte, L. (2011). Microbial diversity. In ASM Press (Ed.), *Polar Microbiology: Life in a Deep Freeze* (p. 320). USA. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3002497&query=Microbial+Life+in+Supraglacial+Environments+>
- Minotto, E., Pasqualini, L., Trindade, M., & Van Der Sand, T. (2014). Journal of Advanced Scientific Research ENZYME CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM TOMATO PLANTS. *Journal of Advanced Scientific Research*, 5(2), 16–23. Retrieved from <http://www.sciensage.info/jasr>
- Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Antonova-Nikolova, S., & Bogatzevska, N. (2000). *CHARACTERISTICS OF SOIL ACTINOMYCETES FROM ANTARCTICA. JOURNAL OF CULTURE COLLECTIONS* (Vol. 3). Retrieved from <http://nbimcc.org/JCC/2002/JCC31.pdf>
- Mukai, A., Komaki, H., Takagi, M., & Shin-ya, K. (2009). Novel siderophore, JBIR-16, isolated from *Nocardia tenerifensis* NBRC 101015. *The Journal of Antibiotics*, 62(10), 601–603. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.84>
- Nassar, A. H., El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2003). Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. *Plant Growth Regulation*, 40(2), 97–106. <https://doi.org/10.1023/A:1024233303526>
- Navas, D. (2016). *Caracterización Molecular de Actinomicetes Provenientes de Ecosistemas Antárticos*. Universidad Tecnica de Ambato.
- Nopnakorn, P., & Nopnakorn, P. (2011). *Polar Actinomycetes and Their Secondary Metabolites. Journal of Natural Sciences Research* (Vol. 8). International Institute for Science, Technology and Education (IISTE). Retrieved from <https://www.iiste.org/Journals/index.php/JNSR/article/view/42533>
- Pathalam, G., Rajendran, H. A. D., Appadurai, D. R., Gandhi, M. R., Michael, G. P., Savarimuthu, I., & Naif, A. A.-D. (2017). Isolation and molecular characterization of actinomycetes with antimicrobial and mosquito larvicidal properties. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/J.BJBAS.2017.04.002>
- Patzer, S. I., & Braun, V. (2010). Gene Cluster Involved in the Biosynthesis of Griseobactin, a Catechol-Peptide Siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. *Journal of Bacteriology*, 192(2), 426–435. <https://doi.org/10.1128/JB.01250-09>

- Perfumo, A., Banat, I. M., & Marchant, R. (2018). Going Green and Cold: Biosurfactants from Low-Temperature Environments to Biotechnology Applications. *Trends in Biotechnology*, 36(3), 277–289. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2017.10.016>
- Phadtare, S., Tadigotla, V., Shin, W.-H., Sengupta, A., & Severinov, K. (2006). Analysis of *Escherichia coli* global gene expression profiles in response to overexpression and deletion of CspC and CspE. *Journal of Bacteriology*, 188(7), 2521–7. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2521-2527.2006>
- Popping, B., Diaz, C., & Hoenick, K. (2010). Molecular biological techniques explained. In Wiley (Ed.), *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists* (pp. 1–20). United States of America. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=510099&query=pcr+methods#>
- Prabahar, V., Dube, S., Reddy, G. S. N., & Shivaji, S. (2004). *Pseudonocardia antarctica* sp. nov. an Actinomycetes from McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 66–71. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00249>
- Rampadarath, S., Puchooa, D., & Bal, S. (2015). Repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) as a genetic tool to study interspecific diversity in Euphorbiaceae family. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 412–417. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2015.09.003>
- Rohlf. (1988). *NTSYS-pc - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Applied Biostatistics Inc. New York (Vol. 2.1). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/246982444_NTSYS-pc_-_Numerical_Taxonomy_and_Multivariate_Analysis_System
- Rohlf, F. J. (2013). Taxonomy, Numerical. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 26–29). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01519-9>
- Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Javid, M. G., Dalvand, Y., & Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1503–1509. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0952-7>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487–91. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.239.4839.487>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sanders, S. (2007). PCR Collection. *Science AAAS*, 1, 34. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/collections/pcr-collection>
- Schleifer, K. H., & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36(4), 407–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4568761>

- Sharma, M., Dangi, P., & Choudhary, M. (2014). Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(2), 801–832. Retrieved from [https://www.ijcmas.com/vol-3-2/Mukesh Sharma.pdf](https://www.ijcmas.com/vol-3-2/Mukesh%20Sharma.pdf)
- Shrivastava, S., D'Souza, S., & D. Desai, P. (2008). *Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycetes (Kitasatospora Sp.) for soil application*. *Curr. Sci.* (Vol. 94).
- Silva, C., Santos, A., Salazar, R., Lamilla, C., Pavez, B., Meza, P., ... Barrientos, L. (2019). Evaluation of dye sensitized solar cells based on a pigment obtained from Antarctic *Streptomyces fildesensis*. *Solar Energy*, 181, 379–385. <https://doi.org/10.1016/J.SOLENER.2019.01.035>
- Singh, O. (2012). Extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications. In Wiley (Ed.), *Extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications* (pp. 30–40). United States of America. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=947707#>
- Singh, S., & Nain, L. (2014). Microorganisms in the Conversion of Agricultural Wastes to Compost. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 80(2), 473–481. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/7>
- Smith, C., Dietz, A., Sokolski, W., & Savage, G. (1956). Streptonivicin, a new antibiotic. I. Discovery and biologic studies. *Antibiotics & Chemotherapy (Northfield, Ill.)*, 6(2), 135–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24543916>
- Soltanzadeh, M., Soltani Nejad, M., & Shahidi Bonjar, G. H. (2016). Application of Soil-borne Actinomycetes for Biological Control against Fusarium Wilt of Chickpea (*Cicer arietinum*) caused by *Fusarium solani* fsp pisi. *Journal of Phytopathology*, 164(11–12), 967–978. <https://doi.org/10.1111/jph.12517>
- Srivastava, R. (2015). Bacterial Diversity. In Global Media (Ed.), *Ecology and Biodiversity* (p. 265). New Delhi. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3011499&query=BACTERIAL+DIVERSITY#>
- Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006). Taxonomic reportes. *Microbiology Today*. Retrieved from www.vhbio.com
- Thompson, C. C., Chimetto, L., Edwards, R. A., Swings, J., Stackebrandt, E., & Thompson, F. L. (2013). Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics*, 14, 913. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-913>
- Timmis, K., de Vos, W. M., Luis Ramos, J., Vlaeminck, S. E., Prieto, A., Danchin, A., ... Singh, B. K. (2017). The contribution of microbial biotechnology to sustainable development goals. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 984–987. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12818>
- Torrey, J. G. (1978). *Nitrogen Fixation by Actinomycete-Nodulated Angiosperms* (Vol. 28). Retrieved from https://harvardforest.fas.harvard.edu/sites/harvardforest.fas.harvard.edu/files/publications/pdfs/Torrey_BioScience_1978.pdf

- Tresner, H. D., Hayes, J. A., & Backus, E. J. (1969). STREPTOMYCES WISTARIOPSIS SP. NOV., *19*(2), 141–152.
- Valencia, R., & Gómez, L. (2012). Caracterización molecular de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* protocolos rep-PCR. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *13*, 196–200.
- van Belkum, A., & Hermans, P. W. M. (2001). BOX PCR Fingerprinting for Molecular Typing of *Streptococcus pneumoniae*. In *Antibiotic Resistance Methods and Protocols* (pp. 159–168). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-077-2:159>
- Van Hop, D., Sakiyama, Y., Thi, C., Binh, T., Otaguro, M., Hang, D. T., ... Ando, K. (2011). Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. *The Journal of Antibiotics*, *64*, 599–606. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.40>
- Villacís, J. (2015). *Diversidad biológica y metabólica de actinomicetes aislados de suelo y arena de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo*. Universidad Técnica de Ambato.
- Vinueza, G., & Rodríguez, C. (2010). *Determinación de la relación entre la caracterización fenotípica y genotípica de actinomicetes como mecanismo de dereplicación de microorganismos útiles en biotecnología*. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/412/browse?type=author&order=ASC&rpp=20&value=Vinueza+Villarés%2C+Adriana+Gabriela>
- Waksman, S. (1979). *culturas studies of especies of actinomyces REVISAR.pdf*.
- Watve, M., Tickoo, R., Jog, M., & Bhole, B. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, *176*(5), 386–390. <https://doi.org/10.1007/s002030100345>
- Williams, S. T., & Cross, T. (1971). *Actinomycetes. Methods in Microbiology* (Vol. 4). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(09\)70016-9](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(09)70016-9)
- Williams, S. T., Locci, R., Beswick, A., Kurtböke, D. I., Kuznetsov, V. D., Le Monnier, F. J., ... West, M. (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. *Research in Microbiology*, *144*(8), 653–656. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(93\)90069-E](https://doi.org/10.1016/0923-2508(93)90069-E)
- Wink, J. M. (2019). *Compendium of Actinobacteria*. Retrieved from https://www.dsmz.de/microorganisms/wink_pdf/DSM40088.pdf
- Xu, L., Li, Q., & Jiang, C. (1996). Diversity of soil actinomycetes in yunnan, china. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(1), 244–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535212>
- You, K., & Park, Y. (1996). A new method for the selective isolation of actinomycetes from soil. *Biotechnology Techniques*, *10*(7), 541–546. <https://doi.org/10.1007/BF00159521>

ANEXOS

Anexo A. Información del origen de las muestras de suelo

Tabla A1. Origen y características de la muestra de suelo Cerro Puyango

Año	Origen	Lugar	Características	Código de origen	Tipo	Código Asignado
2010	Antártida	Isla Greenwich	Cerro Puyango	ANT-001 ANT-002 ANT-016 ANT-017	Suelo	MS-013

Tabla A2. Detalle del origen, codificación y características de las muestras de suelo extraídas en investigaciones anteriores

Código recibido	Código asignado	Origen de la muestra	ID de la muestra de suelo	Medio de aislamiento	Temperatura (°C)
CA1.025	JD-025	Chimborazo	A1	AAC	26
CA1.026	JD-026	Chimborazo	A1	AAC	26
CA1.027	JD-027	Chimborazo	A1	AAC	26
CA1.028	JD-028	Chimborazo	A1	AAC	26
CA1.030	JD-030	Chimborazo	A1	AAC	26
CA1.031	JD-031	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.032	JD-032	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.033	JD-033	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.034	JD-034	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.035	JD-035	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.037	JD-037	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.038	JD-038	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.039	JD-039	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.043	JD-043	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.044	JD-044	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.045	JD-045	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.046	JD-046	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.048	JD-048	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.052	JD-052	Chimborazo	A1	AAC	26
CA2.058	JD-058	Chimborazo	A1	AAC	26
DW001	JV-001	Antártida	Suelo	AAC	26
DW 002	JV-002	Antártida	Suelo	AAC	26
DW 003	JV-003	Antártida	Suelo	AAC	26
DW 004	JV-004	Antártida	Suelo	AAC	26
DW 005	JV-005	Antártida	Suelo	AAC	26
DW 007	JV-007	Antártida	Suelo	AAC	26
DW 008	JV-008	Antártida	Suelo	AAC	26
DW 009	JV-009	Antártida	Suelo	AAC	26
DW 010	JV-010	Antártida	Suelo	AAC	26

Tabla A2. (Continuación)

DW 011	JV-011	Antártida	Suelo	AAC	26
DW 012	JV-012	Antártida	Suelo	AAC	26
DW 013	JV-013	Antártida	Suelo	AAC	26
DW 021	JV-021	Chimborazo	A1	AAC	26
DW 025	JV-025	Chimborazo	A1	AAC	26
DW 026	JV-026	Chimborazo	A1	AAC	26
DW 027	JV-027	Chimborazo	A2	AAC	26
DW 033	JV-033	Antártida	Suelo	AAV	26
DW 035	JV-035	Antártida	Suelo	AAV	26
DW 037	JV-037	Antártida	Suelo	AAV	26
DW 038	JV-038	Antártida	Suelo	AAV	26
DW 042	JV-042	Chimborazo	A1	AAV	26
DW 045	JV-045	Chimborazo	A1	AAV	26
DW 047	JV-047	Chimborazo	A2	AAV	26
S10.001	JD-001	Chimborazo	A1	AAV	26
S10.002	JD-002	Chimborazo	A1	AAV	26
S10.003	JD-003	Chimborazo	A1	AAV	26
S10.004	JD-004	Chimborazo	A1	AAV	26
S10.012	JD-012	Chimborazo	A1	AAV	26
S10.014	JD-014	Chimborazo	A1	AAV	26
S10.015	JD-015	Chimborazo	A1	AAV	26
S10.019	JD-019	Chimborazo	A1	AAV	26
S10.020	JD-020	Chimborazo	A1	AAV	26
S10.025	JS-025	Chimborazo	A1	AAV	26
CA2.050	JD-050	Chimborazo	A1	AAV	26
CA2.053	JD-053	Chimborazo	A1	AAV	26
DW.015	JV-015	Antártida	Suelo	AAC	26
DW. 029	JV-029	Antártida	A1	AAC	26
DW. 034	JV-034	Antártida	Suelo	AAV	26
DW. 043	JV-043	Antártida	A1	AAV	26
S10.013	JD-013	Antártida	Suelo	AAV	26
DW022	JV-022	Chimborazo	A1	AAC	26
DE003	DE-003	Chimborazo	CH0	AS	26
DE004	DE-004	Chimborazo	CH2	AS	26
DE006	DE-006	Chimborazo	CH2	AS	26
DE007	DE-007	Chimborazo	CH2	AS	26
DE008	DE-008	Chimborazo	CH2	AS	26
DE009	DE-009	Cotopaxi	CX3	AS	26
DE011	DE-011	Chimborazo	CH1	AS	26
DE013	DE-013	Chimborazo	CH0	AS	26
DE014	DE-014	Chimborazo	CH2	AV	26
DE015	DE-015	Chimborazo	CH2	AV	26
DE019	DE-019	Chimborazo	CH2	AS	26
DE020	DE-020	Chimborazo	CH2	GYM	26
DE022	DE-022	Chimborazo	CH0	GYM	26

