



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

“Determinación preliminar de producción de compuestos bioactivos de actinomicetes y bacterias aislados de ecosistemas glaciares andinos y antárticos”

Trabajo de Titulación modalidad proyecto de investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica De Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autores:

Adriana Patricia Díaz Ortiz

y

María Cristina Estrada Espín

Tutor:

Carlos Alberto Rodríguez Meza, PhD.

Ambato – Ecuador

Marzo – 2018

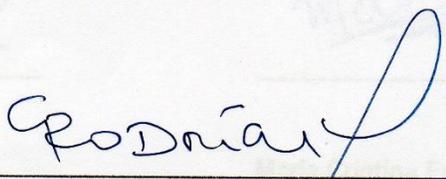
APROBACIÓN DEL TUTOR

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.

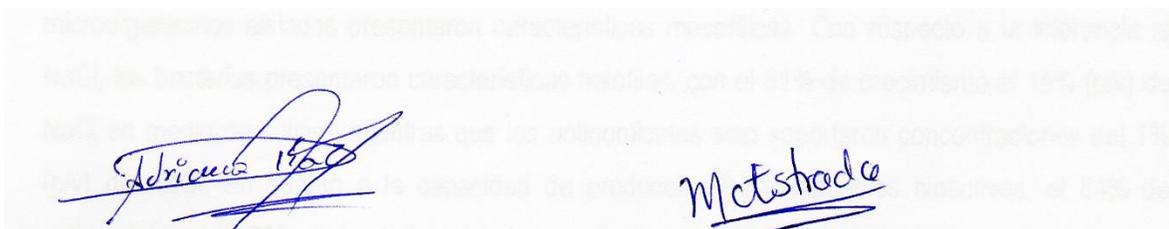
Ambato, 22 de enero de 2018



Carlos Alberto Rodríguez Meza; PhD.
C.C. 1802166502
TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Nosotras, Adriana Patricia Díaz Ortiz y María Cristina Estrada Espín, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingenieras Bioquímicas son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Adriana Patricia Díaz Ortiz

C.C. 0503329146

AUTORA

María Cristina Estrada Espín

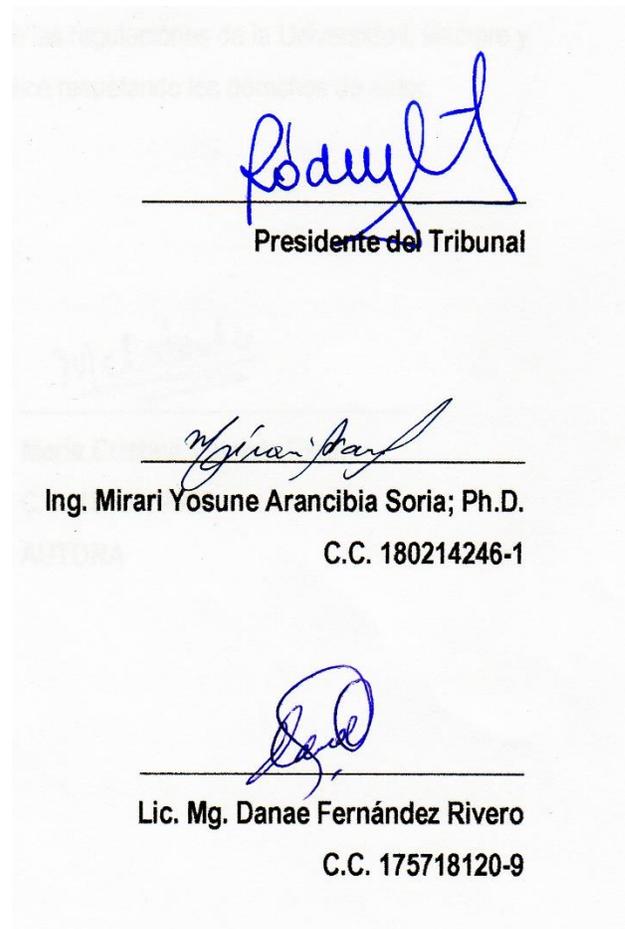
C.C. 1804979977

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS 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 Ciencias e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Ambato, 21 de febrero de 2018

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos 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.

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



Adriana Patricia Díaz Ortiz

C.C. 0503329146

AUTORA



María Cristina Estrada Espín

C.C. 1804979977

AUTORA

DEDICATORIA

Dicen que los triunfos hay que dedicarles a las personas que más se ama en la vida, a los incondicionales, a los que nunca te fallarán ni te dejarán caer por nada del mundo, es por eso que quiero dedicar todo mi esfuerzo a mis padres Patricia Ortiz y Patricio Díaz, gracias por ser mi apoyo incondicional, por sus consejos, enseñanzas día a día y tanto amor, sin ustedes mi vida no tendría sentido

Ami hermano Oscar Díaz, a mis abuelitos: mami Bertha, mi papi Gilo, mi Yoyita y a mi Llomito, él que me cuida desde el cielo y que sin duda alguna me esta viendo ser profesional como tanto quieria.

A mi hijo, Matías Sebastián, a ti negrito, por ser motor y motivo, por enseñarme a luchar y no darme por vencida, por dejarme crecer junto a ti y caminar de tu mano sin importar nada ni nadie. Sin duda alguna eres lo mejor que he hecho en mi vida. Te amo Matías corazón de león.

A mis amigos, aquellos hermanos de vida que fui encontrando en el camino y que me supieron brindar su cariño y ayuda cuando más lo necesitaba, gracias por todo lo vivido amigos. Finalmente a todas las personas que de una u otra manera brindaron su granito de arena para construir este camino.

Con el corazón, Adri.

Dedico orgullosamente este “trabajo” que me ha costado mucho conseguirlo, realizarlo y terminarlo, en primer lugar a la persona que me dio la vida, quien estuvo a mi lado pese a tantos obstáculos, quien confía en mi ciegamente, quien me ha enseñado a caminar sola y demostrarme que no necesito a nadie más para hacerlo, mi amada madre Lorena, mi mejor amiga, mi soporte incondicional.

A ti, mi eterno hombre y amor de mi vida, papi Marcelo, por tanto amor, por darle significado a la palabra padre y por darme tú guía para ser mejor cada día.

Mi pequeño y adorado Tomás, la persona a quien vi crecer, mi amigo fiel y el regalo más hermoso que mis padres me obsequiaron.

Quiero dar realce a mis dos pilares, Zoilita y Graciélita, mis dos mamitas quienes me formaron y me trajeron hasta aquí, quienes fueron, son y serán mi más claro ejemplo de saber regalar amor a quienes me rodean y aprovechar cada oportunidad para hacer lo correcto.

A Tatiana y Katherine, por su lealtad y real amistad.

Finalmente, a ti, mi ángel de la guarda, ese imán de preciosa energía, el eterno resplandor que me recarga y siempre me acompañará en mis buenos momentos y más difíciles batallas.

Aquí queda sentado lo mucho que significan en mi vida y lo presente que están en mis pensamientos.

Con amor, María Cristina

AGRADECIMIENTO

Estamos eternamente agradecidas con nuestra querida alma máter y la FCIAL, por habernos acogido en sus aulas y formarnos no solo profesional sino también personalmente, con tantas vivencias, experiencias y además darnos la oportunidad de encontrarnos en el camino con personas excepcionales que ahora forman parte de nuestra vida, como nuestros queridos amigos, Amy, Danny, Mayrita, Guido, Vini, Gabo, Criso, Juanjo, Sami, Alvin, Darío, Osquitar y especialmente nuestro pequeño David, tu formas parte de esta historia y eres un protagonista de nuestro logro. A nuestro querido amigo Gabriel, gracias por ser la primera persona que nos enseñó verdaderamente qué es ser un profesional, por su soporte, su instrucción, sus consejos y por estar siempre pendiente de todos nuestros pasos. A Gabriela Vinuesa y BIOSEBORGANICS S.A., por haber formado e impulsado nuestro interés por permanecer en la carrera y desarrollar en nosotras el gusto por la Microbiología. A Mirari Arancibia, por brindarnos parte de su conocimiento y además por la colaboración con las cepas de bacterias patógenas que fueron fundamentales en el desarrollo de nuestro proyecto. Creemos que es necesario agradecer a una persona que a nuestro criterio, ha sido la mejor docente que hemos tenido el gusto de conocer y que aparte de su intelecto, su calidad humana es inigualable e intachable, nuestra estimada ingeniera Cecilia Carpio, gracias por sus consejos, paciencia y confianza. Finalmente, a nuestro querido tutor, Carlos Alberto, las palabras se quedan cortas para agradecer en tan solo unas líneas, la apertura que nos dio como estudiantes y por habernos permitido conocer a amigos muy gratos y queridos por nosotras, que nos han acompañado a lo largo de nuestra vida y carrera, estamos eternamente agradecidas por su paciencia y dedicación como nuestro docente, jefe, tutor y más que nada, AMIGO.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

A. PÁGINAS PRELIMINARES

PORTADA	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	viii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi

B. TEXTO

CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	1
1.1 Tema.....	1
1.2 Justificación.....	1
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo General	3
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Antecedentes investigativos.....	5
2.1.1 Biodiversidad microbiana en ecosistemas glaciares.....	5
2.1.2 Generalidades de las bacterias.....	6
2.1.3 Generalidades de los actinomicetes	6
2.1.4 Microorganismos psicrófilos y psicrótrofos.....	8
2.1.5 Importancia Biotecnológica	10
2.2 Hipótesis	11
2.2.1 Hipótesis nula.....	11
2.2.2 Hipótesis alternativa.....	12

2.2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis	12
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	13
3.1 Materiales y métodos	13
3.1.1 Población y muestra.....	13
3.1.2 Caracterización fisicoquímica de las muestras ambientales	14
3.1.2.1 Determinación del pH y conductividad de las muestras.....	14
3.1.2.2 Determinación del porcentaje de humedad de las muestras	14
3.1.2.3 Determinación del porcentaje de materia orgánica (M.O).....	15
3.1.3 Aislamiento selectivo de actinomicetes y bacterias.....	15
3.1.3.1 Determinación de la población y diversidad microbiana	15
3.1.3.2 Aislamiento, purificación y almacenamiento de microorganismos	16
3.1.3.3 Caracterización macroscópica	17
3.1.3.3.1 Caracterización macroscópica de actinomicetes	17
3.1.3.3.2 Caracterización macroscópica de bacterias.....	17
3.1.3.4 Caracterización microscópica	18
3.1.3.4.1 Caracterización microscópica de actinomicetes.....	18
3.1.3.4.2 Caracterización microscópica de bacterias.....	18
3.1.4 Caracterización fisiológica y bioquímica de los aislamientos	19
3.1.4.1 Rango de crecimiento en función de la temperatura.....	19
3.1.4.2 Rango de crecimiento en función del pH	19
3.1.4.3 Rango de crecimiento en función de la salinidad.....	19
3.1.4.4 Producción de enzimas extracelulares.....	20
3.1.5 Determinación de la actividad antimicrobiana	20
3.1.5.1 Preparación de los platos con los microorganismos modelo	20
3.1.5.2 Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica.....	21
3.1.6 Taxonomía numérica de datos fenotípicos.....	21
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1 Análisis e interpretación de los resultados	23
4.1.1 Caracterización físico-química de las muestras ambientales.....	23
4.1.2 Aislamiento selectivo de actinomicetes y bacterias.....	24
4.1.2.1 Bioensayo 1. Aislamiento de microorganismos con pretratamiento	24

4.1.2.2 Bioensayo 2. Aislamiento de microorganismos sin pretratamiento	27
4.1.3 Aislamiento, purificación y almacenamiento de microorganismos.....	31
4.1.4 Caracterización macroscópica	32
4.1.5 Caracterización microscópica	34
4.1.6 Caracterización fisiológica y bioquímica de los aislamientos	35
4.1.7 Determinación de la actividad antimicrobiana	35
4.1.7.1 Actinomicetes.....	35
4.1.7.2 Bacterias.....	39
4.1.8 Taxonomía numérica de datos fenotípicos.....	41
4.2 Verificación de Hipótesis	43
4.3 Discusión de resultados	46
4.4 Discusión general del trabajo	49
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	51
5.1 Conclusiones.....	51
5.2 Recomendaciones	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXOS.....	58
ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.....	58
ANEXO B. ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE SUELO	60
ANEXO C. AISLAMIENTO SELECTIVO Y PRUEBAS FISIOLÓGICAS	61
ANEXO D. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETES Y BACTERIAS AISLADOS DE ECOSISTEMAS GLACIALES	83
ANEXO E. TABLAS DE COLORES.....	91
ANEXO F. FOTOGRAFÍAS.....	96