Tabla A2. (Continuación)

DE023	DE-023	Chimborazo	CH0	GYM	26
DE025	DE-025	Chimborazo	CH0	AV	26
DE027	DE-027	Chimborazo	CH3	GYM	26
DE029	DE-029	Chimborazo	CH3	GYM	26
DE030	DE-030	Cotopaxi	CX1	GYM	26
DE032	DE-032	Chimborazo	CH3	GYM	26
DE033	DE-033	Chimborazo	CH2	AV	26
DE034	DE-034	Chimborazo	CH2	AV	26
DE036	DE-036	Cotopaxi	CX2	AV	26
DE037	DE-037	Cotopaxi	CX3	AV	26
DE038	DE-038	Chimborazo	CH0	AC	26
DE039	DE-039	Chimborazo	CH1	AC	26
DE040	DE-040	Chimborazo	CH3	AV	26
DE049	DE-049	Chimborazo	CH0	GYM	8
DE051	DE-051	Chimborazo	CH2	AV	8
DE052	DE-052	Chimborazo	CH2	AV	8
DE054	DE-054	Chimborazo	CH2	AS	8
DE055	DE-055	Chimborazo	CH2	AS	8
DE056	DE-056	Chimborazo	CH0	GYM	8
DE057	DE-057	Chimborazo	CH0	GYM	8
DE058	DE-058	Chimborazo	CH0	GYM	8
DE059	DE-059	Chimborazo	CH0	GYM	8
DE060	DE-060	Antártida	CA	AS	8
DE063	DE-063	Chimborazo	CH0	AS	8
DE064	DE-064	Chimborazo	CH3	AS	8
DE065	DE-065	Chimborazo	CH0	GYM	26
DE067	DE-067	Cotopaxi	CX3	AV	26
DE068	DE-068	Antártida	CA	GYM	26
DE069	DE-069	Chimborazo	CH0	GYM	26
DE070	DE-070	Chimborazo	CH0	GYM	26
DE071	DE-071	Chimborazo	CH0	GYM	26
DE073	DE-073	Cotopaxi	CX3	AV	26
DE074	DE-074	Cotopaxi	CX3	AC	26
DE075	DE-075	Antártida	CA	GYM	26
DE076	DE-076	Chimborazo	CH3	AC	26
DE010	DE-010	Chimborazo	CH2	AS	26
DE012	DE012	Chimborazo	CH0	AS	26
DE031	DE-031	Chimborazo	CH3	GYM	26
DE042	DE-042	Cotopaxi	CX1	GYM	26
DE061	DE-061	Chimborazo	CH0	AV	8
DE078	DE-078	Cotopaxi	CX3	AC	26
DE079	DE-079	Cotopaxi	CX3	AC	26
DE080	DE-080	Antártida	CA	AC	8
DE081	DE-081	Cotopaxi	CX1	AC	8
DE082	DE-082	Cotopaxi	CX2	AS	26

Tabla A2. (Continuación)

DE083	DE-083	Cotopaxi	CX3	AS	26
DE084	DE-084	Cotopaxi	CX2	AS	26
DE085	DE-085	Chimborazo	CH3	AS	26
DE088	DE-088	Cotopaxi	CX0	AS	26
DE002	DE-002	Chimborazo	CH0	AS	26
DE018	DE-018	Chimborazo	CH2	GYM	26
DE021	DE-021	Cotopaxi	CX3	GYM	26
DE041	DE-041	Chimborazo	CH3	AV	26
DE044	DE-044	Chimborazo	CH2	AV	8
DE045	DE-045	Chimborazo	CH3	AV	8
DE062	DE-062	Chimborazo	CH3	AS	8
DE035	DE-035	Chimborazo	CH3	AV	26
DE053	DE-053	Chimborazo	CH0	AV	8
DE024	DE-024	Chimborazo	CH0	GYM	26
DE047	DE-047	Chimborazo	CH2	AC	8
DG106	DG-106	Antártida	Suelo	AN	26
DG139	DG-139	Antártida	Suelo	WA	26
DG148	DG-148	Antártida	Suelo	WA	26
DG161	DG-161	Antártida	Suelo	WA	26
BCL027	BCL-027	Puyango	MS-013	CRA	20
BCL004	BCL-004	Puyango	MS-013	CRA	20
BCL005	BCL-005	Puyango	MS-013	CRA	20
BCL006	BCL-006	Puyango	MS-013	AAC	20
ATL050	ATL-050	Puyango	MS-013	AAC	20
BCL003	BCL-003	Puyango	MS-013	CRA	20
BCL018	BCL-018	Puyango	MS-013	AAC	20
ATD011	ATD-011	Puyango	MS-013	AAC	20
ATL016	ATL-016	Puyango	MS-013	AAC	20
BCE030	BCE-030	Puyango	MS-013	AAC	20
BCE014	BCE-014	Puyango	MS-013	AAC	20
ATD005B	ATD-005B	Puyango	MS-013	AAC	20
BCL015	BCL-015	Puyango	MS-013	AAC	20
ATD018	ATD-018	Puyango	MS-013	AAC	20

(Díaz & Estrada, 2018; Villacís, 2015)

Anexo B. Medios de cultivo y soluciones

Tabla B1. Solución Tris búfer

Ingrediente	Cantidad
Tris HCL 1M	10 mL
EDTA 0,5M	2 mL
Agua destilada	1000 mL

Tabla B2. Solución de sistema de búfers

pH	0,1M Ácido cítrico (mL)	0,2M Na₂HPO₄ (mL)
2,6	89,10	10,90
3	79,45	20,55
3,5	69,75	30,25
4	61,45	38,55
4,5	54,57	45,43
5	48,50	51,50
5,5	43,13	56,87
6	36,85	63,15
6,5	29,04	70,96
7	17,65	82,35
7,5	7,62	92,38

Tabla B3. Agar aminoácidos (CRA) (pH 5,5)

Ingrediente	Cantidad
Solución de sales traza*	1,0 mL
Ácido aspártico	1,0 g
Ácido glutámico	1,0 g
Sucrosa	10 g
K ₂ HPO ₄ ó KH ₂ PO ₄	4,0 g
CaCO ₃	0,5 g
Bacto Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico se tindalizarán a 100°C por 30 minutos, 3 veces consecutivas.

Tabla B4. Agar almidón caseína (AAC) (pH 5,5 y pH 6,5)

Ingrediente	Cantidad
Almidón soluble	10,0 g
Caseína libre de vitaminas	0,30 g
KNO ₃	2,00 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,05 g
K ₂ HPO ₄	2,00 g
CaCO ₃	0,02 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,01 g
Bacto Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 mL

Los ingredientes MgSO₄*7H₂O y FeSO₄*7H₂O pueden ser reemplazados por 1 mL de solución sales traza.

Tabla B5. Agar glucosa, extracto de levadura y malta (GYM)

Ingrediente	Cantidad
Extracto de malta	10,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Glucosa	4,00 g
Carbonato de Calcio (CaCO ₃)	2,00 g
Bacto Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 mL

Tabla B6. Agar avena (AV)

Ingrediente	Cantidad
Solución sales traza	1 mL
Avena	20,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 L

Tabla B7. Búfer TE 1X

Ingrediente	Cantidad (mM)
Tris HCL pH 8	10
EDTA pH 8	1

Tabla B8. Agar no esporulante (ANE)

Ingrediente	Cantidad
Cas aminoácidos	20,0 g
Almidón soluble	20,0 g
Extracto de levadura	4,00 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 mL

Tabla B9. Búfer de extracción de ADN

Ingrediente	Concentración (mM)
Glucosa	50
Tris HCL pH 8	25
EDTA	10

Tabla B10. Búfer TBE 10X

Ingrediente	Cantidad
Tris Base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA pH 8	7,4 g
Agua destilada	1000 mL

Tabla B11. Agar medio basal para fuente de carbono y nitrógeno

Ingrediente	Cantidad
Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4)	0,5 g
Solución sales traza*	1,0 mL
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 mL

Tabla B12. Agar medio basal para fuente única de nitrógeno

Ingrediente	Cantidad
Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4)	0,5 g
Solución sales traza	1,0 mL
Solución base de nitrógeno, levadura y cas-aminoácidos (10X)	6,0 mL
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 mL

Tabla B13. Solución base de nitrógeno, levadura y cas-aminoácidos (10X)

Ingrediente	Cantidad
Base de nitrógeno	67 g
Cas-aminoácidos	100 mg
Agua destilada	1000 mL

Tabla B14. Solución sales traza

Ingrediente	Cantidad
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	100 mg
$CuSO_4 \cdot 4H_2O$	100 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	100 mg
Agua destilada	100 mL

Anexo C. Aislamiento microbiano

Tabla C1. Número de colonias aisladas de actinomicetes por el método DDC

Medios de cultivo	Fracción	Dilución	Número de colonias
CRA (pH 5,5)	S ₁	10 E-1	9
		10 E-2	0
	S ₂₋₄	10 E-1	1
		10 E-2	0
	S ₃	10 E-1	8
		10 E-2	0
	R	10 E-2	0
		10 E-3	0
ACC (pH 5,5)	S ₁	10 E-1	8
		10 E-2	0
	S ₂₋₄	10 E-1	0
		10 E-2	0
	S ₃	10 E-1	7
		10 E-2	2
	R	10 E-2	1
		10 E-3	0
ACC (pH 6,5)	S ₁	10 E-1	8
		10 E-2	0
	S ₂₋₄	10 E-1	0
		10 E-2	0
	S ₃	10 E-1	4
		10 E-2	0
	R	10 E-2	1
		10 E-3	0

Tabla C2. Número de colonias aisladas de actinomicetes por el método tradicional

Medios	Dilución	Colonias	Ufc/g de suelo seco
CRA	10 E-1	17	-
	10 E-2	5	-
	10 E-3	1	-
AAC	10 E-1	28	5,60 x 10 ³
	10 E-2	13	-
	10 E-3	0	-

Tabla C3. Codificación de actinomicetes aislados de la muestra MS-013

Código	Método de aislamiento	Medio de cultivo	Fracción	Temperatura de incubación (°C)	Dilución	pH del medio de cultivo
BCE-002	DDC	CRA	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCE-003*	DDC	CRA	S ₃	20	10 E-1	5,5
BCE-004*	DDC	CRA	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCE-007*	DDC	CRA	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCE-009	DDC	CRA	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCE-010*	DDC	AAC	R	20	10 E-2	6,5
BCE-011	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCE-012*	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCE-013	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCE-014	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCE-015*	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCE-016*	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCE-017	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCE-018	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCE-019	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCE-020*	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	5,5
BCE-021	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	5,5
BCE-022	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCE-027	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	5,5
BCL-002	DDC	CRA	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCL-003	DDC	CRA	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCL-004	DDC	CRA	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCL-005	DDC	CRA	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCL-06	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCL-007	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCL-008*	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCL-009*	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	6,5
BCL-010*	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCL-011	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCL-012	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCL-013	DDC	CRA	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCL-014	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCL-015	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCL-016	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	6,5
BCL-017	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCL-018	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	5,5

Tabla C3 (Continuación)

BCL-019*	DDC	CRA	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCL-020*	DDC	CRA	S ₃	20	10 E-1	6,5
BCL-021	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	5,5
BCL-022*	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	5,5
BCL-023*	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	5,5
BCL-024	DDC	CRA	S ₂₋₄	20	10 E-1	5,5
BCL-026*	DDC	CRA	S ₃	20	10 E-1	5,5
BCL-027	DDC	CRA	S ₃	20	10 E-1	5,5
BCL-028	DDC	AAC	S ₁	20	10 E-1	5,5
BCL-029	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-1	5,5
BCL-030	DDC	AAC	S ₃	20	10 E-2	5,5
BCD-002*	DDC	ACC	S ₁	20	10 E-1	6,5
BCD-008*	DDC	ACC	S ₃	20	10 E-1	5,5
BCD-024*	DDC	ACC	S ₁	20	10 E-2	6,5
ATD-006	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATD-011	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATD-013	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATD-014	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATD-015	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATD-016*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATD-018	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATD-031	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATD-032	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATD-033	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATE-014	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATE-015	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATE-018*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATE-019	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATE-021*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-005	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-006	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-007*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-008	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-010	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-011	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-012	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-015	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-016	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-017	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-018	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-019	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-020	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-021	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-

Tabla C3.(Continuación)

ATL-022	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-023	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-024	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-025	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-026	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-027	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-029	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-030*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-031	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-032*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-2	-
ATL-033*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-2	-
ATL-034*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-2	-
ATL-035*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-2	-
ATL-036*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-2	-
ATL-040	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-041*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-042	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-043	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-044	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-045	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-046*	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-047	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-048	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-049	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-050	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-051	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-052	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-053	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-054*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-1	-
ATL-055*	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-056	Tradicional	CRA	-	20	10 E-1	-
ATL-057*	Tradicional	CRA	-	20	10 E-2	-
ATL-059*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-2	-
ATL-060*	Tradicional	AAC	-	20	10 E-2	-

*Cepas de actinomicetes eliminadas por contaminación.

Anexo D. Técnicas de biología molecular

Tabla D1. Cuantificación de ADN genómico de actinomicetes [ADN] (ng/μL)

Código Recibido	Código Asignado	Extracción por kit comercial			Extracción por fenol cloroformo		
		[ADN] ng/μL	260/230	260/280	[ADN] ng/μL	260/230	260/280
CA1.025	JD-025*	-	-	-	255,43	1,91	1,18
CA1.026	JD-026	-	-	-	170,27	1,22	1,81
CA1.027	JD-027	-	-	-	47,20	0,57	1,40
CA1.028	JD-028*	-	-	-	933,8	2,01	1,62
CA1.029	JD-029*	-	-	-	216,53	2,09	1,6
CA1.030	JD-030	-	-	-	125,80	1,92	2,10
CA1.031	JD-031	241,50	1,01	1,81	83,70	1,38	1,94
CA2.032	JD-032	-	-	-	57,77	3,88	2,12
CA2.033	JD-033	-	-	-	227,50	2,12	2,11
CA2.034	JD-034	61,10	2,85	1,81	79,37	1,96	1,98
CA2.035	JD-035	-	-	-	59,20	0,55	1,39
CA2.037	JD-037*	-	-	-	664,53	1,93	1,42
CA2.038	JD-038*	-	-	-	238,90	1,98	1,64
CA2.039	JD-039	31,33	1,09	1,57	-	-	-
CA2.043	JD-043*	-	-	-	138,10	2,02	1,74
CA2.044	JD-044	49,23	6,26	1,82	27,17	1,27	1,81
CA2.045	JD-045	16,50	2,70	1,65	66,83	2,63	2,07
CA2.046	JD-046*	-	-	-	492,6	2,02	1,8
CA2.048	JD-048	-	-	-	54,03	7,44	1,99
CA2.052	JD-052	95,43	1,84	1,76	28,33	1,88	1,89
CA2.058	JD-058	-	-	-	71,03	2,87	2,12
DW001	JV-001	17,07	5,97	1,45	166,10	2,63	2,13
DW 002	JV-002	11,27	0,52	1,39	136,73	2,07	2,11
DW 003	JV-003	9,53	0,64	1,33	96,83	2,28	2,03
DW 004	JV-004	12,97	6,83	1,22	68,13	4,49	2,08
DW 005	JV-005*	-	-	-	132,43	2,07	1,76
DW 007	JV-007*	-	-	-	155	2,08	1,87
DW 008	JV-008*	-	-	-	166,93	2,00	1,56
DW 009	JV-009	10,37	1,64	1,52	240,70	0,60	2,10
DW 010	JV-010	13,30	0,48	1,46	126,50	1,03	2,06
DW 011	JV-011*	-	-	-	8,67	1,73	0,85
DW 012	JV-012	-	-	-	428,93	2,14	2,11
DW 013	JV-013	-	-	-	167,07	2,48	2,12
DW 021	JV-021	-	-	-	38,97	2,71	1,94
DW 022	JV-022*	-	-	-	109,73	1,83	0,97
DW 025	JV-025	10,87	1,80	1,31	35,73	11,39	2,07
DW 026	JV-026	-	-	-	99,20	3,01	2,11
DW 027	JV-027	-	-	-	237,43	2,18	2,11
DW 033	JV-033	11,90	3,99	1,48	188,80	2,68	2,15
DW 035	JV-035	61,10	11,27	1,82	79,63	2,74	1,98
DW 037	JV-037*	-	-	-	34,27	1,54	0,8
DW 038	JV-038	22,90	0,54	1,39	38,47	0,49	1,40
DW 042	JV-042	26,73	7,73	1,60	-	-	-
DW 045	JV-045	33,93	2,69	1,71	55,53	0,62	1,43
DW 047	JV-047	-	-	-	65,35	3,33	1,74

Tabla D1. (Continuación)

S10 001	JD-001*	-	-	-	29,7	2,02	2,6
S10.002	JD-002	-	-	-	53,17	2,52	1,90
S10.003	JD-003	-	-	-	97,73	1,21	2,10
S10.004	JD-004*	-	-	-	47,27	1,52	0,71
S10 012	JD-012*	-	-	-	94,60	2,04	1,95
S10 013	JD-013*	-	-	-	1274,47	1,71	0,76
S10.014	JD-014	-	-	-	137,00	4,05	2,12
S10.015	JD-015	20,07	0,92	1,47	38,53	6,39	2,14
S10.019	JD-019	-	-	-	-	-	-
S10 020	JD-020*	-	-	-	431,5	2,07	2,74
S10.025	JS-025	116,85	0,34	1,44	158,97	1,01	1,54
CA2.050	JD-050	97,17	2,75	2,11	-	-	-
DW.015	JV-015	17,43	2,71	1,90	-	-	-
DW. 029	JV-029	65,70	4,08	2,13	-	-	-
DW 034	JV-034*	-	-	-	81,3	2,09	2,73
DW. 043	JV-043	70,27	4,58	2,11	-	-	-
DE002	DE-002	8,60	0,35	1,25	10,33	48,41	1,89
DE003	DE-003	16,57	1,38	1,39	18,40	7,65	1,71
DE004	DE-004	12,53	1,75	1,09	43,20	9,02	1,80
DE006	DE-006	12,90	1,16	1,28	7,17	0,87	1,75
DE007	DE-007	83,50	16,03	1,78	92,23	1,68	1,75
DE008	DE-008	186,00	2,69	1,81	386,27	0,73	1,52
DE009	DE-009	11,87	0,69	1,35	9,37	1,23	1,33
DE010	DE-010	13,60	0,99	1,32	199,07	2,09	2,01
DE011	DE-011	35,97	2,67	1,55	68,53	2,19	1,77
DE012	DE-012*	20,93	3,96	1,29	345,1	1,86	1,24
DE013	DE-013	13,23	0,48	1,54	5,73	13,66	1,48
DE014	DE-014	7,73	0,29	1,21	11,50	2,99	1,71
DE015	DE-015	13,50	0,41	1,71	28,33	1,85	1,85
DE018	DE-018	15,33	0,76	1,34	10,53	8,16	1,72
DE019	DE-019	9,40	0,39	1,11	8,53	1,84	2,02
DE020	DE-020	34,77	1,79	1,75	39,70	2,99	1,98
DE021	DE-021	20,17	0,66	1,76	13,97	2,65	1,91
DE022	DE-022	6,07	0,21	1,44	4,40	0,47	1,67
DE023	DE-023	4,27	0,12	1,29	162,63	2,05	1,92
DE024	DE-024	3,80	0,11	1,20	13,57	1,20	1,69
DE025	DE-025	4,10	0,12	1,36	75,47	2,44	2,08
DE026	DE-026	5,27	0,16	1,40	39,33	1,78	1,90
DE027	DE-027	12,73	0,59	1,43	207,10	2,23	1,90
DE029	DE-029	10,87	0,43	1,34	69,57	2,47	2,12
DE030	DE-030	7,37	0,32	1,22	34,63	2,52	2,10
DE031	DE-031	65,77	9,35	1,81	3,20	0,88	1,63
DE032	DE-032	2,10	0,06	0,65	2,47	1,85	1,15
DE033	DE-033	10,53	0,40	1,38	31,90	6,00	1,63
DE034	DE-034	3,87	0,11	0,99	23,27	3,87	1,92
DE035	DE-035	51,37	5,18	1,69	98,50	2,28	2,03
DE036	DE-036	3,90	0,12	1,01	2,70	1,28	1,05
DE037	DE-037	104,83	5,78	1,76	145,60	2,30	2,04
DE038	DE-038	3,40	0,10	0,90	28,80	2,83	1,90
DE039	DE-039	50,97	6,23	1,72	3,87	12,83	1,27
DE040	DE-040	6,50	0,20	1,09	10,57	6,06	1,70
DE041	DE-041	17,47	0,65	1,53	34,40	2,20	1,88
DE042	DE-042*	114,80	2,60	1,78	275,3	2,07	2,22

Tabla D1. (Continuación)

DE044	DE-044	1,20	0,03	0,66	14,27	0,68	1,71
DE045	DE0-45	13,63	0,09	1,35	2,37	0,30	1,21
DE047	DE-047	10,63	0,40	1,45	44,57	2,17	1,95
DE049	DE-049	7,93	0,41	1,11	3,87	0,94	1,37
DE051	DE-051	11,33	0,42	1,46	39,87	3,41	1,79
DE052	DE-052	12,67	0,44	1,45	24,77	2,56	1,83
DE053	DE-053	13,90	0,46	1,44	23,63	2,35	1,78
DE054	DE-054	6,53	0,45	1,01	-	-	-
DE055	DE-055	4,33	0,13	1,36	42,67	1,83	1,77
DE056	DE-056	7,03	0,26	1,11	13,77	1,17	1,68
DE057	DE-057	7,40	0,38	1,07	19,23	5,54	1,97
DE058	DE-058	5,27	0,17	1,18	4,63	7,16	1,79
DE059	DE-059	7,07	0,24	1,20	62,83	1,35	1,86
DE060	DE-060	15,40	0,56	1,44	45,93	2,07	1,94
DE061	DE-061	6,73	0,25	1,12	5,00	57,02	1,72
DE062	DE-062	8,03	0,32	1,18	17,47	1,10	1,70
DE063	DE-063	4,47	0,13	1,12	16,97	3,41	1,96
DE064	DE-064	4,87	0,15	1,10	21,17	7,49	1,84
DE065	DE-065	7,20	0,27	1,12	57,70	2,06	1,88
DE067	DE-067	12,50	0,47	1,39	30,33	1,77	1,69
DE068	DE-068	92,40	4,76	1,76	214,17	1,67	1,84
DE069	DE-069	46,03	4,46	1,72	102,80	0,65	1,48
DE070	DE-070	16,40	0,59	1,60	33,57	0,88	1,60
DE071	DE-071	20,60	0,84	1,58	15,80	45,07	1,76
DE073	DE-073	15,57	0,54	1,55	9,67	4,58	1,56
DE074	DE-074	14,87	0,49	1,60	57,17	0,84	1,69
DE075	DE-075	14,17	3,02	1,25	6,57	0,83	1,34
DE076	DE-076	23,93	0,43	1,07	4,90	1,08	1,54
DE078	DE-078	3,50	0,10	1,09	29,93	52,37	1,94
DE079	DE-079	7,87	0,64	1,01	-	-	-
DE080	DE-080	5,13	0,16	1,10	-	-	-
DE081	DE-081	12,00	0,62	1,28	-	-	-
DE082	DE-082	10,57	0,37	1,44	-	-	-
DE083	DE-083	6,97	0,26	1,02	-	-	-
DE084	DE-084	20,87	1,20	1,53	45,50	2,63	1,89
DE085	DE-085	24,60	2,14	1,61	-	-	-
DE088	DE-088	51,00	32,79	1,67	-	-	-
DG148	DG-148	72,97	0,87	1,55	59,47	2,76	1,95
DG139	DG-139	90,17	13,31	1,78	26,37	1,10	1,65
DG106	DG-106	79,07	2,63	1,75	15,70	1,32	1,34
DG161	DG-161	47,00	9,07	1,80	32,40	2,44	1,81
BCL003	BCL-003*	-	-	-	484,17	2,07	1,98
BCL 004	BCL-004*	-	-	-	394,47	1,99	2,23
BCL005	BCL-005*	-	-	-	376,6	2,04	1,79
BCL 06	BCL-06*	-	-	-	149,77	2,01	2,26
BCE014	BCE-014*	-	-	-	376,87	2,02	1,73
BCL015	BCL-015*	-	-	-	878,17	2,09	2,47
BCL018	BCL-018*	-	-	-	1045,2	2,09	1,92
BCL027	BCL-027*	-	-	-	498,63	2,05	1,78
BCE030	BCE-030*	-	-	-	569,17	1,95	2
ATD011	ATD-011*	-	-	-	665,33	2,09	2,07
ATD018	ATD-018*	-	-	-	368,13	2,04	1,70

Tabla D1. (Continuación)

ATL 005	ATL-005*	-	-	-	428,2	1,84	0,89
ATL 016	ATL-016*	-	-	-	438,17	2,07	1,97
ATL 050	ATL-050*	-	-	-	460,4	2,04	1,85

*Cepas extraídas nuevamente por el método de fenol cloroformo

Tabla D2. Cuantificación de ADN genómico de actinomicetes (ng/μL) seleccionados para el secuenciamiento del gen del ADNr 16S

Código recibido	Código asignado	Promedio concentración (ng/μL)	Promedio 260/280	Promedio 260/230
ATD-018*	CR2018-23	571,47	1,80	1,13
BCE-030	CR2018-24	523,5	1,93	1,60
BCL-015	CR2018-25	118,43	1,68	0,93
JD-046	CR2018-26	295,93	2,00	1,89
DE-015*	CR2018-27	813	2,04	1,84
DE-045	CR2018-28	723,83	2,00	2,15
DE-055	CR2018-29	326	1,95	1,84
DE-061*	CR2018-30	117,1	1,77	1,10
DE-067	CR2018-31	272,83	1,90	1,75
DE-085	CR2018-32	284,03	1,77	0,86
JD-004*	CR2018-33	124,4	1,86	1,77
JD-014	CR2018-34	55,33	1,84	1,75
JV-027*	CR2018-35	377,87	1,77	0,80
JD-032	CR2018-36	680,8	1,78	1,30
JD-038	CR2018-37	414,73	1,72	0,87
JD-044	CR2018-38	354,4	2,01	1,96
JV-005	CR2018-39	248,7	1,84	1,25
JV-011	CR2018-40	80,47	1,67	0,84
JD-027	CR2018-41	239,17	1,94	1,65

*Cepas con secuencias de nucleótidos menor a 1400nt, se descartaron del análisis del árbol filogenético.