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales antibióticos producidos por actinomicetes	7
Tabla 2. Temperaturas cardinales de organismos adaptados al frío	8
Tabla 3. Codificación y origen de muestras de suelo provenientes de suelos recolectados en estribaciones de los volcanes Chimborazo y Cotopaxi	13
Tabla 4. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas	18
Tabla 5. Actividad bactericida, fungicida y antimicrobiana de amplio espectro de actinomicetes y bacterias aislados de ecosistemas glaciares	21
Tabla 6. Caracterización Físico-Químico de las muestras	23
Tabla 7. Unidades formadoras de colonias de actinomicetes y bacterias según su origen de aislamiento del Bioensayo 1	27
Tabla 8. Unidades formadoras de colonias de actinomicetes y bacterias según su origen de aislamiento del Bioensayo 2	30
Tabla 9. Diversidad de microorganismos aislados de ecosistemas andinos y antárticos	31
Tabla 10. Diversidad de microorganismos en función de los medios de cultivo	32
Tabla 11. Grupos color formado por los cultivos de actinomicetes aislados de las muestras de medio GYM.....	32
Tabla 12. Grupos color formado por los cultivos de bacterias aislados de las muestras de medio GYM	34
Tabla 13. Actividad bactericida de actinomicetes	35
Tabla 14. Actividad fungicida de actinomicetes	36
Tabla 15. Actividad antagónica de actinomicetes aislados de muestras de suelos antárticos y andinos frente a bacterias patógenas y hongos fitopatógenos.....	37

Tabla 16. Resumen porcentual de Actividad Antimicrobiana de Amplio Espectro de actinomicetes aislados de muestras de suelos antárticos y andinos frente a bacterias patógenas y hongos fitopatógenos	38
Tabla 17. Actividad bactericida de bacterias.....	39
Tabla 18. Actividad fungicida de bacterias.....	39
Tabla 19. Actividad antagónica de bacterias aisladas de muestras de suelos antárticos y andinos frente a bacterias patógenas y hongos fitopatógenos.....	40
Tabla 20. Resumen porcentual de actividad antimicrobiana de amplio espectro de bacterias aisladas de muestras de suelos antárticos y andinos frente a bacterias patógenas y hongos fitopatógenos ..	40
Tabla 21. Grupos fenéticos de cultivos de actinomicetes determinados mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos.....	41
Tabla 22. Grupos fenéticos de cultivos de bacterias determinados mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen	17
Figura 2. Unidades formadoras de actinomicetes según su origen, medio de cultivo y temperatura de aislamiento del Bioensayo 1	25
Figura 3. Unidades formadoras de bacterias según su origen, medio de cultivo y temperatura de aislamiento del Bioensayo 1	25
Figura 4. Unidades formadoras de bacterias y actinomicetes según su origen, temperatura y medio de cultivo de aislamiento del Bioensayo 1	26
Figura 5. Unidades formadoras de actinomicetes según su origen, medio de cultivo y temperatura de aislamiento del Bioensayo 2	28
Figura 6. Unidades formadoras de bacterias según su origen, medio de cultivo y temperatura de aislamiento del Bioensayo 2	29
Figura 7. Unidades formadoras de bacterias y actinomicetes según su origen, temperatura y medio de cultivo de aislamiento del Bioensayo 2	29
Figura 8. Dendrograma UPGMA basado en el análisis de taxonomía numérica de datos fenotípicos usando el coeficiente de simple coincidencia (S_{SM}) para definir grupos fenéticos de actinomicetes, al 90% de similaridad.	44
Figura 9. Dendrograma UPGMA basado en el análisis de taxonomía numérica de datos fenotípicos usando el coeficiente de simple coincidencia (S_{SM}) para definir grupos fenéticos de bacterias, al 90% de similaridad.	45

RESUMEN

A partir de muestras de suelo y arena recolectadas de ecosistemas glaciares del Chimborazo, Cotopaxi y la Antártida, se aislaron setenta y nueve cepas de actinomicetes y treinta y tres bacterias. Se los caracterizó fenotípicamente y se determinó la capacidad de producción de compuestos bioactivos frente a varios microorganismos patógenos. Los resultados fueron analizados mediante taxonomía numérica al 90% de similaridad, dividiendo a los actinomicetes en cuarenta grupos fenéticos y a las bacterias en veintinueve. Cincuenta y cinco actinomicetes fueron aislados de muestras del Chimborazo, dieciséis del Cotopaxi y cuatro de la Antártida. En cuanto a las bacterias diecisiete, catorce y una respectivamente.

Los datos fenotípicos del crecimiento en función de la temperatura mostraron que todos los microorganismos aislados presentaron características mesófilicas. Con respecto a la tolerancia al NaCl, las bacterias presentaron características halófilas, con el 61% de crecimiento al 15% (p/v) de NaCl en medio de cultivo, mientras que los actinomicetes solo soportaron concentraciones del 1% (p/v) de NaCl. En cuanto a la capacidad de producción de compuestos bioactivos, el 84% de actinomicetes y el 70% de bacterias aisladas, presentaron algún tipo de actividad antagónica frente a los microorganismos modelo usados. Los actinomicetes DE002 y DE053 produjeron metabolitos con características bactericidas y las cepas DE006, DE031, DE081, DE083 y DE084 metabolitos fungicidas.

Los datos obtenidos en la presente investigación, demostraron la amplia diversidad metabólica y fenotípica de actinomicetes y bacterias presentes en ecosistemas glaciares. Estudios posteriores son necesarios para explorar su potencial para la producción industrial de compuestos bioactivos.

Palabras clave: actinomicetes, bacterias, glaciares andinos, glaciares antárticos, biocompuestos.

ABSTRACT

Seventy-nine actinomycete and thirty-three bacterial strains were isolated from soil and sand samples collected from glacial ecosystems from Chimborazo, Cotopaxi and Antarctica. Microorganisms were phenotypically characterized and their capacity to produce bioactive compounds against several microorganisms was determined. The results were analyzed by numerical taxonomy at 90% similarity. Actinomycetes were divided in forty phenetic groups, while bacteria were divided in twenty-nine. Fifty-five actinomycetes were isolated from Chimborazo, sixteen from Cotopaxi and four from Antarctica. In relation to bacteria seventeen strains came from Chimborazo, fourteen from Cotopaxi and one from Antarctica.

The phenotypic data related to the growth depending on the temperature, showed that all isolated microorganisms presented mesophilic characteristics. Respect to tolerance to NaCl, 61% bacteria presented growth characteristics over of salt levels up 15% w/v in medium, while actinomycetes only supported concentrations about 1% NaCl. Regarding production capacity of bioactive compounds, 84% of actinomycetes and 70% of bacteria isolated, showed antagonistic activity against the model microorganisms used. The actinomycetes DE002 and DE053 strains produced metabolites with bactericidal characteristics and DE006, DE031, DE081, DE083 and DE084 strains fungicidal metabolites. Bacteria were not able to produce compounds with bactericidal or fungicidal capacity and were only effective for certain species of microorganisms.

Data obtained in the current investigation, demonstrated wide metabolic and phenotypic diversity of actinomycetes and bacteria present in glacial ecosystems. Further studies are necessary to explore its potential for the industrial production of bioactive compounds.

Keywords: actinomycetes, bacteriums, andean glacier, antarctic glacier, biocomposites.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema

Determinación Preliminar de Producción de Compuestos Bioactivos de Actinomicetes y Bacterias Aislados de Ecosistemas Glaciares Andinos y Antárticos.

1.2 Justificación

A inicios del siglo XX, los altos índices de muerte por infecciones microbianas era un problema global cuya cura no era posible, ya que no existía una remota idea de que un ser vivo produzca sustancias que inactiven a otro, o que fueran capaces de matarlo (Belloso, 2002). El descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1929 (Barcat, 2006) y su aplicación terapéutica en los años cuarenta, creó una nueva era en el campo médico. Estos eventos permitieron el establecimiento de una próspera industria farmacéutica, la que ha llegado a conseguir grandes logros tanto en el desarrollo de medicinas útiles para el control de enfermedades causadas por microorganismos patógenos como en el beneficio económico de su comercialización (Procópio, Silva, Martins, Azevedo, & Araújo, 2012). En los años sesenta, cerca del 80% de nuevos antibióticos fueron descubiertos principalmente a partir de varias especies pertenecientes al género *Streptomyces*. Posteriormente se descubrieron otros géneros y especies de actinomicetes (Abdelfattah, Elmallah, Hawas, Abou El-Kassema, & Eid, 2016), los que condujeron hacia el hallazgo de nuevos tipos de metabolitos secundarios con actividad biológica, dando paso a la investigación en compuestos antitumorales, antivirales e inhibidores enzimáticos (Bérdy, 2005).

Desde el punto de vista biotecnológico, los compuestos bioactivos que producen los actinomicetes y bacterias, son muy importantes para el ser humano, animales y plantas, debido a que muchos de éstos metabolitos permiten el control de otros microorganismos altamente patogénicos (Bérdy, 2005). La diversidad microbiana está directamente relacionada con la producción de diferentes tipos de

metabolitos secundarios, los que en muchos casos solo son producidos por determinados grupos de microbios. La diversidad de compuestos bioactivos incluye a agentes antibacteriales provenientes de especies de *Penicillium*, cefalosporinas de *Cephalosporium acremonium*, tetraciclinas y aminoglucósidos producidos por muchos miembros del Orden *Actinomycetales*, ciclosporinas a partir algunas especies de *Trichoderma* y estreptomycin, rifampicina y drogas antiparasitarias de varias especies del género *Streptomyces* (Cragg & Newman, 2013).

Las enfermedades provocadas por microorganismos patógenos a más de provocar la muerte de la población, causa alto impacto económico. En algunos países, cada año, la cantidad de dinero que los diferentes sistemas de salud pública invierten en la prevención y cura de enfermedades infecciosas, se incrementa en un factor de diez (Ministerio De Finanzas, 2016). Si a eso se suman las pérdidas económicas debido al ataque de enfermedades provocadas por microbios fitopatógenos en cultivos de importancia agrícola, la cantidad de dinero que muchos estados invierten y/o pierden puede llegar al 11% del producto interno bruto (PIB) (Banco Central del Ecuador, 2015). Por ejemplo, en el 2015, de 10.4 millones de personas que contrajeron tuberculosis a nivel mundial, 1.8 millones murieron debido al apareamiento de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, al efecto de casi todos los antibióticos que se usan para su control (Arráiz, Bermúdez, & Urdaneta, 2005).

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en Ecuador anualmente se pierden más del 20% de los cultivos por enfermedades que son provocadas por microorganismos fitopatógenos (Arráiz, Bermúdez, & Urdaneta, 2005). En condiciones de poscosecha, el hongo *Botrytis cinerea* puede destruir hasta el 95% de fresas, generando pérdidas económicas significativas para agricultores y comercializadores de la fruta (Cano, 2013). Muchos de los fungicidas usados para el control de *Botrytis* han perdido eficiencia debido a varios factores, entre los que se puede resaltar el uso antitécnico de productos y el apareamiento de cepas resistentes. Estos hechos demuestran que por el uso indiscriminado de pesticidas, se produce el apareamiento de resistencia a muchos compuestos biológicos y sintéticos usados en el control de enfermedades provocadas por microorganismos, por tanto, cada vez son menos las herramientas que pueden ser utilizadas para obtener un control efectivo, que no afecte al ambiente y a los seres humanos (Bressan & Figueiredo, 2005).

Por otro lado, la habilidad que han desarrollado los microorganismos para sobrevivir y crecer en ambientes extremos se debe a adaptaciones fisiológicas y moleculares. El metabolismo de éstos individuos ha evolucionado para permitir que las condiciones ambientales no se conviertan en un limitante para su crecimiento y reproducción, sino las han usado a su favor. Existen evidencias que demuestran que aquellos microbios que provienen de ambientes extremos poseen un metabolismo secundario altamente desarrollado (Goo, Tsuda, & Ulanova, 2014). En la última década, se han descubierto muchos compuestos bioactivos a partir de diferentes grupos de bacterias y hongos que habitan en ambientes extremos (Matsuda, Adachi, Matsuo, Nukina, & Shizuri, 2009). Sin duda, en regiones polares y alpinas, predominan las bajas temperaturas, la poca disponibilidad de agua líquida y una radiación relativamente alta. Estas condiciones producen que varios grupos de microorganismos puedan desarrollarse y posean un metabolismo secundario especial, llegando a constituirse en posibles fuentes de nuevos biocompuestos con potenciales usos biotecnológicos (Cavicchioli, Siddiqui, Andrews, & Sowers, 2002), principalmente para el control de microorganismos patógenos (Rhodes, 2013).

Es por ello que el presente estudio pretende aislar, caracterizar y determinar el potencial para el biocontrol de microbios patógenos, que afectan tanto a seres humanos como a plantas, a partir de muestras de suelo de ecosistemas polares como los de la Antártida y andinos de alta montaña que se encuentran en las estribaciones de los volcanes Chimborazo y Cotopaxi. Este trabajo permitirá ampliar la colección de cultivos de microorganismos provenientes de ecosistemas polares y andinos, que ya se encuentra establecida en el grupo de investigación en Biotecnología Microbiana, de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, de la Universidad Técnica de Ambato, así como también tener la posibilidad para explorar nuevas fuentes de metabolitos secundarios útiles en biotecnología.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar la capacidad biocontroladora de actinomicetes y bacterias aislados de ecosistemas glaciares en contra de microorganismos perjudiciales para la industria alimentaria y agrícola.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Ampliar el banco de germoplasma existente de bacterias y actinomicetes psicrófilos y psicrótrofos mediante aislamiento y purificación de nuevas cepas.
- Caracterizar fenotípicamente microorganismos aislados de muestras de ecosistemas glaciares (actinomicetes y bacterias) mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas.
- Identificar actinomicetes y bacterias con bioactividad en contra de microbios perjudiciales mediante pruebas de antagonismo.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

2.1.1 Biodiversidad microbiana en ecosistemas glaciares

En la Antártida, la diversidad microbiana ha evolucionado para lograr adaptarse, sobrevivir y conservarse por las condiciones extremas que posee, como sus bajas temperaturas, alta exposición a radiación solar, bajo suministro de nutrientes y agua y altas concentraciones de sal, siendo de ésta manera, un ecosistema con características potenciales para investigaciones (Rhodes, 2013). Por otro lado, en América del Sur se encuentra la cordillera de los Andes, que es uno de los accidentes geográficos con la mayor parte de nevados, volcanes, fallas geológicas y páramos en el mundo (Luteyn, 1999). Ecuador posee éste hábitat extremo (Luteyn, 1999), siendo su referente la cordillera de los Andes, que acoge a los volcanes Cotopaxi y Chimborazo. El primero se encuentra en el Parque Nacional Cotopaxi y el segundo en la Reserva de Producción de Fauna Chimborazo (Ministerio del Ambiente, 2015). Dichas áreas, se encuentran expuestas a la intervención del hombre, debido a que a diario reciben a miles de turistas de todo el mundo. Sin embargo, pese a esta influencia, ha sido posible encontrar varias especies de fauna, flora y principalmente microbiota, gracias al estudio de actinomicetes y bacterias, en investigaciones previas (Villacís & Rodríguez, 2015). Es así que, en este tipo de ambientes con temperaturas bajas, ha sido posible el desarrollo de microorganismos característicos de clima frío como son los psicrótrofos que viven en temperaturas entre los 0 y 7°C con una temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 40 °C (Comerio, Tarapow, Vázquez, & Mac Cormack, 2007) y los psicrófilos, los cuales se desarrollan en temperaturas por debajo de los 5°C y mueren si se los expone a temperatura ambiente (Ramírez, Serrano, & Sandoval, 2006).

En los ambientes fríos existe una amplia biodiversidad microbiana, principalmente bacterias y levaduras (Garzón & Rodríguez, 2013). La adaptación evolutiva de los microorganismos a condiciones climáticas extremas posiblemente permite el desarrollo de vías metabólicas primarias y secundarias

para soportar bajas temperaturas, mediante adaptaciones en su membrana celular y proteínas anticongelantes (Rhodes, 2013) como por ejemplo *Pseudoalteromonas*, *Arthrobacter* o *Penicillium* (Ramírez et al., 2006).

2.1.2 Generalidades de las bacterias

Las bacterias son microorganismos ubicuos que habitan en todos los ecosistemas de la tierra, incluso en los más extremos, debido a que muchas tienen la capacidad de producir endosporas que les permite soportar dichas condiciones (Nicholson, Munakata, Horneck, Melosh, & Setlow, 2000). Las bacterias son microorganismos que se dividen en dos grupos: gram positivas y gram negativas, las cuales se diferencian entre sí por la estructura de su pared celular, compuesta de una capa rígida llamada peptidoglicano (Silhavy, Kahne, & Walker, 2010). Dichas distinciones se pueden evidenciar mediante la tinción de Gram. La capa en las bacterias gram positivas es más gruesa, con un porcentaje de peptidoglicano del 90%, mientras que en bacterias gram negativas el porcentaje es tan solo del 10% y el resto se encuentra constituido por una membrana compuesta de lipopolisacáridos (Silhavy et al., 2010).

Existen investigaciones en muestras de hielo y agua de la Antártida, donde se han encontrado especies de bacterias psicrófilas como aquellas pertenecientes a las clases γ -proteobacteria (*Colwellia*, *Glacieola*, *Marinobacter*, *Moritella*, *Psychobacter*, *Psychromonas*, *Shewanella*, *Vibrio*), y psicrótrofas pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Halobacillus*, *Pseudomonas* y *Psychrobacter* (D'Amico, Collins, Marx, Feller, & Gerday, 2006).

2.1.3 Generalidades de los actinomicetes

Los actinomicetes son bacterias filamentosas gram positivas y aerobias, que presentan micelio aéreo parecido al de los hongos. Son heterótrofos porque utilizan compuestos carbonados y nitrogenados como los polisacáridos. Ayudan a la solubilización y absorción del fósforo para las plantas e intervienen en la fijación de nitrógeno que favorece el desarrollo vegetativo (González, 2010).

Los metabolitos secundarios que producen los actinomicetes son moléculas pequeñas que pueden ser antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos, pesticidas, entre otros, catalogados como compuestos orgánicos de interés biotecnológico (Evangelista & Moreno, 2007). Existen más de 23000 metabolitos conocidos, de los cuales el 42% son producidos por hongos, 32% lo producen actinomicetes y el porcentaje restante son producidos por otras bacterias (Bérdy, 2005). Los antibióticos poseen propiedades únicas, ya que inhiben el crecimiento bacteriano a bajas concentraciones siendo potentes biocontroladores, con más de 8000 antibióticos estudiados reportados, de los cuales el 46% son producidos por actinomicetes, 21% lo producen los hongos, 17% por bacterias y el 16% por otro tipo de actinomicetes (Srividya, Saritha, & Suresh, 2008).

Existe una gran variedad de antibióticos producidos por actinomicetes, como se encuentran reportados en la Tabla 1. *Streptomyces* es el género más utilizado en la producción de metabolitos secundarios ya que es de fácil aislamiento (Bressan & Figueiredo, 2005) y amplia capacidad de producción de antibióticos, lo que los convierte en microorganismos potenciales para intereses industriales, por tal motivo han sido explotados desde 1944 con la estreptomycinina (Procópio et al., 2012).

Tabla 1. Principales antibióticos producidos por actinomicetes

Clasificación	Antibiótico	Acción
β-Lactámicos	Cefoxitina	Inhibe la síntesis de la pared celular.
Aminoglucósidos	Esteptomycinina	Inhibe la síntesis de proteínas, específicamente la unión en la subunidad ribosomal 30S.
Tetraciclinas	Tetraciclina	Inhibe la síntesis de proteínas, específicamente la unión en la subunidad ribosomal 30S.
Macrólidos	Eritromycinina	Inhibe la síntesis de proteínas, específicamente la unión en la subunidad ribosomal 50S.
Polienos	Amfotericina B	Alteración de la permeabilidad en la membrana.
Glicopéptidos	Vancomycinina	Inhibe la síntesis de la pared celular.
Rifamicinas	Rifampicinina	Inhibición de síntesis de ARN en la unión a la ARN polimerasa.
Fenicoles	Cloranfenicol	Inhibe la síntesis de proteínas, específicamente la unión en la subunidad ribosomal 50S.

Tabla 1. (Continuación)

Azúcares complejos	Lincomicina	Inhibe la síntesis de proteínas, específicamente la unión en la subunidad ribosomal 50S.
---------------------------	-------------	--

Fuente: Evangelista & Moreno, 2007.

Tomando en cuenta que muchos de los antibióticos descubiertos han sido obtenidos de microorganismos difíciles de cultivar, que crecen muy lentamente o inclusive que no se pueden volver a cultivar, los actinomicetes son una excelente alternativa como productores de antibióticos en altas cantidades y con condiciones de crecimiento fáciles de manejar (Evangelista & Moreno, 2007).

2.1.4 Microorganismos psicrófilos y psicrótrofos

El planeta tiene un 80% de ambientes fríos, como las regiones polares, las zonas montañosas y aguas profundas que pueden llegar a alcanzar los 5 °C durante el invierno y representan una larga porción de ecosistema para microorganismos con resistencia a bajas temperaturas (Cowan, Casanueva, & Stafford, 2007).

Los microorganismos con tolerancia al frío han sido clasificados en dos grupos: psicrófilos y psicrótrofos o psicrotolerantes, cuyas diferencias fenotípicas han sido comparadas en la Tabla 2 de acuerdo a sus propiedades de crecimiento en ambientes fríos (Cowan et al., 2007).

Tabla 2. Temperaturas cardinales de organismos adaptados al frío

Clase	T_{min}	T_{opt}	$T_{máx}$
Psicrófilos	< 0	15	20
Psicrótrofos	> 0	> 20	> 30

Temperatura mínima, óptima y máxima de crecimiento de microorganismos expresados en grados centígrados.

Fuente: Cowan et al., 2007.

Los microorganismos que crecen a 0°C han sido separados en dos categorías, obligados y facultativos. Los obligados estrictamente necesitan de una temperatura óptima o de un rango no muy alejado para

desarrollarse, capaces de crecer a 0°C pero no a 32°C, mientras que los facultativos se desarrollan en rangos amplios de temperatura, es decir que pueden crecer a 0 y a 32°C (Morita, 1975).

Los organismos psicrófilos debido a las adaptaciones moleculares y fisiológicas que solo ellos lo poseen, han desarrollado capacidades para sobrevivir a bajas temperaturas y proliferar en ambientes fríos. Entre sus cambios incluyen: alta actividad enzimática, disminución de la fluidez de la membrana ya que tiende a rigidificarse cuando la temperatura baja, transporte alterado de nutrientes y productos de desecho, disminución de la velocidad de transcripción, traducción y división celular, desnaturalización y plegamiento inadecuado de proteínas por el frío y formación de hielo intracelular (D'Amico et al., 2006). Dichas adaptaciones han sido observadas en *Moritella profunda*, un microorganismo anaerobio facultativo, prototrófico y psicrófilo estricto con un rango de temperatura de crecimiento de 2 a 12°C bajo presión atmosférica, y una velocidad máxima de crecimiento a 2°C; capaz de degradar calatasas, citocromo oxidasa, ADNasa y lipasa (Xu et al., 2003), lo que indica que a una baja temperatura, algunas enzimas muestran una conformación alterada que afecta el flujo metabólico de los microorganismos (D'Amico et al., 2006).

Las enzimas psicrófilas, mesófilas y termófilas tienen una actividad específica en sus temperaturas óptimas y son fácilmente inactivadas a temperaturas elevadas (Cavicchioli et al., 2002). Las propiedades termales de los psicrófilos pueden ser tomadas dentro de la clasificación bacteriana si se acepta la hipótesis que los psicrófilos evolucionaron a partir de los mesófilos (Morita, 1975).

Los suelos minerales del Valle Seco de la Antártida contienen bajos niveles de microorganismos. Las bacterias fáciles de aislar del lugar son encontradas en la superficie, por tal razón, la mayoría de microorganismos de este ecosistema son heterótrofos aeróbicos (Chan, Van Nostrand, Zhou, Pointing, & Farrell, 2013). Las levaduras son relativamente abundantes en las superficies de ciertos suelos húmedos de la Antártida, pero las bacterias también muestran una amplia diversidad (Cowan et al., 2007).

En un estudio filogenético realizado en suelo mineral recolectado de la Estación de McMurdo en la Isla de Ross (Antártida Oriental), fueron identificados filotipos pertenecientes a *Actinobacteria* (12.5%), *Bacteroidetes* (25%), *Firmicutes* (12.5%), *Planctomicetes* (12,5%) y *Proteobacterias* (37,5%) (Cowan

et al., 2007). Según Navas & Rodríguez (2016), en este tipo de ecosistemas es posible encontrar actinomicetes que pertenecen al género *Streptomyces*, como aquellas pertenecientes al género *S. fildesensis*, *S. griseus*, *S. olivochromogenes* y *S. sannanensis*.

2.1.5 Importancia Biotecnológica

Las aplicaciones biotecnológicas de organismos psicrófilos y sus productos son de alcance limitado. Sin embargo, su evolución para la supervivencia y adaptación a ambientes extremos ha permitido el desarrollo de propiedades únicas como su elevada actividad enzimática a bajas temperaturas que han sido enfocadas hacia nuevas tecnologías como precursoras de energía eficiente y sistemas verdes (Cowan et al., 2007).

Las enzimas de organismos psicrófilos tienen gran valor biotecnológico gracias a su alta actividad catalítica a bajas temperaturas, su alta termohabilidad a elevadas temperaturas y su capacidad para reaccionar con solventes orgánicos (Cavicchioli et al., 2002). Gerday et al. (2000) menciona que al ser enzimas más productivas que las mesófilas o termófilas, proveen mayores beneficios económicos ya que proporcionan más ahorro de energía en los procesos industriales, como en la fabricación de detergentes, pastelería y hasta en biología molecular.

Existen actinomicetes y bacterias que no representan una amenaza para los seres humanos, plantas o animales, al contrario, combate a todo aquello que pueda causarlos daño y a su vez aporta beneficios para ellos (Benavides, Ulcuango, Yépez, & Tenea, 2016), por tal razón, son utilizados en la industria alimenticia, agraria, farmacéutica, entre otras (Benavides et al., 2016).