Tabla D3. Matriz de similitud y diferencia de nucleótidos para la identificación de cercanía entre actinomicetes secuenciados y la especie *Streptomyces fildesensis*

Especie	<i>Streptomyces fildesensis</i>	BCE-030	BCL-015	JD-046	DE-045	DE-055	JD-014	JD-032	JD-038	JV-005	JV-011
<i>Streptomyces fildesensis</i>	---	4/1439	5/1439	7/1294	7/1437	7/1437	4/1439	4/1437	7/1439	4/1439	4/1439
BCE-030	99.72	---	1/1439	3/1294	3/1437	3/1437	0/1439	0/1437	3/1439	0/1439	0/1439
BCL-015	99.65	99.93	---	3/1294	4/1442	4/1442	1/1444	0/1442	3/1444	1/1444	1/1444
JD-046	99.46	99.77	99.77	---	0/1294	0/1294	3/1294	3/1294	5/1294	3/1294	3/1294
DE-045	99.51	99.79	99.72	100.00	---	0/1442	3/1442	3/1440	6/1442	3/1442	3/1442
DE-055	99.51	99.79	99.72	100.00	100.00	---	3/1442	3/1440	6/1442	3/1442	3/1442
JD-014	99.72	100.00	99.93	99.77	99.79	99.79	---	0/1442	3/1444	0/1444	0/1444
JD-032	99.72	100.00	100.00	99.77	99.79	99.79	100.00	---	2/1442	0/1442	0/1442
JD-038	99.51	99.79	99.79	99.61	99.58	99.58	99.79	99.86	---	3/1444	3/1444
JV-005	99.72	100.00	99.93	99.77	99.79	99.79	100.00	100.00	99.79	---	0/1444
JV-011	99.72	100.00	99.93	99.77	99.79	99.79	100.00	100.00	99.79	100.00	---

Tabla D4. Matriz de similitud y diferencia de nucleótidos para la identificación de la cercanía entre la cepa DE-085 y las posibles especies del género *Streptomyces*

Especies	<i>Streptomyces camponoticapitis</i>	<i>Streptomyces niveus</i>	DE-085
<i>Streptomyces camponoticapitis</i>	---	8/1433	6/1443
<i>Streptomyces niveus</i>	99.44	---	4/1433
DE-085	99.58	99.72	---

Tabla D5. Matriz de similitud y diferencia de nucleótidos para la identificación de la cercanía entre la cepa JD-027 y las posibles especies del género *Streptomyces*

Especies	<i>Streptomyces scopuliridis</i>	<i>Streptomyces wistariopsis</i>	JD-027
<i>Streptomyces scopuliridis</i>	---	13/1442	9/1444
<i>Streptomyces wistariopsis</i>	99.10	---	6/1441
JD-027	99.38	99.58	---

Tabla D6. Matriz de similitud y diferencia de nucleótidos para la identificación de la cercanía entre la cepa JD-044 y las posibles especies del género *Streptomyces*

Especies	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	<i>Streptomyces rhizosphaerihabitans</i>	<i>Streptomyces scabiei</i>	JD-044
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	---	14/1421	1/1422	18/1422
<i>Streptomyces rhizosphaerihabitans</i>	99.01	---	14/1444	8/1444
<i>Streptomyces scabiei</i>	99.93	99.03	---	18/1445
JD-044	98.73	99.45	98.75	---

Tabla D7. Matriz de similitud y diferencia de nucleótidos para la identificación de la cercanía entre la cepa DE-067 y las posibles especies del género *Nocardia*

Especies	<i>Nocardia sungurluensis</i>	<i>Nocardia exalbida</i>	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	<i>Nocardia tenerifensis</i>	<i>Nocardia gamkensis</i>	<i>Nocardia abscessus</i>	<i>Nocardia grenadensis</i>	<i>Nocardia xishanensis</i>	<i>Nocardia lijiangensis</i>	DE-067
<i>Nocardia sungurluensis</i>	---	26/1437	27/1438	39/1436	27/1433	26/1433	34/1429	31/1433	27/1438	24/1438
<i>Nocardia exalbida</i>	98.19	---	26/1437	31/1436	1/1432	14/1432	33/1428	16/1432	19/1437	26/1437
<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	98.12	98.19	---	39/1436	27/1433	16/1433	35/1429	30/1433	35/1438	31/1438
<i>Nocardia tenerifensis</i>	97.28	97.84	97.28	---	32/1431	32/1431	40/1427	35/1431	38/1436	32/1436
<i>Nocardia gamkensis</i>	98.12	99.93	98.12	97.76	---	15/1433	34/1429	17/1433	20/1433	27/1433
<i>Nocardia abscessus</i>	98.19	99.02	98.88	97.76	98.95	---	30/1429	26/1433	33/1433	27/1433
<i>Nocardia grenadensis</i>	97.62	97.69	97.55	97.20	97.62	97.90	---	35/1429	41/1429	23/1429
<i>Nocardia xishanensis</i>	97.84	98.88	97.91	97.55	98.81	98.19	97.55	---	10/1433	29/1433
<i>Nocardia lijiangensis</i>	98.12	98.68	97.57	97.35	98.60	97.70	97.13	99.30	---	27/1438
DE-067	98.33	98.19	97.84	97.77	98.12	98.12	98.39	97.98	98.12	---

Tabla D8. Secuencias del gen del ADNr 16S e identificación de las posibles especies conocidas de actinomicetes

Códigos	Secuencia del gen ADNr 16S (5'- 3')	Identificación molecular	Número de nucleótidos
BCE-030	<p>GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT GGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACACTCTCCTCCTCTGGGGGTGGTTAAAAGCTCCGGCG GTGAAGGATGAGCCCGGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG GATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTCACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGCTT AACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA ACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGTTGGGAAC TAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC TAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAC ACCGAAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTTCGGGTACAGGTGGTGC_aTGGCTGTCGTACGTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG GGGACGACGTCAAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAATGAGCTGCGATACC GCAAGGTGGAGCGAA TCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCGTCGA AGGTGGGACTGGCGATTGGGACG</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis</i> (DQ408297)</p>	<p>1439</p>

Tabla D8. (Continuación)

BCL-015	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG GGCAATCTGCCCTTACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTCCTCCTCTGGGGGTGGGTTAAAAGCTCCGGCG GTGAAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG GATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTCTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTT AACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA ACACCGGTGCGGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCCTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCACGTCGTGGTGGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC TAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAC ACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTGTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG GGGACGACGTCAAAGTCAATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAA TCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAAGTCGGTAAACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCGTCAA AGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTC</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis</i> (DQ408297)</p>	1439
JD-046	<p>GTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCTTCGGGTGGATTAGTGGCGAACGG GTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTTACCTCCTCTGGGGTGGT TAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG GGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGC GACGCCCGTGAAGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAAGCACC GGCTAA CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTCTGTACGTCGGATGTG AAAGCCCGGGCTTAACCCCGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGC AGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACAGGTGTTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGGCCAGCTAACGCATTAAGTTCGCCCTGGGGA GTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTAC CAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCAGCTCGTGTCTGTGAGA TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTAGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAA CTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCGGTACAATGAGCTGCGATACCG CAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGCCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAAT</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis</i> (DQ408297)</p>	1294

Tabla D8. (Continuación)

DE-045	<p>GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCTTCGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG GCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTTACCTCCTCTGGGGGTTGGTTAAAAGCTCCGGCGG TGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCCGGCCACAC TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGG ATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTCTGTACAGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTT AACCCCGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA ACACCGGTGGCGAAGGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGTTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC TAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAC ACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTAGGGGACTCACAGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG GGGACGACGTCAGTCAATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAA TCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACGTCACGAAAAGTCGGTAAACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCGTCGA AGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis</i> (DQ408297)</p>	1437
DE-055	<p>GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCTTCGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG GCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTTACCTCCTCTGGGGGTTGGTTAAAAGCTCCGGCGG TGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCCGGCCACAC TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGG ATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTCTGTACAGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTT AACCCCGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA ACACCGGTGGCGAAGGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGTTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC TAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAC ACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTAGGGGACTCACAGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG GGGACGACGTCAGTCAATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAA TCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACGTCACGAAAAGTCGGTAAACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCGTCGA AGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis</i> (DQ408297)</p>	1437

Tabla D8. (Continuación)

JD-014	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG GGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTCCTCCTCTGGGGGTGGGTTAAAAGCTCCGGCG GTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG GATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTT AACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA ACACCGGTGCGGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGTTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC TAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAC ACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTGTGGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG GGGACGACGTCAAAGTCAATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAA TCTAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAAGTCGGTAAACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCTCGTA AGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis (DQ408297)</i></p>	1439
JD-032	<p>CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG GCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTCCTCCTCTGGGGGTGGGTTAAAAGCTCCGGCGG TGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACAC TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGG ATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTT AACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA ACACCGGTGCGGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGTTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC TAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAC ACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTGTGGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG GGGACGACGTCAAAGTCAATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAA TCTAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAAGTCGGTAAACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCTGCNA AGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis (DQ408297)</i></p>	1437

Tabla D8. (Continuación)

JD-038	<p>CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG GCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACACTCTCCTCCTCCTGGGGGTGGGTAAAAAGCTCCGGCGG TGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACAC TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGTGAGGG ATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAAGAACACCGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTGTGCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTT AACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA ACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC TAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAC ACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG GGGACGACGTCAAAGTCAATATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAA TCTAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAAGTCGGTAAACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCGTCCA AGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis (DQ408297)</i></p>	1439
JV-005	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG GGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACACTCTCCTCCTCCTGGGGGTGGGTAAAAAGCTCCGGCG GTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGTGAGG GATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAAGAACACCGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTGTGCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTT AACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA ACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC TAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAC ACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG GGGACGACGTCAAAGTCAATATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAA TCTAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAAGTCGGTAAACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCGTCCA AGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis (DQ408297)</i></p>	1439

Tabla D8. (Continuación)

JV-011	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTTGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCTCCTCTCTGGGGTGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTCTGTACGTCCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGTCTGCATTGCATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGTTGGGAAC TAGGTGTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTCCGTTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTGTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGACGACGTC AAGTCAATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTAAAAAGCCCGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAAGTCGGTAAACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis</i> (DQ408297)</p>	<p>1439</p>
DE-085	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTTGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATGACACTGTCCCTCATGGGGATGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGA TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGCGCAAGCGTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTCTGTACGTCCGGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGTCTGCATTGCATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAA CACCGGTGGCGAAGGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAC TAGGTGTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACA CCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCTCCCTTGTGGTCCGTTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTGTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGG GGACGACGTC AAGTCAATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAAT CTAAAAAGCCCGGCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAAGTCGGTAAACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA</p>	<p><i>Streptomyces niveus</i> (NR_115784)</p>	<p>1433</p>

Tabla D8. (Continuación)

JD-044	<p>GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT GGCAATCTGCCCTTACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCCTGCCTGCATGGGCGGGGGTTAAAAGCTCCGGC GGTGAAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAG GGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCA GCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACGTGCGTTGTGAAAGCCCGGGG TTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAATGCGCAGATATCAGGAG GAACACCGGTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGGTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATCCACGTCGTCGGTGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAA GGTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA TACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG GTGGGGACGACGTCAAGTCATATGCCCCCTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCAGGTACAAAGAGCTGCGAAGCCCGGAGGCGGAG CGAATCTCAAAAAGCCTGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGTGCGG TGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTG TCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA</p>	<p><i>Streptomyces rhizophaeihib itans</i> (NR_151948)</p>	1444
JD-027	<p>CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG GCAATCTGCCCTTACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCCTGCCTGCATGGGCGGGGGTTAAAAGCTCCGGCGG TGAAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACAC TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGG ATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC CGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTGCGTCCGATGTGAAAGCCCGGGGCTT AACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA ACACCGGTGGCGAAGGGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC TAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAT ACCGGAAACGGCCAGAGATGGTCCGCCCTTGTGGTCCGATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCTTGTGTTGTCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG GGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCCGGAGGCGGAGCGA ATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGTGCGGTTGA ATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCG AAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA</p>	<p><i>Streptomyces wistariopsis</i> (LC102485)</p>	1441

Tabla D8. (Continuación)

DE-067	<p>GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC GTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT GGGTGATCTGCCTCGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCAACGATCGCATGGTTGTTGGTGGAAAAGATTTATC GGTGCAGATGGGCCC GCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA TGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGACTCCGACGAAGCGAAAAGTGACGGTAGGGGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCA GCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTCCGCTCTTCTGTGAAAACTTGGGGCT CAACCTTAAGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTAGAGTACTTCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGG AACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGAAGTAACTGACGCTGAGAAGCGAAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG GCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACAT ACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGT CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTATGTTGCCAGCGCTAATGGCGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGAC GACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCT TAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGT TCCCGGCCCTTGTACACCCCGCTCACGTATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGT GGGATTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA</p>	<p><i>Nocardia grenadensis</i> (NR_117107)</p>	1429
--------	--	--	------