El mejoramiento de la calidad del suelo debido a la producción de antibióticos contra agentes patógenos convierte a los actinomicetes en microorganismos de gran interés biotecnológico en el ámbito agrícola (Crawford, Lynch, Whipps, & Ousley, 1993), siendo así representantes de una potencial alternativa orgánica productora de metabolitos secundarios que promueven eficazmente el crecimiento vegetal, como el ácido indol acético, las giberelinas y los sideróforos que no ocasionan daños en el ambiente y la salud humana (González, 2010).

Las especies del género *Streptomyces* producen alrededor de 150000 productos naturales que en su mayoría son metabolitos secundarios, por ejemplo, existen casi 20 rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios a partir de *Streptomyces coelicolor* (Fernández, Lombó, Méndez, & Salas, 1996) y *Streptomyces avermitilis* (Rodríguez, Olano, Vilches, Méndez, & Salas, 1993).

El grupo de *Streptomyces* que degrada diazinón ha sido ampliamente utilizado en la agricultura ya que utiliza como única fuente de carbono los residuos de pesticidas organofosforados, como los clorpirifos (CP), lo que significa que con el uso de estos microorganismos se puede practicar una agricultura responsable y eliminar el uso de pesticidas químicos (Briceño et al., 2016).

También es importante mencionar que la actividad de los metabolitos producidos por actinomicetes es de amplio espectro presentando características antimicrobianas y antifúngicas, es así que se extienden antagónicamente a patógenos como *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus* y *E. coli*; además presentan actividad moderada frente a *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *A. niger* y casi nula contra *Penicillium* (Wadetwar & Patil, 2013).

Las bacterias representan una amplia fuente de productos naturales como la producción de tetraciclina que es una de las clases más importantes de antibióticos y la antraciclina que es un potente componente anticancerígeno (Beloso, 2002). La bacteria fijadora de nitrógeno *Burkholderia trópica*, aislada de la rizósfera, tallo y la raíz de plantas de maíz y caña de azúcar; posee una capacidad diazótrofa que permite ubicarla como una bacteria que promueve el crecimiento vegetal, ya que produce sideróforos, exo-heteropolisacáridos y solubilizadores de fosfatos. Por tal motivo, es usada como biocontrol para algunos fitoparásitos, lo que la convierte en una bacteria prometedora en el sector agrícola (Bolívar, Contreras, & Teherán, 2016)

2.2 Hipótesis

2.2.1 Hipótesis nula

Los actinomicetes y bacterias cultivados a partir de suelos de ecosistemas glaciares Andinos y Antárticos no poseen una gran diversidad biológica y metabólica.

2.2.2 Hipótesis alternativa

Los actinomicetes y bacterias aislados de suelos de ecosistemas glaciares Andinos y Antárticos poseen una gran diversidad biológica y metabólica.

2.2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis

- Número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de suelo seco (ufc/g).
- Diversidad de colonias en los medios de cultivo.
- Aislamiento y purificación de actinomicetes procedentes de muestras de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo.
- Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos.
- Pruebas de crecimiento a diferente temperatura, pH y salinidad.
- Producción de metabolitos secundarios.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Población y muestra

Muestras de suelo y arena fueron recolectadas en el verano antártico correspondiente a los años 2010, 2011 y 2012, durante la XIV, XV, XVI Expediciones Ecuatorianas a la Antártida, en las islas Greenwich y Dee, pertenecientes al conjunto de las islas Shetland del Sur (Anexo B1). Además, se recolectaron muestras en los volcanes Chimborazo y Cotopaxi, el 8 y 16 de octubre del 2016, respectivamente. Mediante el uso de una pala estéril se procedió a tomar muestras de la rizósfera de plantas que comúnmente crecen en las estribaciones de éstas montañas, en un transecto ascendente, a diferentes alturas. Los suelos fueron recolectados a partir de la rizósfera de oreja de conejo (*Senecio canescens*) y chuquiragua (*Chuquiraga jussieu*). Las muestras de suelo de las rizósferas de estas plantas, fueron homogeneizadas mediante el uso de un mortero y pistilo estériles y colocadas en un contenedor estéril. Las muestras fueron agrupadas en función de rangos específicos de altura, tal como se presenta en la Tabla 3. Las muestras compuestas fueron usadas tanto en la caracterización fisicoquímica de los suelos como para el aislamiento y purificación de bacterias y actinomicetes.

Tabla 3. Codificación y origen de muestras de suelo provenientes de suelos recolectados en estribaciones de los volcanes Chimborazo y Cotopaxi

Código	Fuente	Coordenadas	Altura (msnm)	Código	Fuente	Coordenadas	Altura (msnm)
CH0				CX0			
• H1	Chuquiragua	1° 28' 36" S; 78° 51' 4" O	4779,3	• X1	Chuquiragua	0° 39' 2" S; 78° 26' 11" O	4555,1
• H2	Orejas de Conejo	1° 28' 36" S; 78° 51' 4" O	4779,2	• X15	Orejas de Conejo	0° 39' 2" S; 78° 26' 11" O	4555,1

Tabla 3. (Continuación)

CH1					CX1				
• H5	Orejas de Conejo	1° 28' 24" S; 78° 50' 44" O	4864,1		• X3	Orejas de Conejo	0° 39' 36" S; 78° 26' 11" O	4669,4	
C7	Chuquiragua	1° 28' 23" S; 78° 50' 44" O	4865,5		• X5	Chuquiragua	0° 39' 36" S; 78° 26' 11" O	4669,4	
CH2					CX2				
• H13	Chuquiragua	1° 28' 16" S; 78° 50' 35" O	4944,2		• X9	Orejas de Conejo	0° 39' 45" S; 78° 26' 11" O	4779,7	
H14	Orejas de Conejo	1° 28' 16" S; 78° 50' 35" O	4944,2		X11	Chuquiragua	0° 39' 45" S; 78° 26' 11" O	4779,7	
CH3					CX3				
• H11	Orejas de Conejo	1° 28' 16" S; 78° 50' 32" O	4980,4		• X12	Orejas de Conejo	0° 39' 47" S; 78° 26' 12" O	4805,2	
					X13	Chuquiragua	0° 39' 47" S; 78° 26' 12" O	4805,2	

Datos de muestras de suelo recolectadas a diferentes alturas (medida en metros sobre el nivel del mar) de la rizósfera de plantas (Chuquiragua y orejas de conejo) de volcanes Chimborazo (CH) y Cotopaxi (CX), y sus coordenadas medidas en grados.

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017

3.1.2 Caracterización fisicoquímica de las muestras ambientales

3.1.2.1 Determinación del pH y conductividad de las muestras

Para determinar el pH y conductividad eléctrica, se pesaron 20 gramos de cada muestra y se colocaron en un vaso de precipitación de 100 mL con 50 mL de agua destilada, a continuación las muestras fueron homogenizadas durante 5 minutos y se dejaron en reposo por una hora. Una vez transcurrido ese tiempo, se tomaron lecturas de pH y conductividad por triplicado y se reportó el promedio.

3.1.2.2 Determinación del porcentaje de humedad de las muestras

Para determinar el porcentaje de humedad, primero se pesaron las cápsulas de porcelana y se colocaron en éstas, 5 gramos de suelo, finalmente el peso total fue registrado (Peso 1).

Las cápsulas de porcelana con las muestras se colocaron en una estufa a 105°C por 24 horas. Una vez fría la muestra se pesó nuevamente (Peso 2), restando el peso de las cápsulas. El porcentaje de humedad se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{Peso_1 - Peso_2}{Peso_2} \times 100$$

3.1.2.3 Determinación del porcentaje de materia orgánica (M.O)

Para la determinación del porcentaje de materia orgánica, se pesaron las cápsulas de porcelana vacías y secas, en cada una se colocaron 5 gramos de suelo de cada muestra, posteriormente se llevaron a la estufa a 105°C por 24 horas. Cuando se enfriaron las muestras se pesaron nuevamente (Peso 1). Las cápsulas de porcelana con las muestras procedentes de la estufa se colocaron en una mufla a 400°C por 3 horas. Cuando las muestras se enfriaron se obtuvo el peso final (Peso 2). El porcentaje de materia orgánica se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%M.O = \frac{Peso_1 - Peso_2}{Peso_2} \times 100$$

Para calcular el porcentaje de materia orgánica únicamente se registraron los pesos de agua y suelo de las muestras, por lo que el peso de la cápsula de porcelana fue restado.

3.1.3 Aislamiento selectivo de actinomicetes y bacterias

3.1.3.1 Determinación de la población y diversidad microbiana

Se realizaron dos bioensayos. En el Bioensayo 1 se preparó la dilución 1/10 con 5 gramos de suelo y se colocó en una botella que contenía 45 mL de agua de llave estéril, además se realizó un pretratamiento térmico a 55°C por 6 minutos para evitar el crecimiento de hongos filamentosos, y se agitaron las suspensiones por 1 hora. Para el Bioensayo 2, se pesó 4 gramos de suelo y se colocó en una botella que contenía 10 mL de agua de llave estéril, se omitió el pre tratamiento térmico con el fin de incrementar la probabilidad de aislamiento de microorganismos psicrótrofos y psicrófilos. A partir de dicha suspensión, se preparó la dilución 1/10². Se colocó 100 µL de cada dilución, por duplicado, en cajas petri con agar avena (AA), agar almidón caseína (AAC), agar extracto de suelo (AES) y agar glucosa, extracto de levadura y malta (GYM), suplementados con nystatin a una concentración de 75 µg/mL y rifampicina 10 µg/mL y a un pH de 6.8. La alícuota tomada de la dilución se extendió por la superficie de cada caja petri con la ayuda de un asa estéril. Las cajas fueron incubadas a 8 y 26°C durante 3 semanas. Finalmente, se contó el número de colonias de actinomicetes y bacterias presentes en cada caja. El número de unidades formadoras de colonias (ufc/gramo de suelo) fueron

calculadas para aquellas diluciones en las que el número de colonias se encontraban en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente formula:

$$\frac{ufc}{g} \text{ de suelo} = \frac{N \times FC \times Vt}{Vi \times S}$$

Donde:

- UFC** Unidades formadoras de colonias
- N** Número de colonias
- FD** Dilución en la cual se contó N
- Vt** Volumen de la dilución 1/10, en mililitros
- Vi** Volumen inoculado, en mililitros
- S** Cantidad de suelo utilizada para preparar la dilución 1/10

Posteriormente se calculó el número de ufc/g de suelo seco tomando en cuenta los datos de humedad de suelo de cada muestra.

3.1.3.2 Aislamiento, purificación y almacenamiento de microorganismos

Los medios de cultivo que presentaron crecimiento visible y diversidad de colonias fueron utilizados para el aislamiento y purificación de actinomicetes y bacterias. Con la ayuda de un palillo estéril, se tomó una porción de una colonia para inocularla mediante estría simple en cajas tripetri que contenían el medio de cultivo donde creció cada colonia. Los platos inoculados fueron incubados a la temperatura usada en la fase anterior, es decir, a 8 o 26°C, por 72 horas o 15 días, si son bacterias o actinomicetes, respectivamente. Los actinomicetes y bacterias que presentaron características de cultivo puro, fueron repicados mediante estría compuesta, etiquetados y almacenados en tubos crioviales plásticos que contengan 1 mililitro de glicerol al 20% (p/v) a -10°C para su preservación.

3.1.3.3 Caracterización macroscópica

3.1.3.3.1 Caracterización macroscópica de actinomicetes

Los cultivos puros de actinomicetes fueron sembrados en agar GYM y agar avena, cuando hubo crecimiento fueron agrupados de acuerdo a sus características fenotípicas, como la coloración del micelio aéreo, micelio de sustrato y pigmento difusible de acuerdo a tablas estándar de colores: British Standard Specification for Colours for Identification Coding and Special Purposes (Anexo E), estableciendo grupos color mediante la determinación de similitud en sus pigmentaciones.

3.1.3.3.2 Caracterización macroscópica de bacterias

Los cultivos puros de bacterias fueron sembrados en agar GYM, cuando hubo crecimiento se agrupó de acuerdo a sus características fenotípicas como la forma, elevación, margen, superficie, características ópticas, consistencia y color de acuerdo a tablas estándar de colores: British Standard Specification for Colours for Identification Coding and Special Purposes y se describió sus características generales como se encuentra en la Figura 1. Fueron ubicados en el mismo grupo, todas las cepas que presentaron características macroscópicas similares.

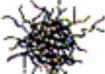
Forma	 Circular	 Irregular	 Lentijuela	 Filamentosa	 Rizoide
Elevación	 Plana	 Convexa	 Umbonada		
Margen	 Entero	 Ondulado	 Lobado	 Filamentoso	 Rizado

Figura 1. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen

Fuente: Garzón & Rodríguez, 2013.