Anexo E. Figuras

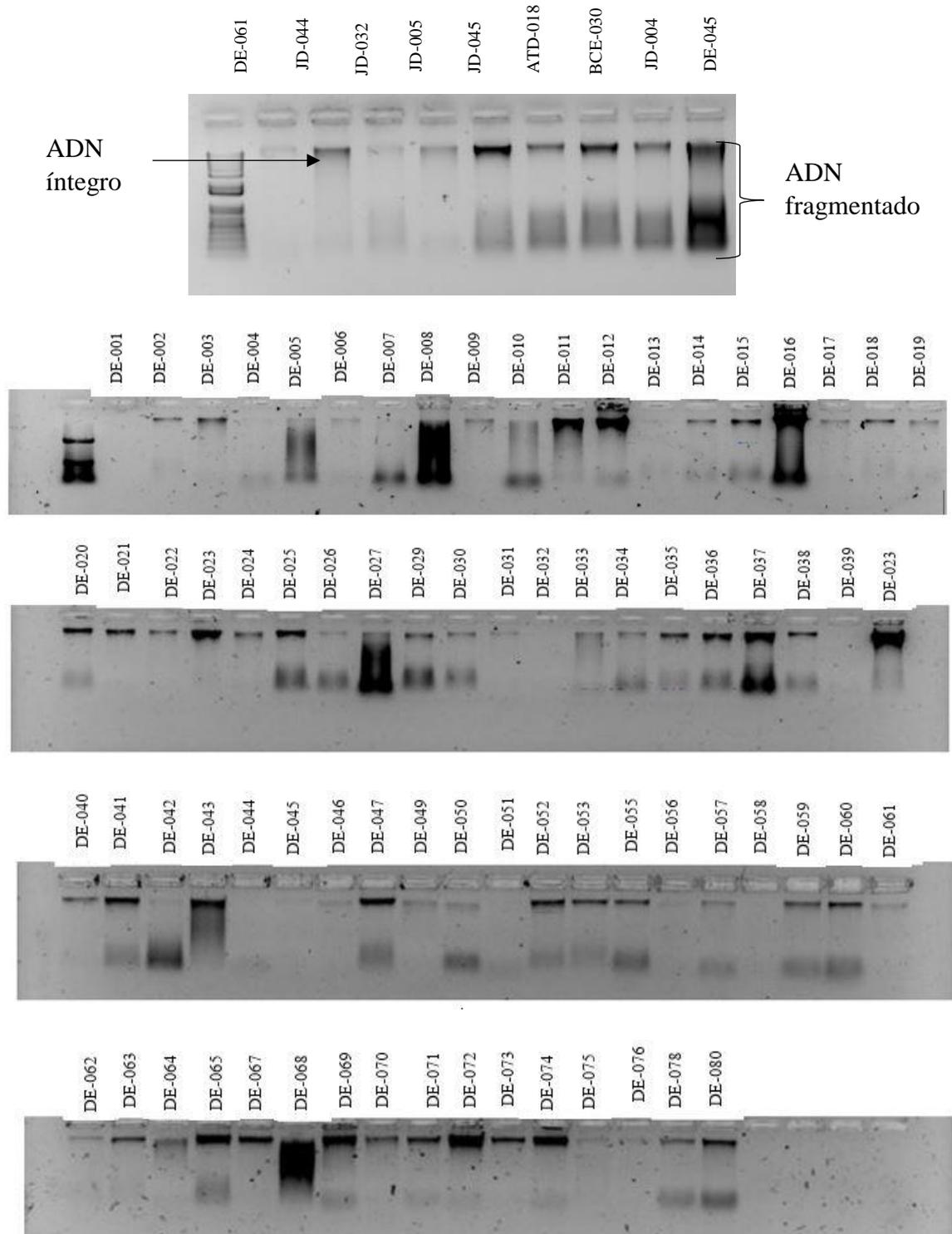


Figura E1. Electroforesis de ADN genómico en gel de agarosa al 1% (p/v)

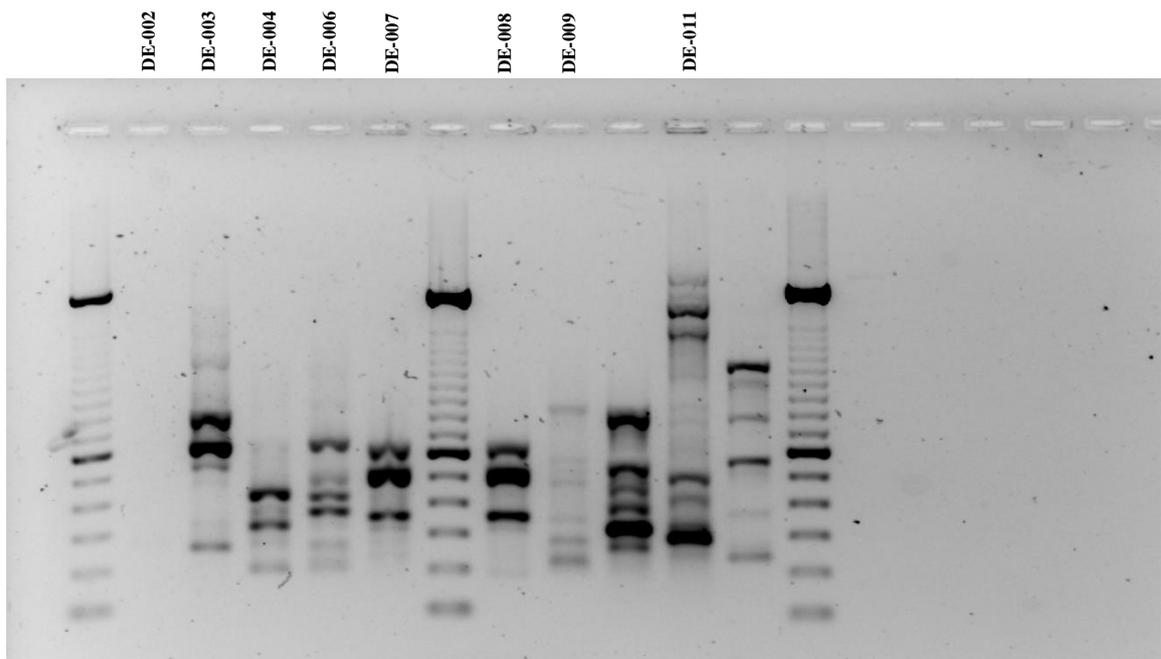


Figura E2. Amplificación de patrones de fingerprinting de actinomicetes por el método de rep-PCR utilizando el primer BOX A1R1