3.1.3.4 Caracterización microscópica

3.1.3.4.1 Caracterización microscópica de actinomicetes

Para la determinación de la morfología de las cadenas de esporas en los cultivos que presentaron micelio aéreo, se colocó un cubreobjetos estéril sobre el cultivo con la ayuda de una pinza estéril. Después, se colocó el cubreobjetos con el micelio y adherido en un portaobjetos de manera que el micelio quede en contacto con el portaobjetos. El tipo de estructura fue determinado usando un microscopio con el lente de 100X con aceite de inmersión, utilizando las características que se encuentran en la Tabla 4 (Villacís & Rodríguez, 2015).

Tabla 4. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas 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	Esporas simples	Esporas individuales aparecen en las hifas del micelio aéreo.

Fuente: Curipallo & Rodríguez, 2011.

3.1.3.4.2 Caracterización microscópica de bacterias

Para determinar el grupo al que pertenecen las bacterias (gram positivas o gram negativas), se realizó la tinción diferencial por el método de Gram. Se colocó una gota de agua destilada en el cubre objetos y con la ayuda de un asa de transferencia; posteriormente, se tomó una muestra de células puras de bacterias y se realizó el frotis fijándolo con calor; después, se tiñó durante 1 minuto con cristal violeta y se lavó con agua; finalmente, la solución yodada se colocó por 1 minuto y se lavó de nuevo con agua, se decoloró con alcohol etílico y se enjuagó; la safranina (color de contraste) también fue

colocada durante 1 minuto y se enjuagó con agua por última vez. En el microscopio, las bacterias tuvieron diferencias entre gram positivas y gram negativas (Santambrosio & Ortega, 2009).

3.1.4 Caracterización fisiológica y bioquímica de los aislamientos

3.1.4.1 Rango de crecimiento en función de la temperatura

10 μ L de suspensiones de esporas se inocularon sobre la superficie del plato con agar GYM y se incubó a 4, 20 y 26°C, el crecimiento de los actinomicetes fue evaluado mediante código binario, asignando 1 si presentó crecimiento visible, o caso contrario 0 en ausencia de crecimiento. Un actinomicete fue considerado como psicrófilo si creció solamente a 4°C, psicrótrofo aquellos que crecieron en las tres temperaturas y fueron mesófilos si crecieron a 20°C y 26°C (Villacís & Rodríguez, 2015).

3.1.4.2 Rango de crecimiento en función del pH

Se inoculó 10 μ L de las suspensiones de esporas en la superficie del plato con agar GYM y se ajustó a los pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5 mediante sistema de búfers. Las cajas fueron incubadas durante una semana a 20°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se evaluó el crecimiento de los actinomicetes mediante código binario. A la presencia de crecimiento se le asignó 1 y a la ausencia de crecimiento 0 (Villacís & Rodríguez, 2015).

3.1.4.3 Rango de crecimiento en función de la salinidad

Se inoculó 10 μ L de las suspensiones de esporas en la superficie de cada medio de cultivo en agar GYM, que contenía 1, 10 y 15% de NaCl (p/v). Las cajas fueron incubadas durante una semana a 20°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se evaluó el crecimiento de los actinomicetes mediante código binario. A la presencia de crecimiento se le asignó 1 y en ausencia de crecimiento, 0 (Villacís & Rodríguez, 2015).

3.1.4.4 Producción de enzimas extracelulares

La capacidad de producción de enzimas hidrolíticas se determinó mediante la utilización de los carbohidratos almidón, celulosa y quitina. Fueron inoculados 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de cada medio de cultivo basal, que contenían los polisacáridos mencionados anteriormente, con una concentración final de 1% (p/v) de cada uno de ellos. Las cajas fueron incubadas durante 48 horas a 20°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se evaluó el crecimiento de un halo alrededor del sitio de inoculación, cubriendo la superficie de la caja con lugol, el cual permitió observar la acción de las enzimas. Finalmente, se evaluó mediante código binario, se le asignó a la presencia de halo 1 y a su ausencia, 0 (Curipallo & Rodríguez, 2011).

3.1.5 Determinación de la actividad antimicrobiana

3.1.5.1 Preparación de los platos con los microorganismos modelo

Las cepas puras de hongos fitopatógenos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fueron cultivadas en agar papa dextrosa (PDA) y posteriormente incubadas a 28°C durante 4 días. Las cepas puras de bacterias patógenas *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* fueron cultivadas en agar nutritivo (AN) e incubadas a 20 y 26°C respectivamente a su temperatura de crecimiento durante 24 horas.

Luego de observar esporulación y/o crecimiento visible de colonias, se prepararon suspensiones con las estructuras reproductivas de los hongos y bacterias, en un tubo de ensayo con 9 mL de solución salina estéril. Con la ayuda de un hemocitómetro, en el caso de hongos, y una placa para conteo de bacterias (Cámara de Petroff – Hausser), se determinó la concentración inicial de cada uno de los microorganismos. Finalmente, se calculó el volumen de inóculo necesario para obtener concentraciones finales de 1×10^5 células/mL para las bacterias, y 1×10^3 esporas/mL para los hongos fitopatógenos y levadura (Villacís & Rodríguez, 2015).

3.1.5.2 Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica

Un sacabocados de 6 mm de diámetro fue utilizado para extraer bloques cilíndricos del micelio de cada cultivo puro de actinomicetes y bacterias, los bloques pertenecientes a actinomicetes y bacterias diferentes fueron depositados sobre la superficie de los platos de cultivo con los microorganismos modelo, situando la parte del micelio del actinomicete en contacto con el medio para permitir una mejor difusión de los posibles metabolitos producidos. Posteriormente, se colocaron 10 µL de nystatin (75 µg/mL) y rifampicina (3.33 µg/mL), como control experimental para los ensayos de hongos y bacterias, respectivamente. Los platos preparados se incubaron a 20°C por 7 días, y para la determinación de los perfiles de actividad biológica se midieron los diámetros, tanto polar como ecuatorial, de las zonas de inhibición, en milímetros, de aquellos actinomicetes que mostraron actividad antimicrobiana (Villacís & Rodríguez, 2015). Para determinar si un microorganismo cumple o no con un mecanismo de biocontrol, se consideró un margen mayor o igual al 80% del control del total de los patógenos utilizados (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad bactericida, fungicida y antimicrobiana de amplio espectro de actinomicetes y bacterias aislados de ecosistemas glaciares

	Actividad bactericida	Actividad fungicida	Actividad antimicrobiana de amplio espectro
Parámetro	$\geq 80\%$ del total de bacterias patógenas	$\geq 80\%$ del total de hongos y levaduras fitopatógenos	$\geq 80\%$ del total de microorganismos patógenos

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

3.1.6 Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Con los datos obtenidos en las pruebas fenotípicas, se construyó una matriz datos en código binario, colocando 1 a la presencia de una característica y 0 a su ausencia. Esta información se procesó en el software estadístico NTSys, donde se calcularon los porcentajes de similaridad, usando el coeficiente de similaridad simple (S_{SM}) y Jaccard. Estos porcentajes se utilizaron para construir dendrogramas, usando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) del mismo programa. Una vez obtenidas las gráficas, se identificaron los grupos especie basados en una

similaridad al 90%. Aquellas que comparten este valor de similaridad se consideraron como miembros de un mismo grupo-especie (Cevallos & Rodríguez, 2014).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis e interpretación de los resultados

4.1.1 Caracterización físico-química de las muestras ambientales

La Tabla 6 indica los valores de humedad, donde el porcentaje más alto corresponde a la muestra CH2 con 17.3% y el menor pertenece a la muestra CX1 con 0.1%. Los valores de pH indican que la muestra más ácida fue determinada para CH2 con 5.80, mientras que el valor más alto fue para CX3 con 6,37. En relación al contenido de materia orgánica, la muestra CH2 presentó el 30,6%, mientras que en el extremo opuesto se encontró en CX0, con un porcentaje de 0,6%.

Tabla 6. Caracterización Físico-Químico de las muestras

Muestra	Humedad %	pH	Materia orgánica %	Conductividad [$\mu\text{s}/\text{cm}$]
CH0	11,4	5,93	2,6	85,91
CH1	6,7	6,17	4,7	81,87
CH2	17,3	5,80	30,6	86,80
CH3	8,0	6,16	3,0	84,34
CX0	1,9	6,33	0,6	74,50
CX1	0,1	6,36	2,1	76,30
CX2	6,6	6,34	3,6	77,47
CX3	0,6	6,37	17,3	51,37
CA	1,7	6,03	5,8	99,73

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

4.1.2 Aislamiento selectivo de actinomicetes y bacterias

4.1.2.1 Bioensayo 1. Aislamiento de microorganismos con pretratamiento

En la Figura 2, se observa el número de unidades formadoras de colonias de actinomicetes por gramo de suelo seco (ufc/g), en función de los medios de cultivo, las muestras de suelo utilizados y temperaturas de incubación en el aislamiento selectivo. A 8°C, en el agar extracto de suelo se evidenció mayor crecimiento de actinomicetes, ya que crecieron colonias en 7 cajas del total de las 9 muestras existentes, valor que representa el 42% de crecimiento microbiano del total de las muestras de suelo. Cabe recalcar que no hubo crecimiento en la muestra CX1. A 26°C, el crecimiento de actinomicetes fue más notable en el medio agar avena ya que hubo desarrollo de colonias en 5 muestras, seguido por el agar extracto de suelo que también fue un medio óptimo, rico en nutrientes para el crecimiento de actinomicetes, dichos valores representan el 39% de crecimiento microbiano del total de las muestras de suelo. En la muestra CA no se evidenció presencia de actinomicetes a esta temperatura. Los resultados obtenidos a 26°C, indican que la muestra CX3 en agar extracto de suelo presenta la mayor cantidad de colonias, con un total de 2.69×10^4 ufc/g.

La Figura 3 muestra que a 8°C, el medio óptimo para bacterias fue el agar GYM y agar avena, ya que en ambos medios crecieron en 4 diferentes muestras, valores que representan el 39% de crecimiento microbiano del total de las muestras de suelo. Es importante mencionar que no se evidenció apareamiento de colonias en la muestra CX3. A 26°C, el medio óptimo para actinomicetes fue el agar avena ya que también hubo desarrollo de colonias en 4 diferentes muestras, representando tan solo el 28% de crecimiento microbiano del total de las muestras de suelo. No se evidenció crecimiento de bacterias en medio agar caseína, ni en las muestras CX0 y CA a dicha temperatura. Cabe mencionar que no se evidenció crecimiento de bacterias en medio agar caseína, ni en las muestras CX0 y CA a dicha temperatura. Las muestras CX1 y CX2 presentaron mayor desarrollo de bacterias con 1.71×10^4 y 1.42×10^4 ufc/g, en agar extracto de suelo y agar avena, a 8 y 26°C, respectivamente.

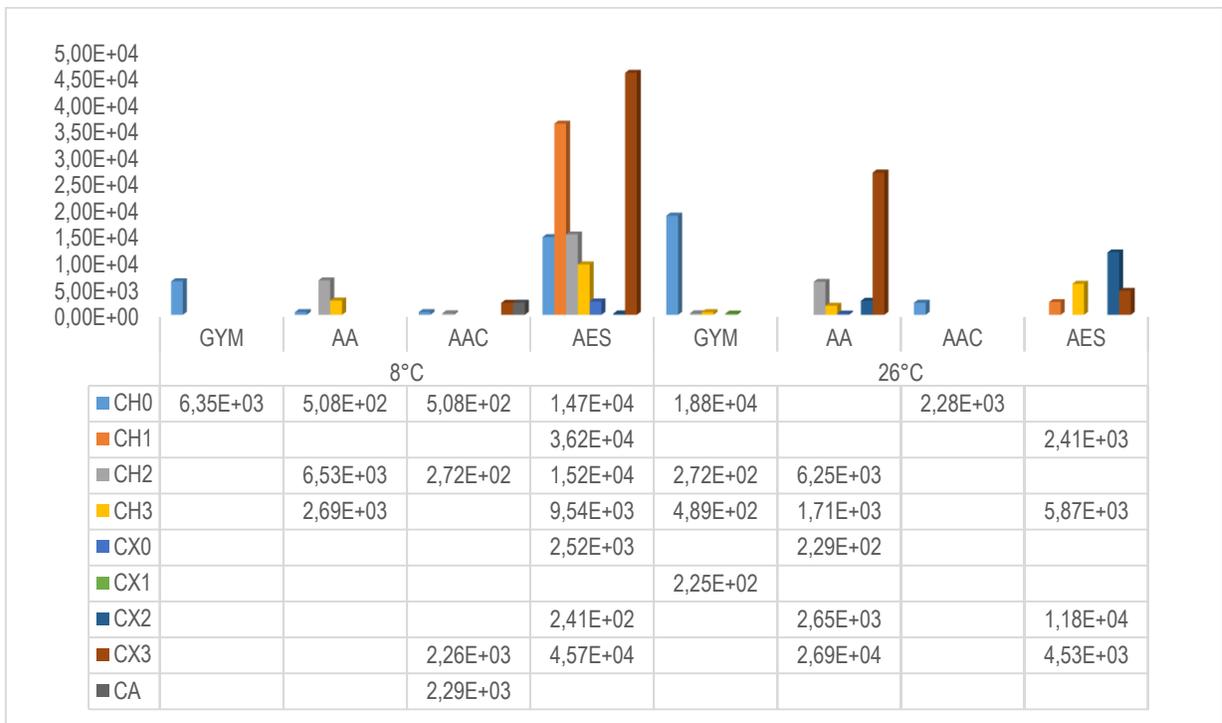


Figura 2. Unidades formadoras de actinomicetes según su origen, medio de cultivo y temperatura de aislamiento del Bioensayo 1
Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