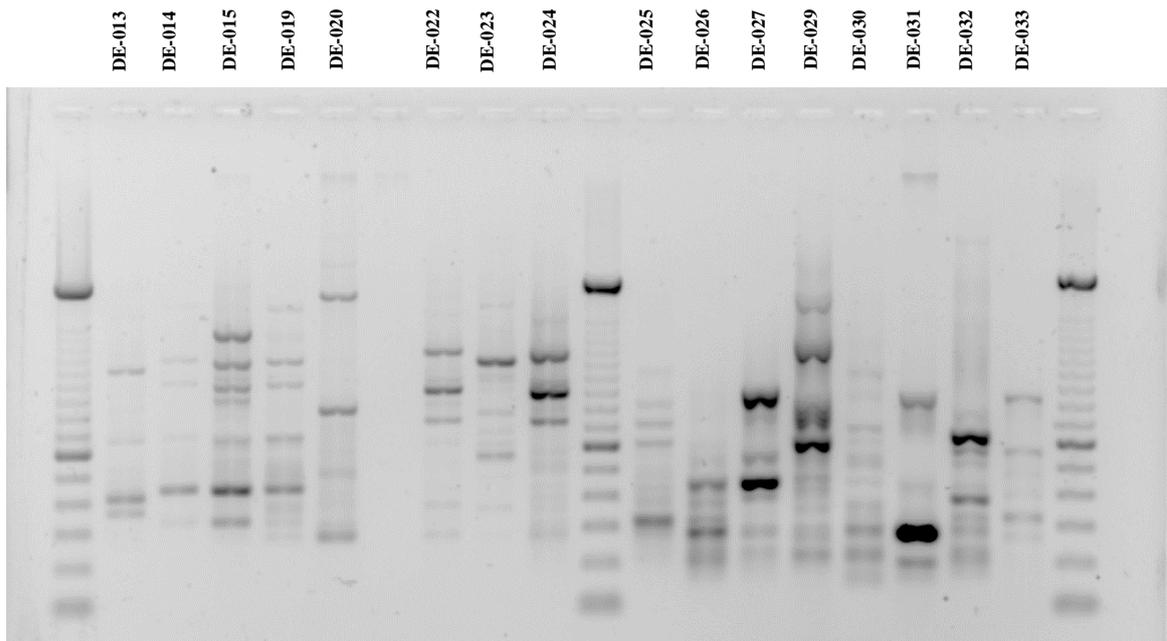


Figura E2. Continuación

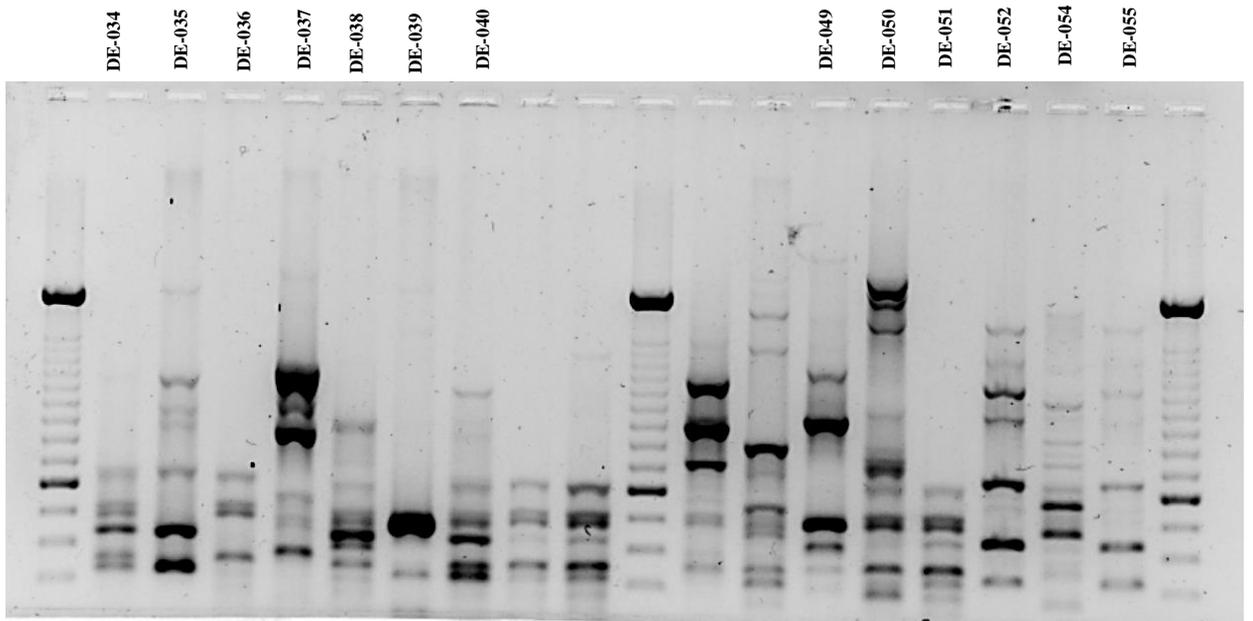


Figura E2. Continuación

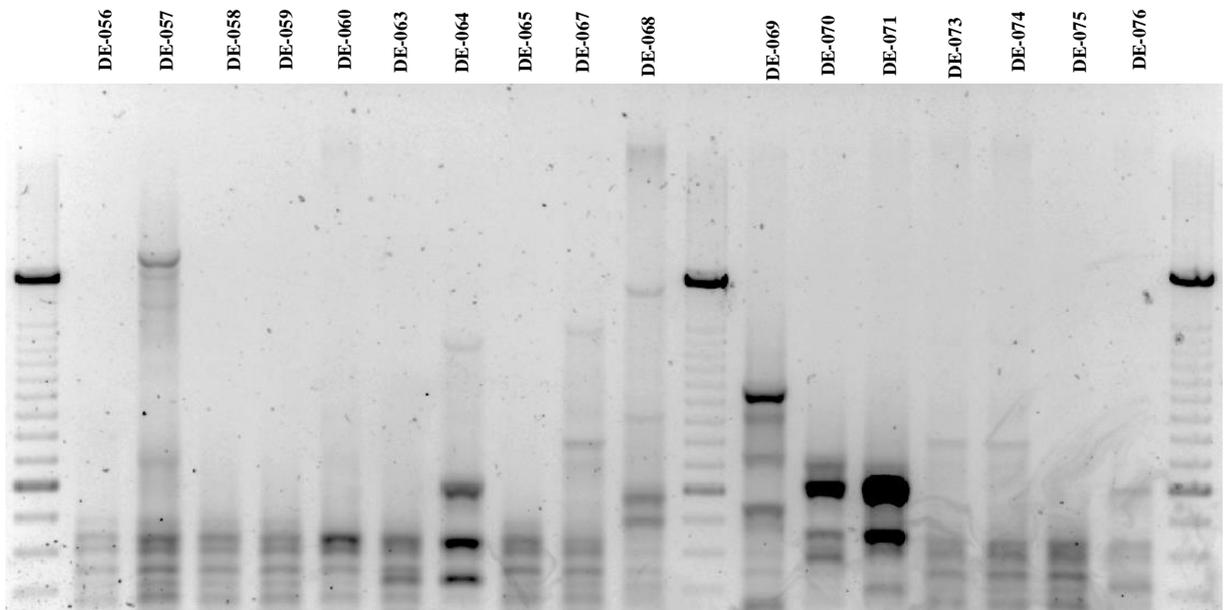


Figura E2. Continuación

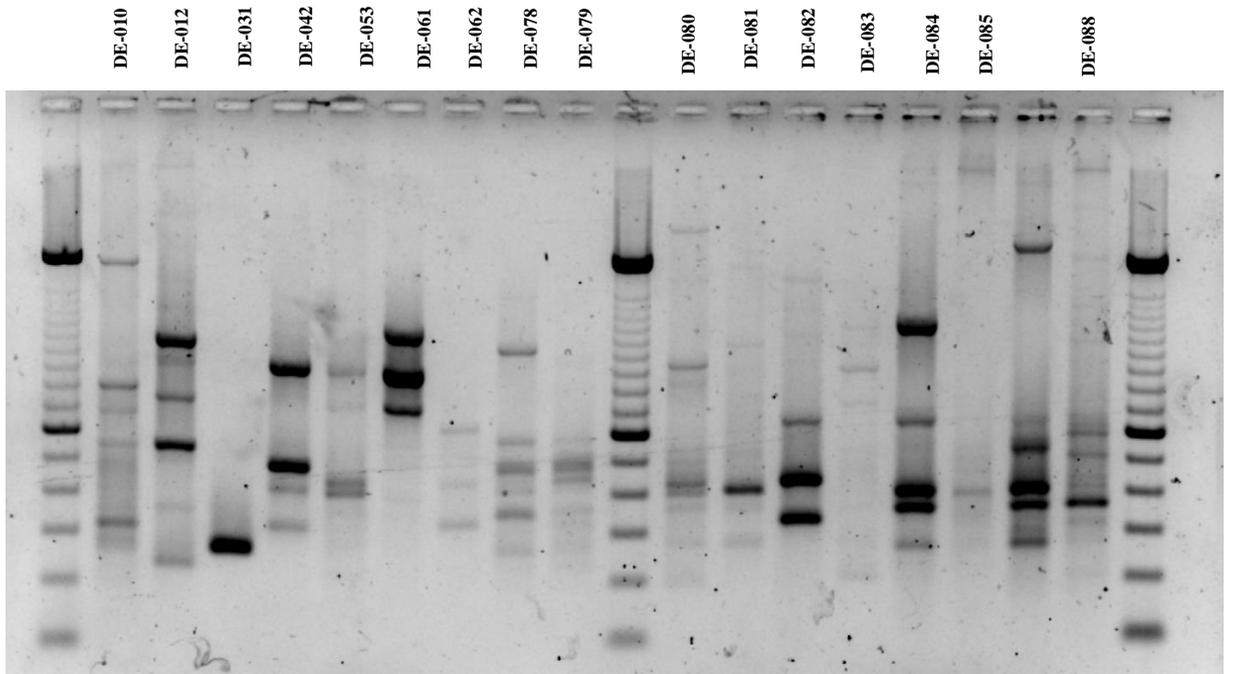


Figura E2. Continuación

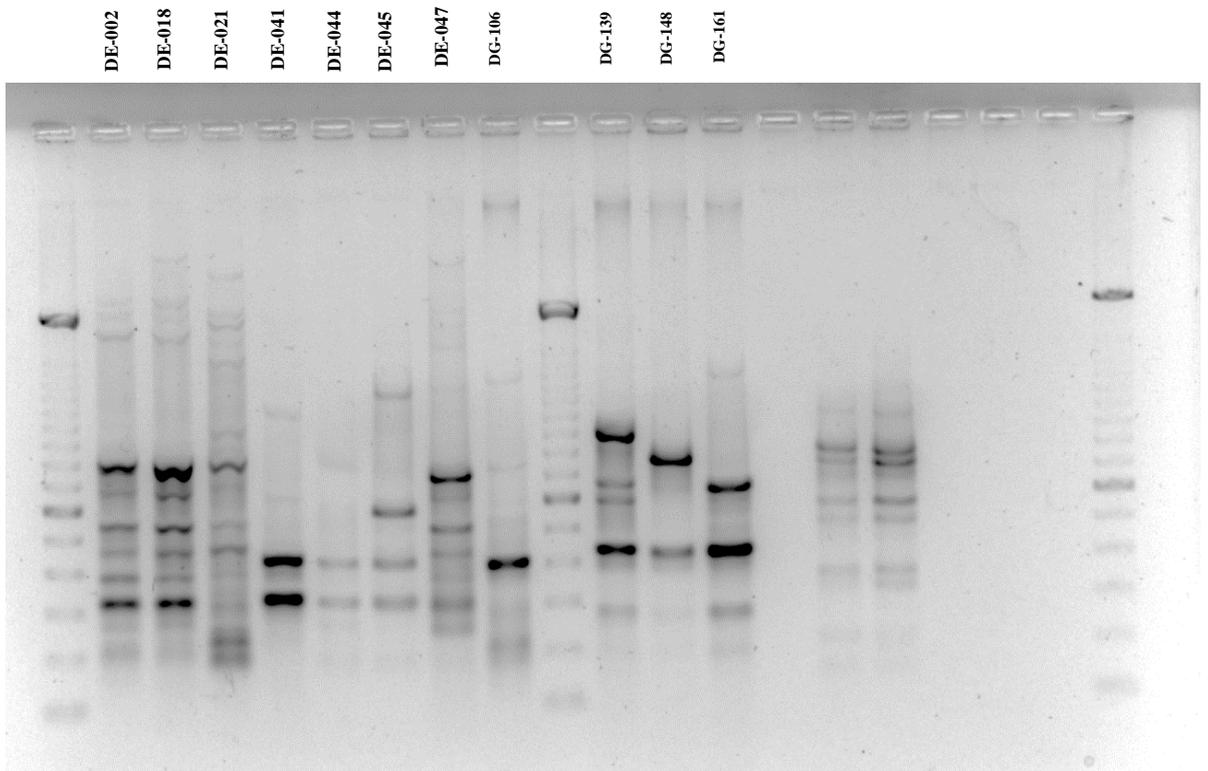


Figura E2. Continuación

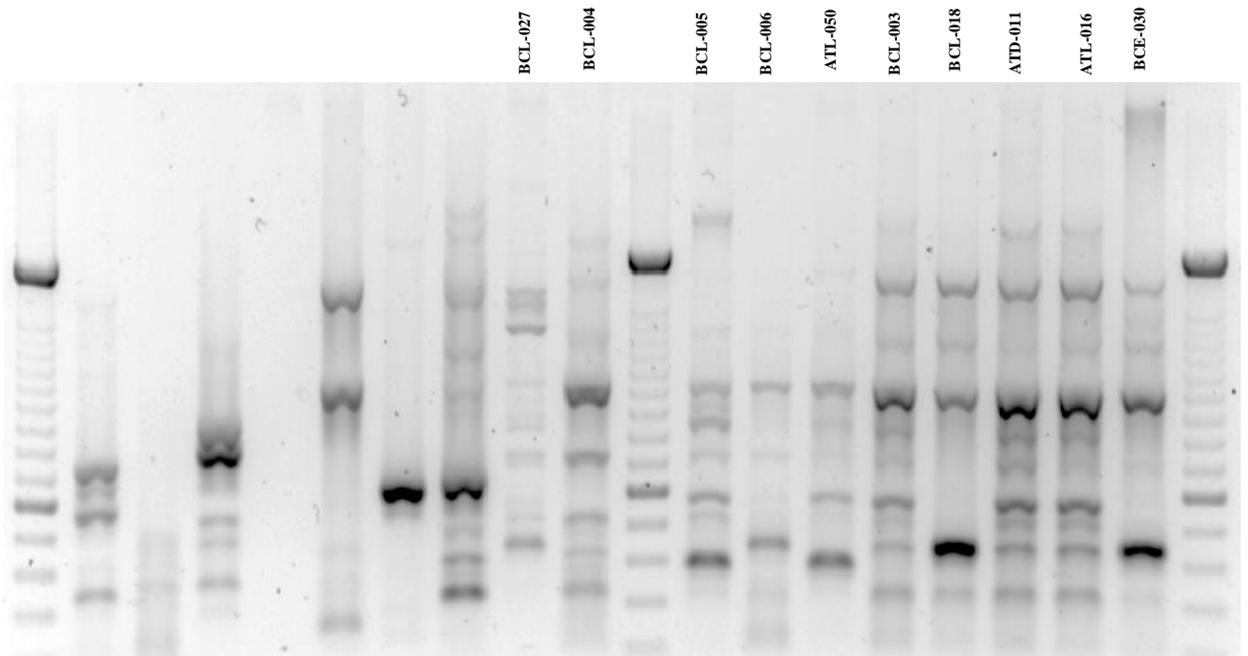


Figura E2. Continuación

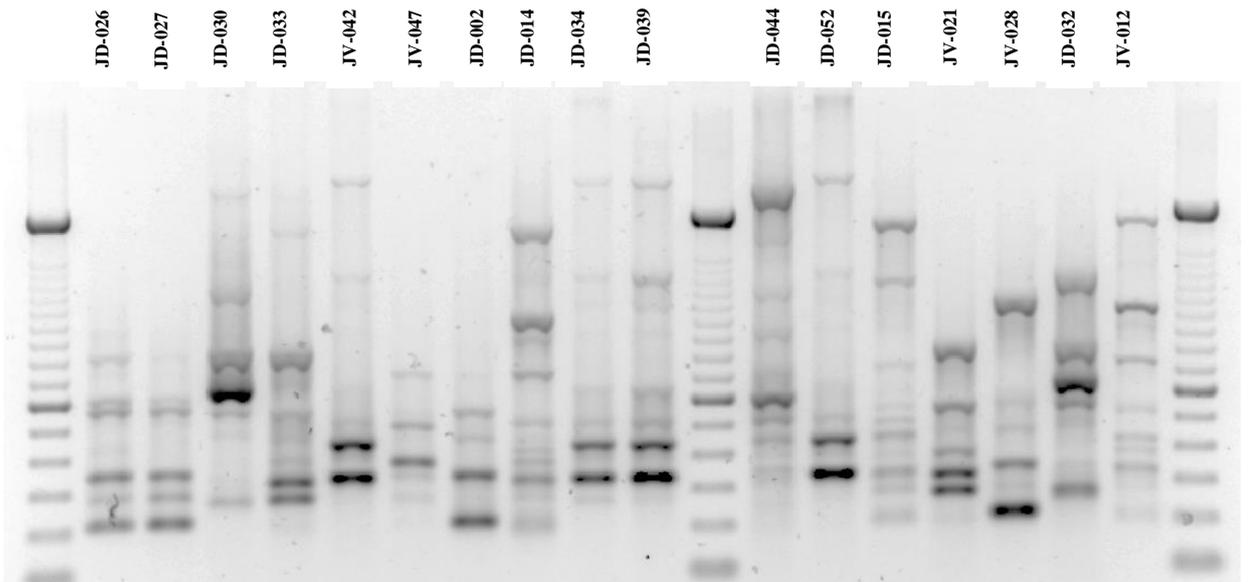


Figura E2. Continuación

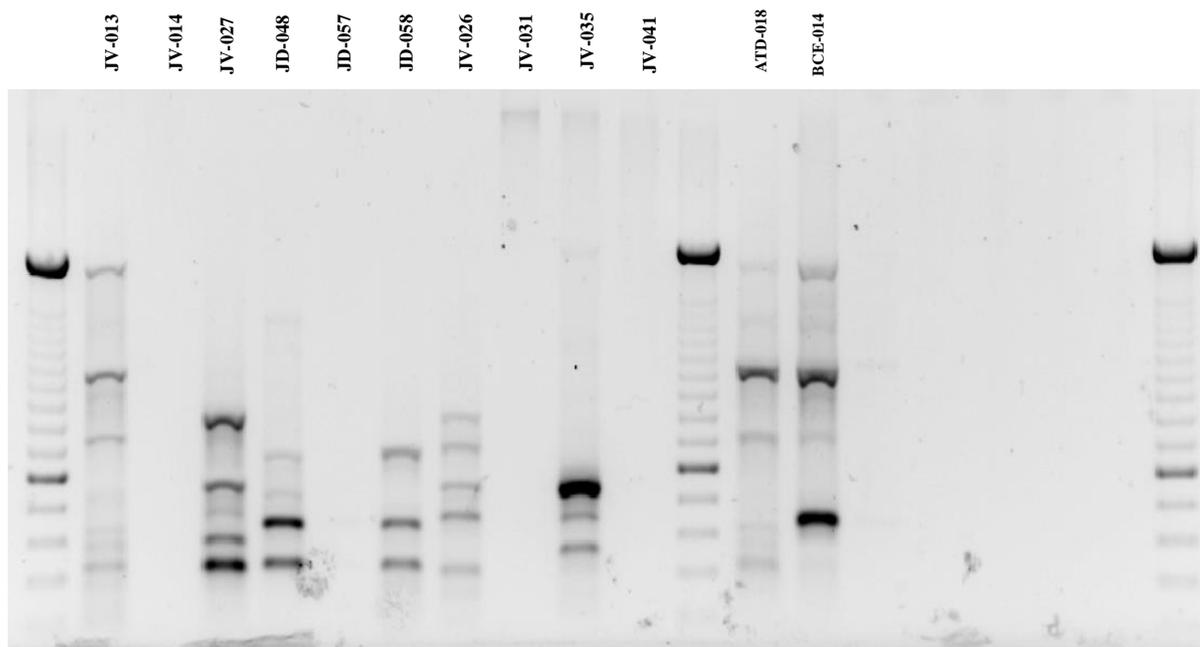


Figura E2. Continuación

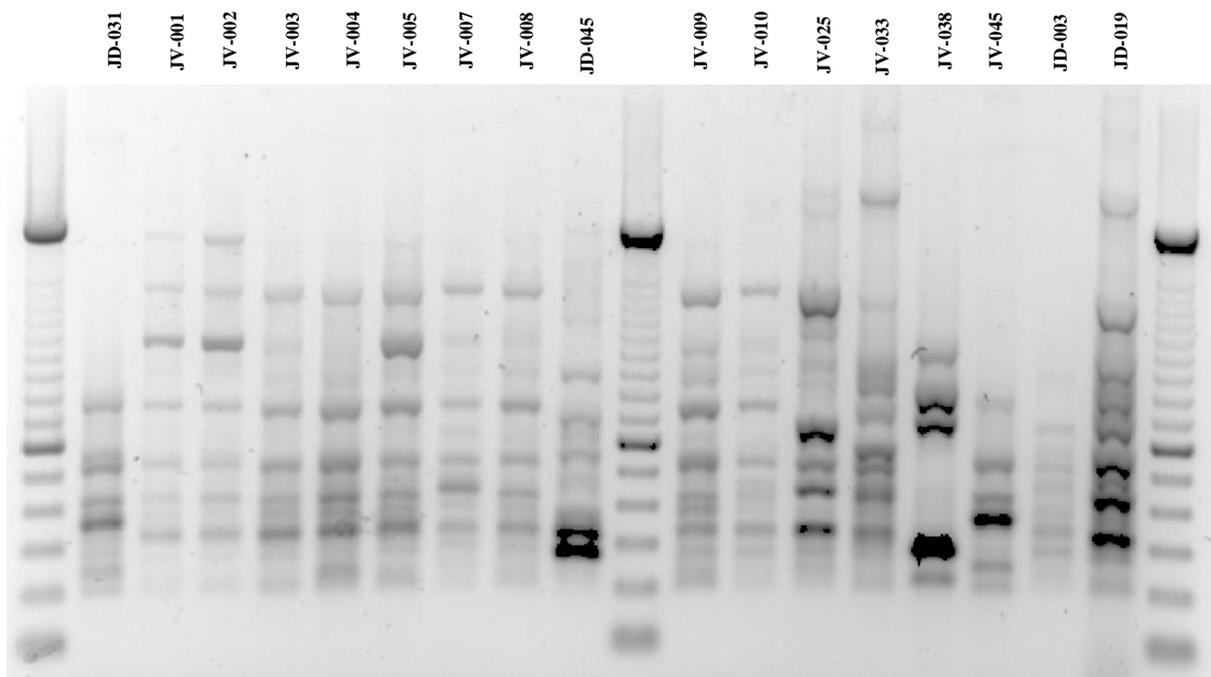


Figura E2. Continuación

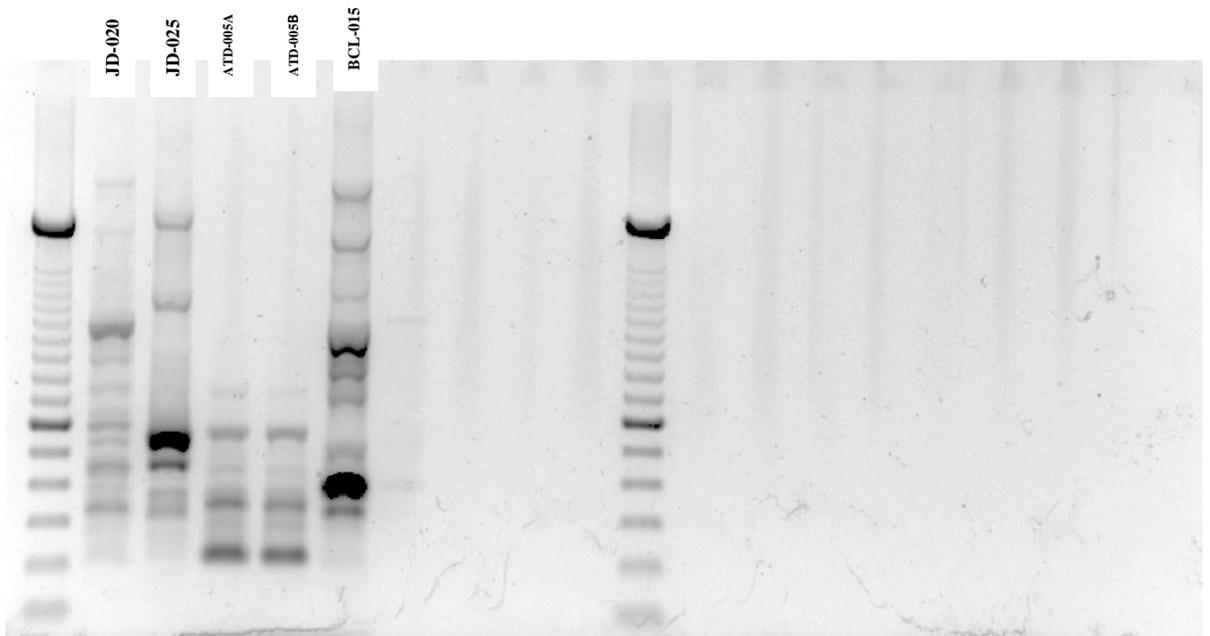


Figura E2. Continuación

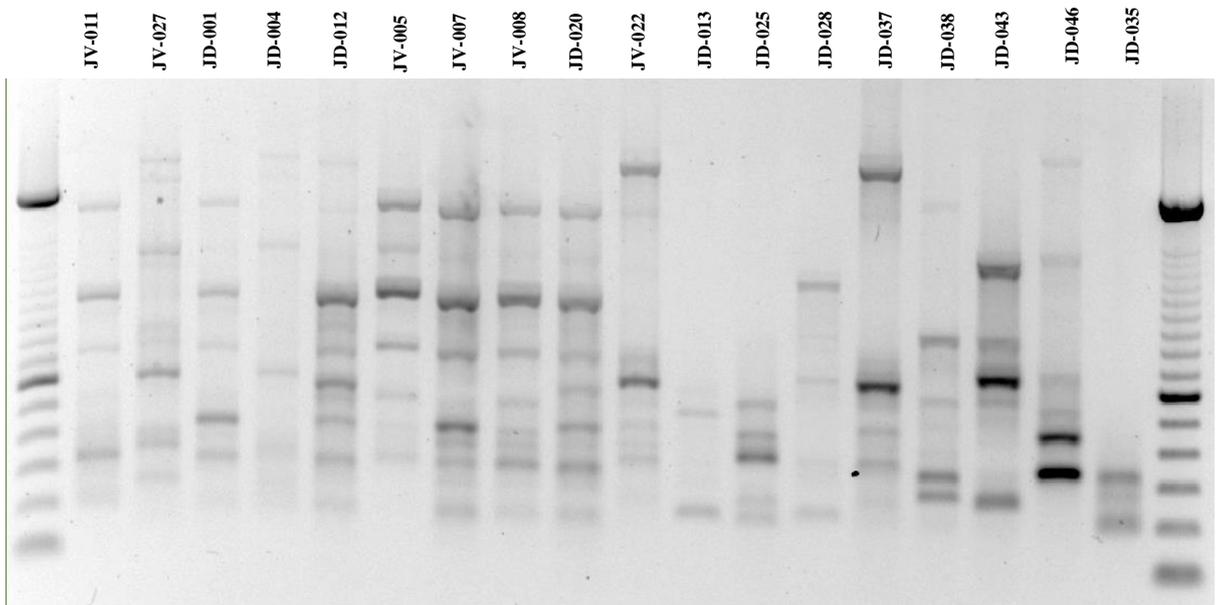


Figura E2. Continuación

Tabla F2. Grupos de color de cepas de actinomicetes

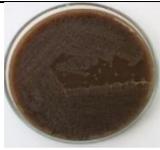
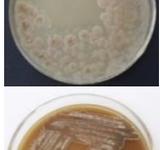
Color		Códigos	
Micelio aéreo	Micelio de sustrato		
(320-410) Light Brown	(541) Maroon	BCL-027, JV-011, JV-008, JD-020, JV-005, JD-014, ATL-050, DE051, BCL015	
Blanco	(320-410) Light Brown	DE-015, JD-046, DE-076, DE-040, DE-044, JV-025, DE-064, JV-042, JD-039, DE-041, JD-048, DE-045, BCE-014, JD-043, JV-021, JD-038, DE-026, ATD-011, BCE-030, JD-032, DE-060, DE-038, JV-010	
(361) Light stone	(541) Maroon	DE-025, DE-002, DE-020, ATD-018	
(361) Light stone	(320-410) Light Brown	JV-026, DE-055	
Blanco	(389) Camouflage beige	JD-044, DG-161	
(369) Biscuit	(367) Manilla	DE-074, DE-067, DE-021, DE-009, DE-039, DE-027, DE-011	
Blanco	(358) Light buff	DE-085	
(367) Manilla	(369) Biscuit	DE-061	
Blanco	(361) Light stone	JD-025, DE-084	
(361) Light stone	(369) Biscuit	JV-027	

Tabla F2. (Continuación)

(353) Deep cream	(353) Deep cream	JD-004
(361) Light stone	(367) Manilla	JD-013
(389) Camouflage beige	(320-410) Light Brown	DE-013
Blanco	(353) Deep cream	DE-049
(358) Light buff	(361) Light stone	JS-025
Blanco	(384) Ligth straw	JD-027
(367) Manilla	(367) Manilla	DE-068
(369) Biscuit	(353) Deep cream	DE-022
(529) Marfil	(353) Deep cream	DE-080, JV-038
(389) Camouflage beige	(353) Deep cream	DE-042, DE-037
Blanco	(361) Light stone	JV-022



Tabla F2. (Continuación)

(568) Apricot	(369) Biscuit	DE-036
(361) Light stone	(384) Light straw	DE-079



Tabla F3. Morfología de la cadena de esporas

Código	Morfología de la cadena de esporas	Código	Morfología de la cadena de esporas
BCL-027	Recta corta	DE-021	Recta corta
JV-011	Flexous	DE-009	Recta corta
JV-008	Incompleta	DE-061	Esporangios
JD-020	Incompleta	JD-025	Recta corta
JV-005	Flexous	DE-084	Esporas simples
JV-021	Recta larga	JV-027	Recta corta
JD-038	Esporas simples	JD-004	Recta corta
DE-026	Esporas simples	JD-013	Esporas simples
DE-015	Incompleta	DE-039	Recta larga
JD-046	Flexous	DE-027	Recta corta
DE-076	Incompleta	JV-038	Incompleta
DE-040	Incompleta	DE-011	Recta corta
DE-044	Recta larga	DE-085	Recta corta