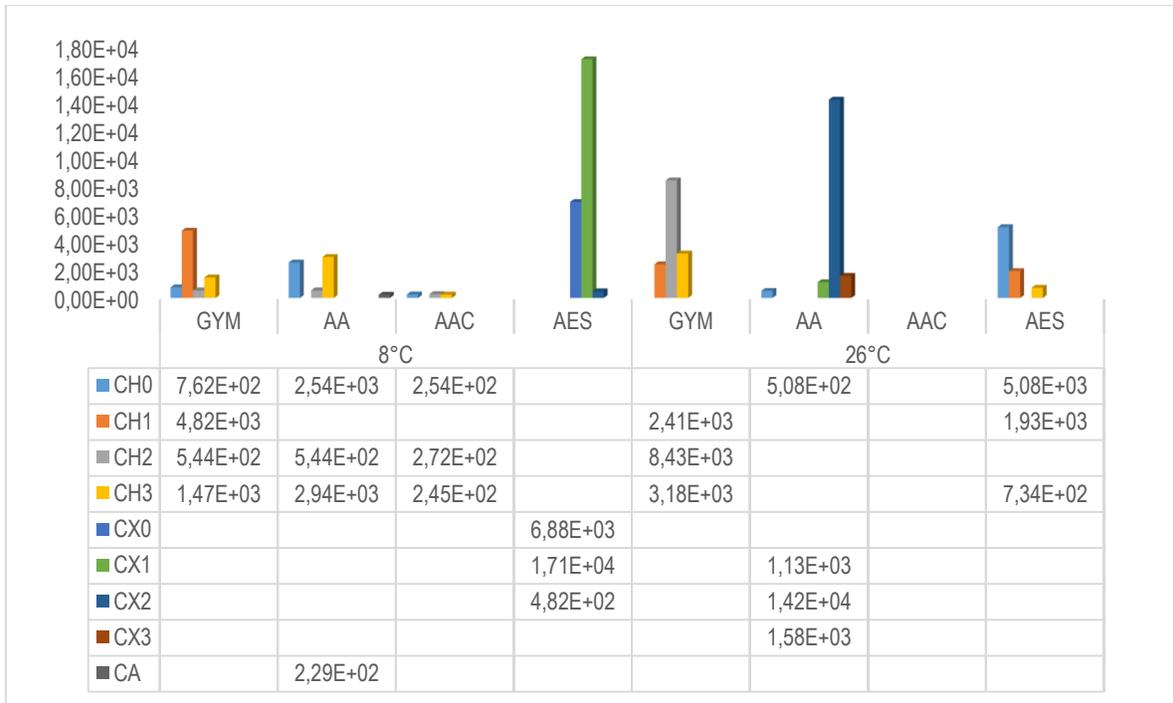


Figura 3. Unidades formadoras de bacterias según su origen, medio de cultivo y temperatura de aislamiento del Bioensayo 1
Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

La Figura 4, detalla que la mayor cantidad de actinomicetes tienen su origen en la muestra CX3 con 9.93×10^3 ufc/g de suelo seco, seguido por CH0, con un valor de 5.39×10^3 ufc/g de suelo seco. Las bacterias crecieron en mayor cantidad en las muestras CX1 y CX2, con 2.28×10^3 y 1.84×10^3 ufc/g de suelo seco respectivamente. Al incubar a 8°C , se observa mayor desarrollo de actinomicetes, mientras que en las bacterias existe un crecimiento similar a 8 y 26°C . Finalmente, los datos obtenidos indican que el agar extracto de suelo es el medio de cultivo óptimo de crecimiento tanto para actinomicetes como para bacterias.

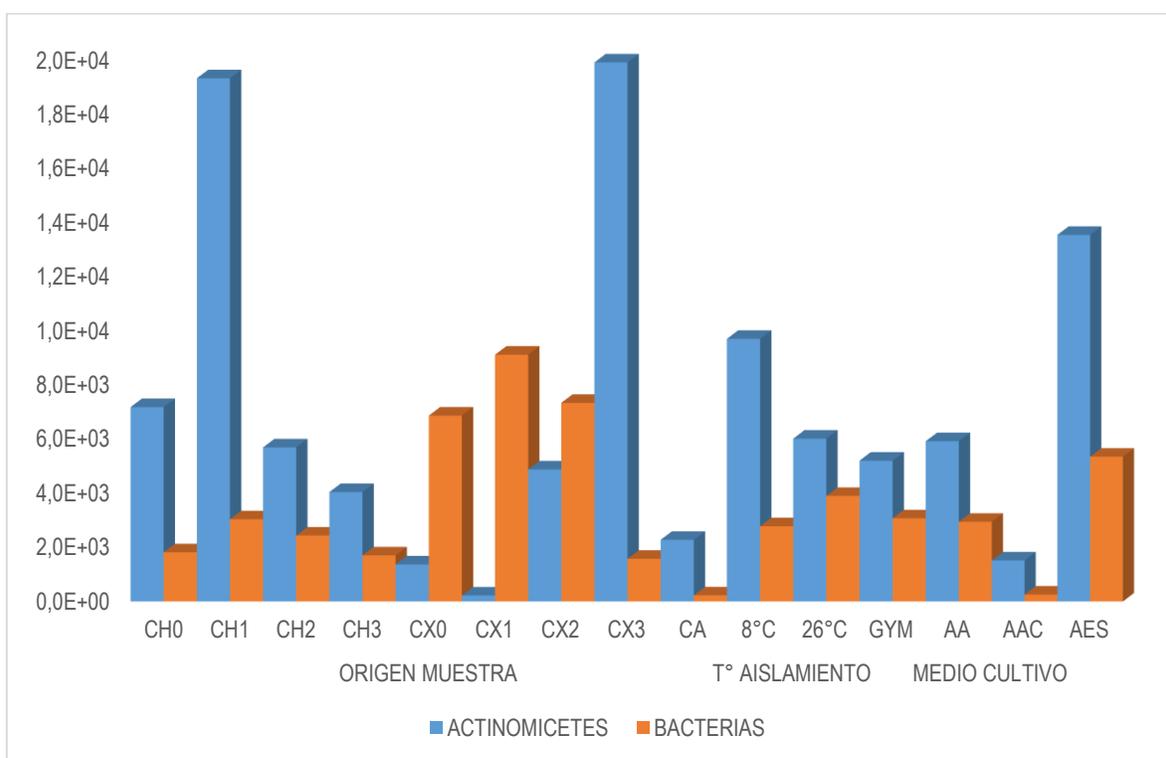


Figura 4. Unidades formadoras de bacterias y actinomicetes según su origen, temperatura y medio de cultivo de aislamiento del Bioensayo 1
Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

La Tabla 7, muestra datos interesantes del Bioensayo 1, donde se destaca que hubo mayor crecimiento de actinomicetes con relación a bacterias. Además, es evidente que las muestras provenientes de Chimborazo fueron las que proporcionaron mayor cantidad de actinomicetes. Al analizar el desarrollo de bacterias, se aprecia que se obtuvo mayor cantidad de ufc/g de suelo seco, a partir de las muestras de Cotopaxi.

Tabla 7. Unidades formadoras de colonias de actinomicetes y bacterias según su origen de aislamiento del Bioensayo 1

	Antártida	Chimborazo	Cotopaxi
Actinomicetes	2.29x10 ³	9.06x10 ³	6.59x10 ³
Bacterias	2.29x10 ²	2.26x10 ³	6.23x10 ³

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

El medio óptimo para el desarrollo de actinomicetes fue en agar extracto de suelo incubado a 8°C, en la muestra CX3 con un promedio de altura de 4805.2 metros sobre el nivel del mar (msnm) y pH de 6.37, donde se evidenció un crecimiento de colonias de 9.9 x10³ ufc/g.

De igual manera, las bacterias crecieron en su mayoría en el medio agar extracto de suelo donde la temperatura no fue relevante, en la muestra correspondiente a CX1, con una altura promedio de 4669.4 msnm y un pH de 6.36, obteniendo 7.62 x10⁴ ufc/g de suelo seco.

Al finalizar el Bioensayo 1, se obtuvo un mayor número de actinomicetes con relación a bacterias. Sin embargo, dichos valores no indican la cantidad esperada de microorganismos, ya que tardaron alrededor de 21 días en crecer y desarrollarse a 26°C y más de 30 días a 8°C.

4.1.2.2 Bioensayo 2. Aislamiento de microorganismos sin pretratamiento

Debido a la poca diversidad, lento crecimiento y bajo número de microorganismos obtenidos en el Bioensayo 1, se realizó un segundo experimento en donde se incrementó la concentración de suelo y se eliminó el pretratamiento térmico en el aislamiento selectivo, con el objetivo de obtener mayor cantidad de carga microbiana de actinomicetes y bacterias psicrófilos y psicrótrofos.

En la Figura 5, se observó crecimiento relevante a 26°C en el medio agar extracto de suelo, desarrollándose colonias en 8 muestras de suelo, predominando la muestra CX3 que presenta la mayor cantidad de actinomicetes con 1.1 x10⁵ ufc/g de suelo seco. A la misma temperatura en agar almidón caseína, crecieron actinomicetes en 5 diferentes muestras, pero con número de ufc/g relativamente bajos. Dichos valores representan el 44% del crecimiento microbiano del total de las muestras de suelo a 26°C.

Además, es importante mencionar que a 8°C hubo presencia de actinomicetes tan solo en el medio agar almidón caseína en tres diferentes muestras, con valores de ufc/g poco significativos, datos que representan un crecimiento microbiano del 8% del total de las muestras de suelo.

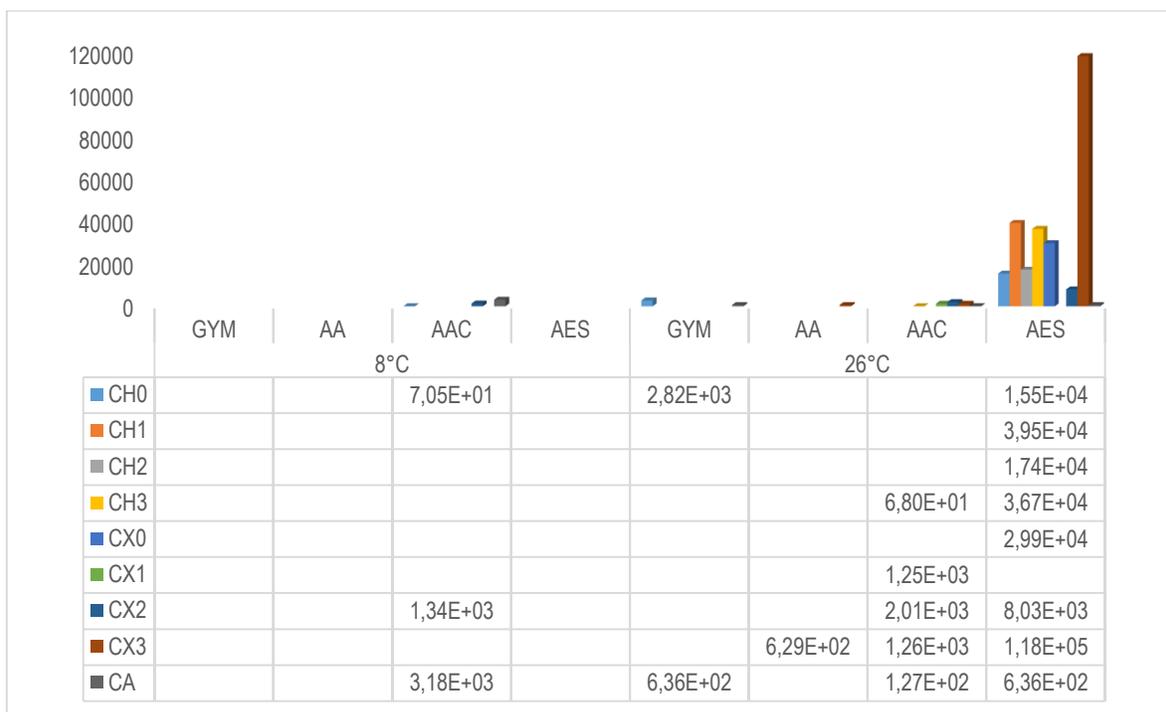


Figura 5. Unidades formadoras de actinomicetes según su origen, medio de cultivo y temperatura de aislamiento del Bioensayo 2

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

La Figura 6 indica que el mayor desarrollo de bacterias fue a 8°C, en los medios agar GYM y caseína, en la muestra CH1 con 1.17×10^5 ufc/g de suelo seco. Por otro lado, a 26°C se observa crecimiento de bacterias en todos los medio de cultivo y en todas las muestras. La muestra representativa en este tratamiento fue CH1 ya que se obtuvo 3.35×10^4 ufc/g de suelo seco.

La Figura 7 muestra el resumen del Bioensayo 2, con sus distintas variables de aislamiento. Es importante destacar que, según el origen de la muestra, existe mayor crecimiento de bacterias en CH1 ya que crecieron 3.0×10^4 ufc/g de suelo seco. Por otro lado, los actinomicetes presentaron mayor crecimiento en la muestra CX3 con 1.5×10^4 ufc/g de suelo seco.

En cuanto a la temperatura de incubación, a 8°C hubo un relevante crecimiento de bacterias con 9.8×10^3 ufc/g de suelo seco. En cambio, a 26°C se evidenció mayor desarrollo de actinomicetes, con un valor de 7.6×10^3 ufc/g de suelo seco. El medio de cultivo óptimo para bacterias fue el agar GYM y caseína y para actinomicetes fue el agar extracto de suelo.

Los datos obtenidos en el Bioensayo 2 indican que se obtuvo mayor cantidad de bacterias con respecto a actinomicetes, de las muestras provenientes de Chimborazo y Cotopaxi. Por otro lado, es evidente que la cantidad de microorganismos aislados de la Antártida fueron escasos, según la Tabla 8.

Tabla 8. Unidades formadoras de colonias de actinomicetes y bacterias según su origen de aislamiento del Bioensayo 2

	Antártida	Chimborazo	Cotopaxi
Actinomicetes	1.14×10^3	2.03×10^4	1.88×10^4
Bacterias	3.50×10^2	1.96×10^4	1.34×10^4

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

En el Bioensayo 2, el medio óptimo para el desarrollo de actinomicetes fue el agar extracto de suelo incubado a 26°C, de la muestra CX3 proveniente de Cotopaxi, con una altura promedio de 4805.2 msnm y pH de 6.37, donde se evidenció un crecimiento de colonias de 1.5×10^4 ufc/g de suelo seco. Por otro lado, las bacterias crecieron casi en su totalidad en el medio agar GYM a una temperatura de incubación de 8°C, en la muestra CH1 con $3,0 \times 10^4$ ufc/g de suelo seco, a una altura promedio de 4864,8 msnm a pH 6.17.

Los resultados del Bioensayo 2, al no ser expuestos al pretratamiento térmico, se vieron afectados por la presencia de hongos filamentosos, lo cual dificultó el conteo de las cepas existentes y en la mayoría de los casos impidió el aislamiento de los microorganismos esperados, por tal razón no existe un criterio acertado sobre el crecimiento de actinomicetes, Sin embargo, se logró obtener la cantidad suficiente de actinomicetes y bacterias, para realizar los ensayos posteriores de la investigación.

4.1.3 Aislamiento, purificación y almacenamiento de microorganismos

Como resultado de los dos bioensayos realizados para el aislamiento selectivo, se obtuvo un total de 75 actinomicetes, de donde 56 se aislaron del Bioensayo 1 y 19 del Bioensayo 2, presentando óptimo desarrollo en medio agar extracto de suelo a una temperatura de incubación de 26°C. Por otro lado, se aisló un total de 32 bacterias, de donde 11 se obtuvieron del Bioensayo 1 y 21 del Bioensayo 2, cuyo medio óptimo de crecimiento fue en agar GYM a temperatura de 26°C, la misma que no difiere significativamente con 8°C ya que sus valores de crecimiento de cepas bacterianas fueron muy similares.

La Tabla 9 indica el resumen de los microorganismos aislados al finalizar el presente experimento, los mismos que coinciden con los datos obtenidos a partir de las ufc/g de suelo seco, ya que se aisló 56 actinomicetes del Bioensayo 1 y tan solo 19 del Bioensayo 2. Con respecto a las bacterias, se aisló 21 de ellas del Bioensayo 2 y 11 del Bioensayo 1.

En cuanto a la temperatura de incubación, se observa que hubo mayor crecimiento de actinomicetes y bacterias a 26°C. Los microorganismos aislados en función del origen fueron mayores para actinomicetes en las muestras provenientes de Chimborazo, en cuanto a las bacterias no existe diferencia significativa entre los aislamientos de las muestras de Chimborazo y Cotopaxi, mientras que la Antártida posee un número escaso de diversidad.

Tabla 9. Diversidad de microorganismos aislados de ecosistemas andinos y antárticos

	Actinomicetes				Bacterias			
	8°C		26°C		8°C		26°C	
	Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2
CH0	9		10	4		1	3	
CH1			2		1	3	1	
CH2	6		12		1		1	1
CH3	3		7	2	2		2	1
CX0				1		1		
CX1		1	2			2		
CX2			1	2		2		2
CX3			3	6		1		6
CA	1	1		2				1

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Pese a que en agar extracto de suelo se obtuvo mayor población, en agar GYM hubo mayor diversidad de actinomicetes. Con respecto a las bacterias, del agar GYM y agar almidón caseína se obtuvo mayor cantidad de cepas (Tabla 10).

Tabla 10. Diversidad de microorganismos en función de los medios de cultivo

	Actinomicetes	Bacterias
AA	19	7
AAC	9	11
AES	23	2
GYM	24	12

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Es importante mencionar que se ha integrado 4 cepas de actinomicetes de la Antártida, correspondientes a la previa investigación de Garzón & Rodriguez (2013), además se añadió una bacteria de la colección de microorganismos del Proyecto de la Antártida de Biotecnología Microbiana (2016). De esta manera, se trabajó con 79 actinomicetes y 33 bacterias para los posteriores experimentos descritos en la metodología.

4.1.4 Caracterización macroscópica

La purificación de los actinomicetes se los realizó en medio GYM, para diferenciar sus características macroscópicas y su capacidad esporulante. La Tabla 11 indica los 29 grupos color en medio GYM.

Tabla 11. Grupos color formado por los cultivos de actinomicetes aislados de las muestras de medio GYM

Grupo de color	Color		Códigos
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	
1	White	Salmon pink	DE 004, DE 007, DE 015, DE 016, DE 036, DE 041, DE 044, DE 045, DE 051, DE 052, DE 054, DE 055 DE 062, DE 063, DE 064, DE 076, DE 087
2	White	Manilla	DE 011, DE 049, DE 067, DE 070, DE 071, DE 073, DE 074, DE 088

Tabla 11. (Continuación)

3	White	Biscuit	DE 012, DE 035, DE 065, DE 069, DE 085
4	Camouflage beige	Golden yellow	DE 010, DE 020, DE 033, DE 038, DE 047
5	Camouflage beige	Bold yellow	DE 002, DE 003, DE 053, DE 060
6	White	White	DE 006, DE 008, DE 009, DE 021
7	Manila	Manila	DE029, DE030, DE068
8	Camouflage beige	Beige	DE 084, DE 013, DE 039
9	White	Primrose	DE 078, DE 079, DE 058
10	White	Light buff	DE 031, DE 040, DE 083
11	White	Pale roundel red	DE 019, DE 034, DE 050
12	Sky blue	Golden brown	DE 043
13	Deep cream	Light buff	DE 061, DE 032
14	Manila	Light buff	DE 042, DE 022
15	Light buff	Apricot	DE 024
16	Manila	Vellum	DE 027
17	Manila	Biscuit	DE 023
18	Manila	Salmon pink	DE 014
19	Biscuit	Primrose	DE 082
20	Biscuit	Light buff	DE 046
21	Beige	Golden yellow	DE 018
22	Camouflage beige	Deep cream	DE 005
23	Camouflage beige	Lemon	DE 026
24	Salmon pink	Manila	DE 075
25	Salmon pink	Salmon pink	DE 037
26	Pale roundel red	Pale roundel red	DE 056
27	White	Pale cream	DE 080
28	White	Golden yellow	DE 025
29	Transparente	Manilla	DE 081

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

En la Tabla 12 se identificaron 9 diferentes grupos color para bacterias. Además se observa que, mostraron mayor similitud entre sí que los actinomicetes, donde el grupo color 1 abarca el 79% del total de cepas.

Tabla 12. Grupos color formado por los cultivos de bacterias aislados de las muestras de medio GYM

Grupo color	Color	Códigos
1	White	DE 089, DE 090, DE 093, DE 094, DE 097, DE 099, DE 101, DE 105, DE 106, DE 107, DE 109, DE 110, DE 115, DE 116, DE 117, DE 118, DE 119, DE 121, DE 122, DE 123, DE 125, DE 126, DE 127, DE 128, DE 131, DE 132
2	Manilla	DE 092, DE 103, DE 129
3	Biscuit	DE 091, DE 095, DE 098
4	Pale roundel red	DE 096, DE 102, DE 120
5	Canary yellow	DE 124, DE 130
6	Light buff	DE 016, DE 066
7	Light orange	DE 100, DE 108
8	Bold yellow	DE 072
9	Salmon pink	DE 077

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

4.1.5 Caracterización microscópica

Los actinomicetes fueron clasificados según la forma de su cadena de esporas. El mayor grupo de actinomicetes posee una cadena recta corta con 53 representantes, 17 presentan cadena incompleta, 7 flexous y 2 esporangios.

25 de las bacterias aisladas presentaron forma bacilar y tan solo 8 forma de coco. Del total de bacterias aisladas, 32 pertenecen al grupo de las gram positivas y 1 fue gram negativa.

4.1.6 Caracterización fisiológica y bioquímica de los aislamientos

El 100% de los microorganismos aislados perteneció al grupo de los mesófilos, 54 actinomicetes presentaron características acidófilas, 23 neutrotolerantes y dos cepas se desarrollaron en todos los pHs, denominándolos neutrotolerantes extremos. Por otro lado, 28 bacterias fueron neutrotolerantes, 3 acidófilas y 2 neutrotolerantes extremas. 68 actinomicetes fueron halófilos débiles, 7 halófilos y tan solo 4 halófilos extremos. Las bacterias mostraron mayor capacidad de adaptación al medio halófilo ya que 20 fueron halófilas extremas y 13 halófilas débiles. No hubo crecimiento de bacterias al 10% de NaCl. En cuanto a la degradación de carbohidratos, 73 actinomicetes produjeron amilasas, 72 celulasas y 62 quitinasas. Con resultados similares, 22 bacterias produjeron amilasas, 21 quitinasas y 19 celulasas.

4.1.7 Determinación de la actividad antimicrobiana

4.1.7.1 Actinomicetes

Los actinomicetes presentaron una elevada actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas, que poseen altos niveles de toxicidad para el ser humano. Los datos obtenidos en los antibiogramas mostraron la actividad de los actinomicetes frente a bacterias patógenas, según la Tabla 13.

Tabla 13. Actividad bactericida de actinomicetes

<i>B. coagulans</i>	35
<i>E. faecalis</i>	28
<i>Salmonella</i>	20
<i>P. aeruginosa</i>	19
<i>B. cereus</i>	16
<i>E. coli</i>	16
<i>L. monocytogenes</i>	8
<i>S. aureus</i>	0

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Se evidencia que los actinomicetes tuvieron menor actividad antimicrobiana frente a hongos fitopatógenos, según los datos de la Tabla 14.

Tabla 14. Actividad fungicida de actinomicetes

<i>Penicillum</i>	21
<i>Aspergillus</i>	16
<i>Alternaria</i>	14
<i>Phoma</i>	12
<i>Botrytis</i>	7
<i>Fusarium</i>	7
<i>Saccharomyces</i>	3

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

De los 79 actinomicetes aislados, se obtuvieron 12 con poder de biocontrol de bacterias y hongos fitopatógenos importante. En la Tabla 15 se aprecia la actividad antimicrobiana de las muestras más representativas de actinomicetes que produjeron metabolitos secundarios con elevada capacidad antagónica.

Con respecto a la actividad frente a los hongos fitopatógenos, se observa que las muestras DE 006, DE 031, DE 081, DE 083 y DE 084 poseen una elevada producción de antibiótico que impidió el crecimiento, especialmente de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Phoma*. También se observa que DE 026 y DE 008 pese a tener un excelente control antimicrobiano, tienen un nulo control de hongos fitopatógenos. Cabe recalcar que la muestra DE 084 inhibe en un 100% el crecimiento de los hongos y las levaduras de la colección de fitopatógenos

Tabla 15. Actividad antagonica de actinomicetes aislados de muestras de suelos antarticos y andinos frente a bacterias patógenas y hongos fitopatógenos

		DE 002	DE 006	DE 008	DE 009	DE 025	DE 026	DE 029	DE 031	DE 053	DE 081	DE 083	DE 084
Bacterias Patógenas	<i>B. coagulans</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
	<i>B. cereus</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>Salmonella</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Hongos Fitopatógenos	<i>Alternaria</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Aspergillus</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Botrytis</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
	<i>Fusarium</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
	<i>Penicillium</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Phoma</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Saccharomyces</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

En referencia a la Tabla 16, se determinó que las cepas de actinomicetes DE 002 y DE 053 presentan actividad bactericida, ya que el porcentaje de control supera el 80%. Las cepas DE 006, DE 031, DE 081, DE 083 y DE 084 presentaron capacidad antagónica frente a hongos. Sin embargo, ningún actinomicete de la colección de la presente investigación presentó actividad antimicrobiana de amplio espectro.