JV-025	Recta larga	DE-013	Recta larga
DE-064	Recta larga	JS-025	Esporas simples
JV-042	Recta corta	JD-027	Incompleta
JD-039	Esporas simples	DE-068	Recta corta
DE-041	Recta corta	DE-022	Esporas simples
JD-048	Incompleta	DE-051	Incompleta
ATD-011	Recta larga	DE-045	Flexous
BCE-030	Recta larga	BCL-015	Flexous
DE-060	Recta larga	DE-080	Incompleta
DE-038	Recta larga	JD-014	Flexous
JV-010	Recta corta	DE-042	Recta corta
ATL-050	Recta larga	ATD-018	Recta corta
DE-025	Recta larga	JD-043	Recta larga
DE-002	Recta corta	JD-032	Flexous
DE-020	Recta corta	DE-036	Recta corta
JV-026	Esporas simples	BCE-014	Recta larga
DE-055	Flexous	DE-037	Recta corta
JD-044	Recta larga	JV-022	Recta corta
DG-161	Esporas simples	DE-049	Flexous
DE-074	Recta larga	DE-079	Recta larga
DE-067	Incompleta		

Tabla F4. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura

Códigos	Temperatura (°C)					Clasificación
	4	20	26	37	50	
BCL-027	0	1	1	1	0	Mesófilo
JV-011	0	1	1	1	0	Mesófilo
JV-008	0	1	1	1	0	Mesófilo
JD-020	0	1	1	1	0	Mesófilo
JV-005	0	1	1	1	0	Mesófilo
JV-021	0	1	1	1	0	Mesófilo
JD-038	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-026	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-015	0	1	1	1	0	Mesófilo
JD-046	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-076	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-040	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-044	0	1	1	1	0	Mesófilo
JV-025	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-064	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
JV-042	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
JD-039	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
DE-041	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
JD-048	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
ATD-011	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
BCE-030	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-060	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
DE-038	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
JV-010	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
ATL-050	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
DE-025	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
DE-002	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
DE-020	0	1	1	1	0	Mesófilo
JV-026	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE055	0	1	1	1	0	Mesófilo
JD-044	0	1	1	1	0	Mesófilo
DG-161	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-074	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-067	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-021	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-009	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-061	0	1	1	1	0	Mesófilo
JD-025	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-084	0	1	1	1	0	Mesófilo
JV-027	0	1	1	1	0	Mesófilo

Tabla F4. (Continuación)

JD-004	0	1	1	1	0	Mesófilo
JD-013	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-039	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-027	0	1	1	1	0	Mesófilo
JV-038	1	1	1	1	0	Mesófilo
DE-011	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-085	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-013	0	1	1	1	0	Mesófilo
JS-025	0	1	1	1	0	Mesófilo
JD-027	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-068	1	1	1	1	0	Mesófilo extremo
DE-022	1	1	1	1	0	Mesófilo extremo
DE-051	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-045	0	1	1	1	0	Mesófilo
BCL-015	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-080	1	1	1	1	0	Mesófilo extremo
JD-014	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-042	0	1	1	1	0	Mesófilo
ATD-018	0	1	1	0	0	Psicrótrofo
JD-043	0	1	1	1	0	Mesófilo
JD-032	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-036	0	0	0	0	0	No determinado
BCE-014	0	1	1	1	0	Mesófilo
DE-037	0	0	0	0	0	No determinado
JV-022	0	0	1	1	0	Mesófilo
DE-049	ND	1	ND	ND	0	No determinado
DE-079	ND	ND	ND	ND	0	No determinado

Tabla F5. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH

Código	pH					Clasificación
	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	
BCL-027	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV-011	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV-008	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JD-020	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV-005	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV-021	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JD-038	1	1	0	0	0	Acidófilo
DE-026	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-015	1	1	0	0	0	Acidófilo
JD-046	1	1	0	0	0	Acidófilo
DE-076	1	1	0	0	0	Acidófilo
DE-040	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-044	1	1	0	0	0	Acidófilo
JV-025	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-064	1	1	0	0	0	Acidófilo
JV-042	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JD-039	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-041	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JD048	1	1	1	0	0	No determinado
ATD-011	1	1	1	0	0	No determinado
BCE-030	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-060	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-038	1	1	0	0	0	Acidófilo
JV-010	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
ATL-050	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-025	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-002	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-020	1	1	1	0	0	No determinado
JV-026	1	1	0	0	0	Acidófilo
DE-055	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JD-044	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-161	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-074	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-067	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-021	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-009	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-061	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JD-025	1	1	0	0	0	Acidófilo
DE-084	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV-027	1	1	1	0	0	Neutrotolerante

Tabla F5. (Continuación)

JD-004	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JD-013	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-039	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-027	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV-038	1	1	1	1	1	Neutrotolerante
DE-011	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-085	0	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-013	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JS-025	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JD-027	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-068	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-022	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-051	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-045	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
BCL-015	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-080	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JD-014	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-042	1	1	0	0	0	Acidófilo
ATD-018	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JD-043	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JD-032	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DE-036	0	0	0	0	0	No determinado
BCE-014	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-037	0	0	0	0	0	No determinado
JV-022	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE-049	ND	ND	ND	ND	ND	No determinado
DE-079	ND	ND	ND	ND	ND	No determinado

Tabla F6. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la NaCl

Código	Salinidad %				Clasificación
	1	5	10	15	
BCL-027	1	0	0	0	Halófilo débil
JV-011	1	0	0	0	Halófilo débil
JV-008	1	0	0	0	Halófilo débil
JD-020	1	0	0	0	Halófilo débil
JV-005	1	0	0	0	Halófilo débil
JV-021	1	0	0	0	Halófilo débil
JD-038	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-026	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-015	1	0	0	0	Halófilo débil
JD-046	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-076	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-040	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-044	1	0	0	0	Halófilo débil
JV-025	1	1	0	0	Halófilo
DE-064	1	0	0	0	Halófilo débil
JV-042	1	0	0	0	Halófilo débil
JD-039	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-041	1	0	0	0	Halófilo débil
JD-048	1	0	0	0	Halófilo débil
ATD-011	1	0	0	0	No tolerante
BCE-030	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-060	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-038	1	0	0	0	Halófilo débil
JV-010	1	0	0	0	Halófilo débil
ATL-050	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-025	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-002	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-020	1	0	0	0	Halófilo débil
JV-026	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-055	1	0	0	0	Halófilo débil
JD-044	1	0	0	0	Halófilo débil
DG-161	1	1	0	0	Halófilo
DE-074	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-067	1	1	0	0	Halófilo
DE-021	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-009	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-061	1	0	0	0	Halófilo débil
JD-025	1	0	0	0	Halófilo débil

Tabla F6. (Continuación)

DE-084	1	0	0	0	Halófilo débil
JV-027	1	0	0	0	Halófilo débil
JD-004	1	0	0	0	Halófilo débil
JD-013	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-039	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-027	1	0	0	0	Halófilo débil
JV-038	1	1	1	0	Halófilo extremo
DE-011	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-085	1	1	0	0	Halófilo
DE-013	1	0	0	0	Halófilo débil
JS-025	1	0	0	0	Halófilo débil
JD-027	1	1	0	0	Halófilo
DE-068	1	1	0	0	Halófilo
DE-022	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-051	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-045	1	0	0	0	Halófilo débil
BCL-015	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-080	1	1	1	0	Halófilo extremo
JD-014	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-042	1	1	0	0	Halófilo
ATD-018	1	0	0	0	Halófilo débil
JD-043	1	1	0	0	Halófilo
JD-032	1	0	0	0	Halófilo débil
DE-036	0	0	0	0	No determinado
BCE-014	1	1	0	0	Halófilo
DE-037	0	0	0	0	No determinado
JV-022	1	1	0	0	Halófilo
DE-049	ND	ND	ND	0	No determinado
DE-079	ND	ND	ND	0	No determinado

Tabla F7. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento utilizando aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno

Código	Aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno												
	Lisina	Cisteína	Histidina	Leucina	Arginina	Tirosina	Acido aspártico	Alanina	Acido glutámico	Valina	Asparagina	Treonina	Fenilalanina
BCL-027	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-011	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-008	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-020	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-005	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-021	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-038	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-026	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-015	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-046	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-076	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-040	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-044	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-025	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-064	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-042	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-039	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-041	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-048	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
ATD-011	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
BCE-030	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
DE-060	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-038	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-010	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
ATL-050	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-025	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-002	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-020	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-026	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-055	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-044	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DG-161	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-074	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
DE-067	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-021	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0

Tabla F7. (Continuación)

DE-009	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0
DE-061	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
JD-025	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
DE-084	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-027	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
JD-004	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-013	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-039	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-027	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-038	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DE-011	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-085	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-013	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
JS-025	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-027	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-068	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DE-022	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DE-051	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-045	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
BCL-015	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-080	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
JD-014	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-042	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
ATD-018	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-043	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-032	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE036	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCE-014	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-037	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JV-022	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-049	ND												
DE-079	ND												

Tabla F8. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento utilizando aminoácidos como fuente única de nitrógeno

Código	Aminoácidos como fuente única de nitrógeno												
	Lisina	Cisteína	Histidina	Leucina	Arginina	Tirosina	Acido aspártico	Alanina	Acido glutámico	Valina	Asparagina	Treonina	Fenilalanina
BCL-027	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JV-011	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JV-008	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JD-020	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JV-005	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JV-021	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JD-038	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-026	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1
DE-015	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JD-046	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-076	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-040	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-044	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-025	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-064	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JV-042	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JD-039	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-041	ND	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JD-048	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
ATD-011	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
BCE-030	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-060	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-038	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JV-010	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
ATL-050	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-025	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-002	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-020	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JV-026	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
DE-055	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JD-044	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
DG-161	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-074	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
DE-067	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0
DE-021	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-009	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1

Tabla F8. (Continuación)

DE-061	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
JD-025	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-084	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JV-027	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-004	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-013	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1
DE-039	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-027	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1
JV-038	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DE-011	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-085	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-013	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JS-025	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
JD-027	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
DE-068	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DE-022	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-051	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-045	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
BCL-015	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-080	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
JD-014	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-042	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
ATD-018	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
JD-043	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
JD-032	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-036	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCE-014	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DE-037	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JV-022	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DE-049	ND												
DE-079	ND												

Anexo G. Tabla British Standard specification of colors for identification coding and special purposes

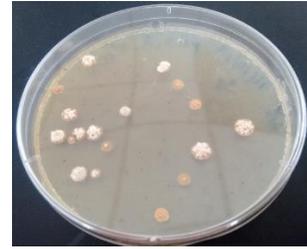
											
101 Sky Blue	103 Peacock Blue	104 Azure Blue	105 Oxford Blue	106 Royal Blue	107 Strong Blue	108 Aircraft Blue	109 Middle Blue	110 Roundel Blue	112 Arctic Blue	113 Deep Saxe Blue	166 French Blue
											
172 Pale Roundel Blue	175 Light French Blue	210 Sky	216 Eau De Nil	217 Sea Green	218 Grass Green	220 Olive Green	221 Brilliant Green	223 Mid Bronze Green	224 Deep Bronze Green	225 Light Brun- swick Green	226 Mid Brun- swick Green
											
227 Deep Brun- swick Green	228 Emerald Green	241 Dark Oak	262 Bold Green	267 Chrome Green	280 Verdignis Green	283 Aircraft Grey Green	284 Spruce Green	285 NATO Green	298 Olive Drab	309 Canary Yellow	310 Primrose Yellow
											
315 Grapefruit	320 Light Brown	337 Very Dark	352 Pale Cream	353 Deep Cream	355 Lemon	356 Golden	358 Light Buff	361 Light Stone	363 Bold Yellow	365 Vellum	366 Light Beige
											
367 Manilla	369 Biscuit	380 Camouflage Desert Sand	384 Light Straw	388 Beige	389 Camouflage Beige	411 Middle Brown	412 Dark Brown	414 Golden Brown	420 Dark Camouflage Desert Sand	436 Dark Camou- flage Brown	445 Venetian Red
											
447 Salmon Pink	453 Shell Pink	454 Pale Roundel Red	499 Service Brown	537 Signal Red	538 Cherry	539 Currant Red	541 Maroon	542 Ruby	557 Light Orange	564 Bold Red	568 Apricot
											
592 International Orange	593 Rail Red	626 Camouflage Grey	627 Light Aircraft Grey	629 Dark Camou- flage Grey	630 French Grey	631 Light Grey	632 Dark Admi- rality Grey	637 Medium Sea Grey	638 Dark Sea Grey	642 Night	676 Light Weath- erwork Grey
											
677 Dark Weath- erwork Grey	692 Smoke Grey	693 Aircraft Grey	694 Dove Grey	697 Light Admi- rality Grey	796 Dark Violet	797 Light Violet					

Anexo H. Fotografías

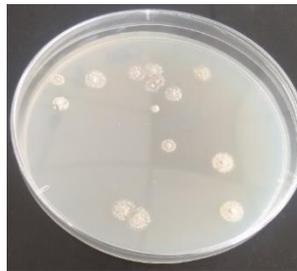
Aislamiento selectivo de actinomicetes mediante DDC



Agar AAC (pH 5,5)
Sobrenadante S₃ en la dilución 1/10



Agar AAC (pH 6,5)
Sobrenadante S₃ en la dilución 1/10



Agar CRA (pH 5,5)
Sobrenadante S₁ en la dilución 1/10

Aislamiento selectivo de actinomicetes mediante el método tradicional



Agar AAC dilución 1/10

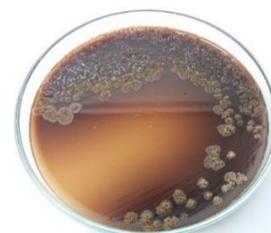


Agar CRA dilución 1/10

Purificación en estría compuesta de actinomicetes

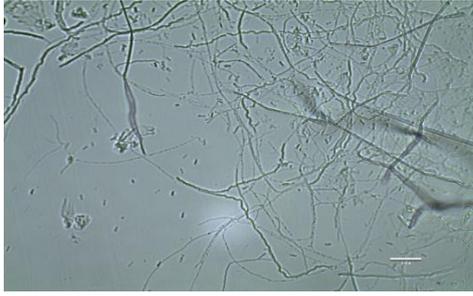


BCE-014 purificado en Agar GYM

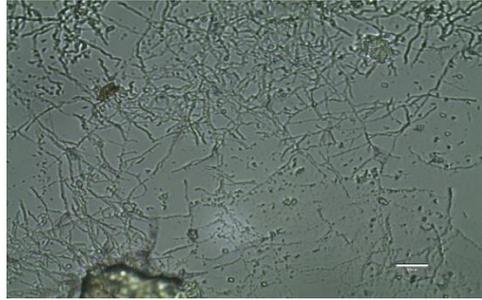


ATL-016 purificado en Agar GYM

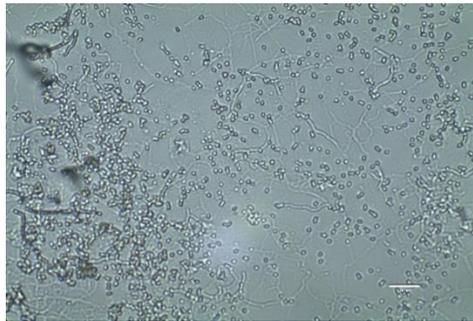
Caracterización microscópica de actinomicetes en medio GYM



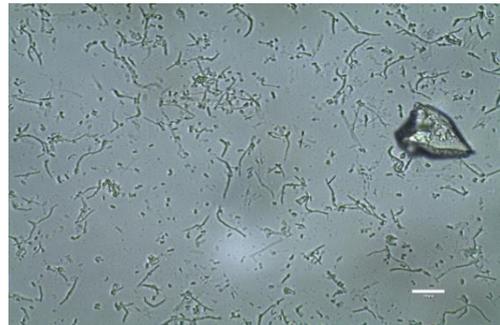
BCE-030 (Flexous)



DE-009 (Cadena recta corta)



JV-022 (Esporas individuales)



DE-040 (Cadena incompleta)