Tabla 16. Resumen porcentual de Actividad Antimicrobiana de Amplio Espectro de actinomicetes aislados de muestras de suelos antárticos y andinos frente a bacterias patógenas y hongos fitopatógenos

Muestra	Actividad Bactericida	Actividad Fungicida	Actividad Antimicrobiana de Amplio Espectro
DE 002	86%	29%	57%
DE 006	43%	86%	64%
DE 008	71%	0%	36%
DE 009	71%	29%	50%
DE 025	71%	43%	57%
DE 026	71%	0%	36%
DE 029	71%	14%	43%
DE 031	14%	86%	50%
DE 053	86%	57%	71%
DE 081	43%	86%	64%
DE 083	14%	86%	50%
DE 084	29%	100%	64%

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

4.1.7.2 Bacterias

Las bacterias mostraron menor actividad antimicrobiana ya que solo hubo biocontrol frente a tres bacterias patógenas, según los datos de la Tabla 17. Además se observa que no hubo control frente a *B. cereus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *L. Monocytogenes* y *Salmonella*.

Tabla 17. Actividad bactericida de bacterias

<i>B. coagulans</i>	11
<i>P. aeruginosa</i>	5
<i>S. aureus</i>	3
<i>B. cereus</i>	0
<i>E. coli</i>	0
<i>E. faecalis</i>	0
<i>L. monocytogenes</i>	0
<i>Salmonella</i>	0

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Estos datos indican que la bacteria patógena más sensible y controlable es *Bacillus coagulans*, ya que tanto con actinomicetes y bacterias presentó bajo porcentaje de proliferación.

Una parte de las bacterias lograron inhibir a los hongos fitopatógenos, es así que los resultados se contemplan en la Tabla 18. No hubo control frente a *Saccharomyces*.

Tabla 18. Actividad fungicida de bacterias

<i>Alternaria</i>	11
<i>Fusarium</i>	11
<i>Phoma</i>	9
<i>Botrytis</i>	6
<i>Aspergillus</i>	4
<i>Penicillium</i>	1
<i>Saccharomyces</i>	0

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tomando como referencia la Tabla 19, se evidencia que tan solo hubo inhibición para tres de las ocho bacterias patógenas con las que se realizó el experimento. Por otro lado, los resultados frente a los hongos fitopatógenos fueron mejores ya que controlaron a 6 de un total de 7.

Tabla 19. Actividad antagónica de bacterias aisladas de muestras de suelos antárticos y andinos frente a bacterias patógenas y hongos fitopatógenos

		DE 115	DE 119	DE 123	DE 125	DE 127	DE 131	DE 132
Bacterias Patógenas	<i>B. coagulans</i>	-	-	+	-	+	+	+
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	+	-	-	-	-
Hongos Fitopatógenos	<i>Alternaria</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Aspergillus</i>	+	+	+	+	-	-	-
	<i>Botrytis</i>	+	+	-	+	-	+	+
	<i>Fusarium</i>	-	-	+	-	+	+	+
	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Phoma</i>	+	+	+	+	+	+	-

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

En base a los resultados obtenidos en la Tabla 20, se observa que ninguna de las cepas de bacterias posee trascendente actividad bactericida, fungicida o antimicrobiana.

Tabla 20. Resumen porcentual de actividad antimicrobiana de amplio espectro de bacterias aisladas de muestras de suelos antárticos y andinos frente a bacterias patógenas y hongos fitopatógenos

Código	Actividad Bactericida	Actividad Fungicida	Actividad Antimicrobiana de Amplio Espectro
DE 115	0%	57%	29%
DE 119	0%	57%	29%
DE 123	29%	57%	43%
DE 125	0%	57%	29%
DE 127	14%	43%	29%
DE 131	14%	57%	36%
DE 132	14%	43%	29%

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Al finalizar el ensayo de la determinación de la capacidad antagónica de los microorganismos aislados frente a agentes patógenos, se evidenció que el 84% de los actinomicetes y el 70% de las bacterias presentaron actividad antimicrobiana. Entre ellos se destacan los microorganismos con mayor poder de biocontrol. El 3% de las cepas de actinomicetes tuvieron actividad bactericida y el 6% fungicida, siendo DE 084 el actinomicete eficiente en el control de hongos fitopatógenos, con el 100% de actividad, lo cual abre las puertas para que se dé un potencial uso biotecnológico en el campo agrícola. Por otro lado, con respecto a las bacterias, pese a que su control total

antimicrobiano no fue de amplio espectro, se encontró que fueron eficaces frente a ciertos hongos fitopatógenos, ya que mostraron halos de inhibición con diámetros similares a los del nystatín.

4.1.8 Taxonomía numérica de datos fenotípicos

En el análisis de datos fenotípicos en taxonomía numérica, se construyó el dendrograma ajustando los datos al coeficiente S_{SM} y la consistencia de la topología de los mismos fue comprobada con Jaccard, de tal manera se evidenció que hubo 41 grupos fenéticos de actinomicetes (Figura 8), valor relativamente mayor en comparación con los grupos color iniciales que fueron 29. Con respecto a las bacterias, se obtuvo 29 grupos especie a partir de tan solo 9 grupos color (Figura 9).

En los actinomicetes se determinó que 13 grupos estuvieron formados por varios individuos y 28 por un solo miembro. Es relevante mencionar que existen diferentes grupos en donde se asocian microorganismos de la Antártida con los del Chimborazo, Antártida con Cotopaxi y Chimborazo con Cotopaxi (Tabla 21).

Tabla 21. Grupos fenéticos de cultivos de actinomicetes determinados mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos

Grupo	Miembros
1	DE 063, DE 054, DE 062, DE 067, DE 044, DE 88, DE 003, DE 004, DE 076, DE 079, DE 078, DE 007, DE 014, DE 013, DE 019, DE 040
2	DE 050, DE 057, DE 059, DE 058, DE 056
3	DE 012, DE 065, DE 069, DE 023, DE 022
4	DE 030, DG 139, DG 148, DG 161, DE 080
5	DE 026, DE 008, DE 075
6	DE 055, DE 045, DE 015
7	DE 035, DE 021
8	DE 064, DE 085
9	DE 011, DE 082
10	DE 073, DE 074
11	DE 051, DE 052
12	DE 033, DE 025
13	DE 049, DE 024
14	DE 068
15	DE 071
16	DE 039
17	DE 041
18	DE 027
19	DE 032

Tabla 21. (Continuación)

20	DG 106
21	DE 061
22	DE 036
23	DE 037
24	DE 006
25	DE 081
26	DE 034
27	DE 083
28	DE 031
29	DE 084
30	DE 029
31	DE 020
32	DE 018
33	DE 038
34	DE 009
35	DE 002
36	DE 047
37	DE 053
38	DE 060
39	DE 042
40	DE 010
41	DE 070

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

En las bacterias se determinó que 4 grupos estuvieron formados por varios individuos y 25 por un solo miembro (Tabla 22).

Tabla 22. Grupos fenéticos de cultivos de bacterias determinados mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos

Grupo	Miembros
1	DE 092, DE 094
2	DE 105, DE 109
3	DE 127, DE 128
4	DE 131, DE 132
5	DE 090
6	DE 125
7	DE 095
8	DE 126
9	DE 116
10	DE 106
11	DE 016
12	DE 066
13	DE 072
14	DE 091
15	DE 103
16	DE 129

Tabla 22. (Continuación)

17	DE 124
18	DE 130
19	DE 093
20	DE 118
21	DE 120
22	DE 110
23	DE 115
24	DE 119
25	DE 121
26	DE 122
27	DE 123
28	DE 117
29	DE 077

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

4.2 Verificación de Hipótesis

Esta investigación permitió ampliar el banco de germoplasma existente de la colecciones de los trabajos de Correa & Rodríguez, 2013, Garzón & Rodríguez, 2013 y Villacís & Rodríguez, 2015, mediante aislamiento y purificación de nuevas cepas de actinomicetes y bacterias de ecosistemas glaciares andinos y antárticos, dado que pertenecen al mismo tema de estudio. Se caracterizó fenotípicamente los actinomicetes y bacterias aislados de muestras de ecosistemas glaciares mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas, lo cual permitió evidenciar diversidad microbiana como indica las Figuras 8 y 9. Se identificó actinomicetes y bacterias con bioactividad en contra de microbios perjudiciales mediante pruebas de antagonismo.

Por lo tanto, los resultados demuestran que se debe rechazar la Hipótesis Nula y aceptar la Hipótesis Alternativa que menciona que los actinomicetes y bacterias recolectados de suelos de ecosistemas glaciares Andinas y Antárticos poseen una gran diversidad biológica y metabólica.

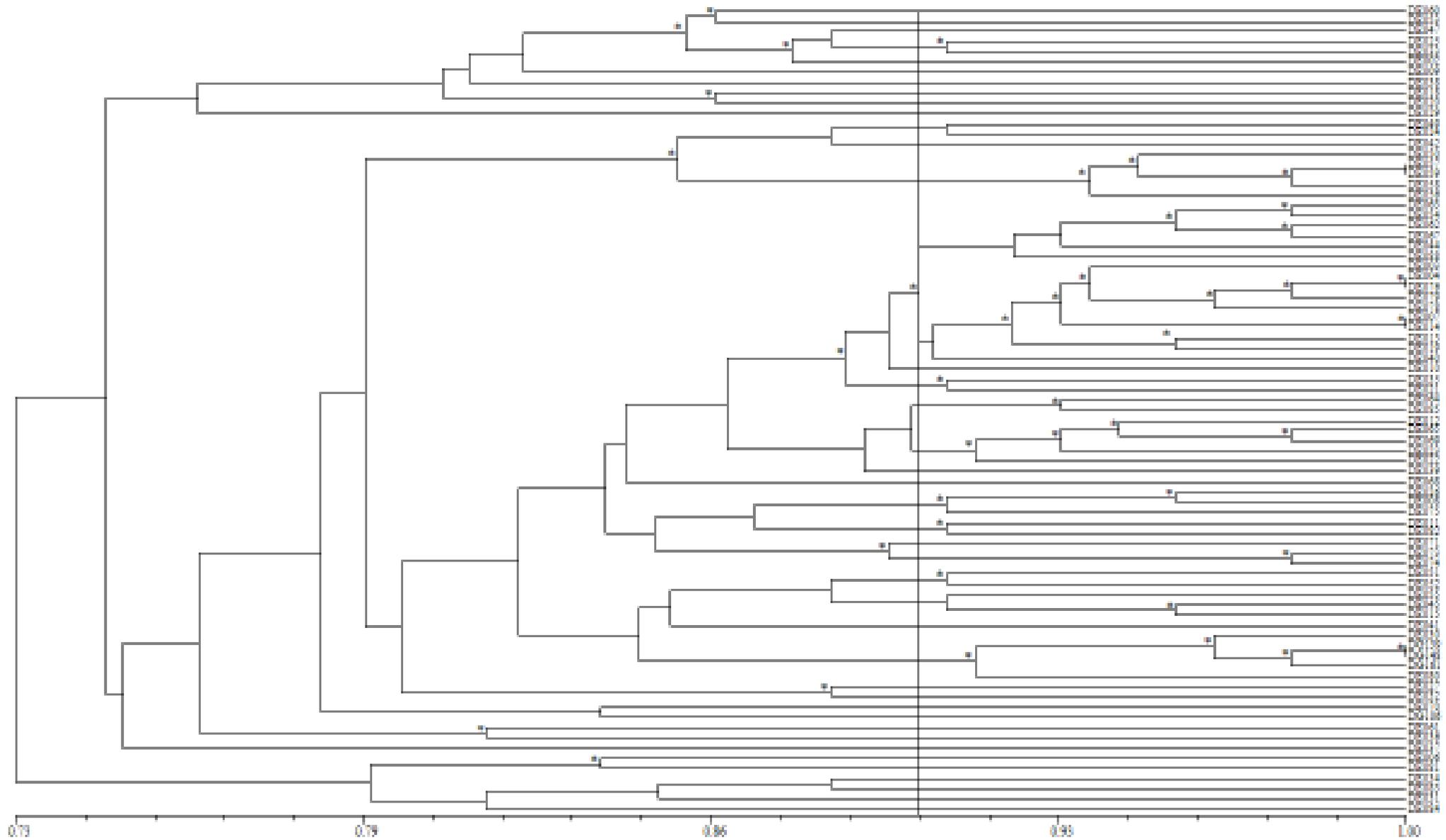


Figura 8. Dendrograma UPGMA basado en el análisis de taxonomía numérica de datos fenotípicos usando el coeficiente de simple coincidencia (S_{SM}) para definir grupos fenéticos de actinomicetes, al 90% de similitud. El asterisco (*) representa relaciones encontradas tanto con el coeficiente S_{SM} y el de Jaccard.

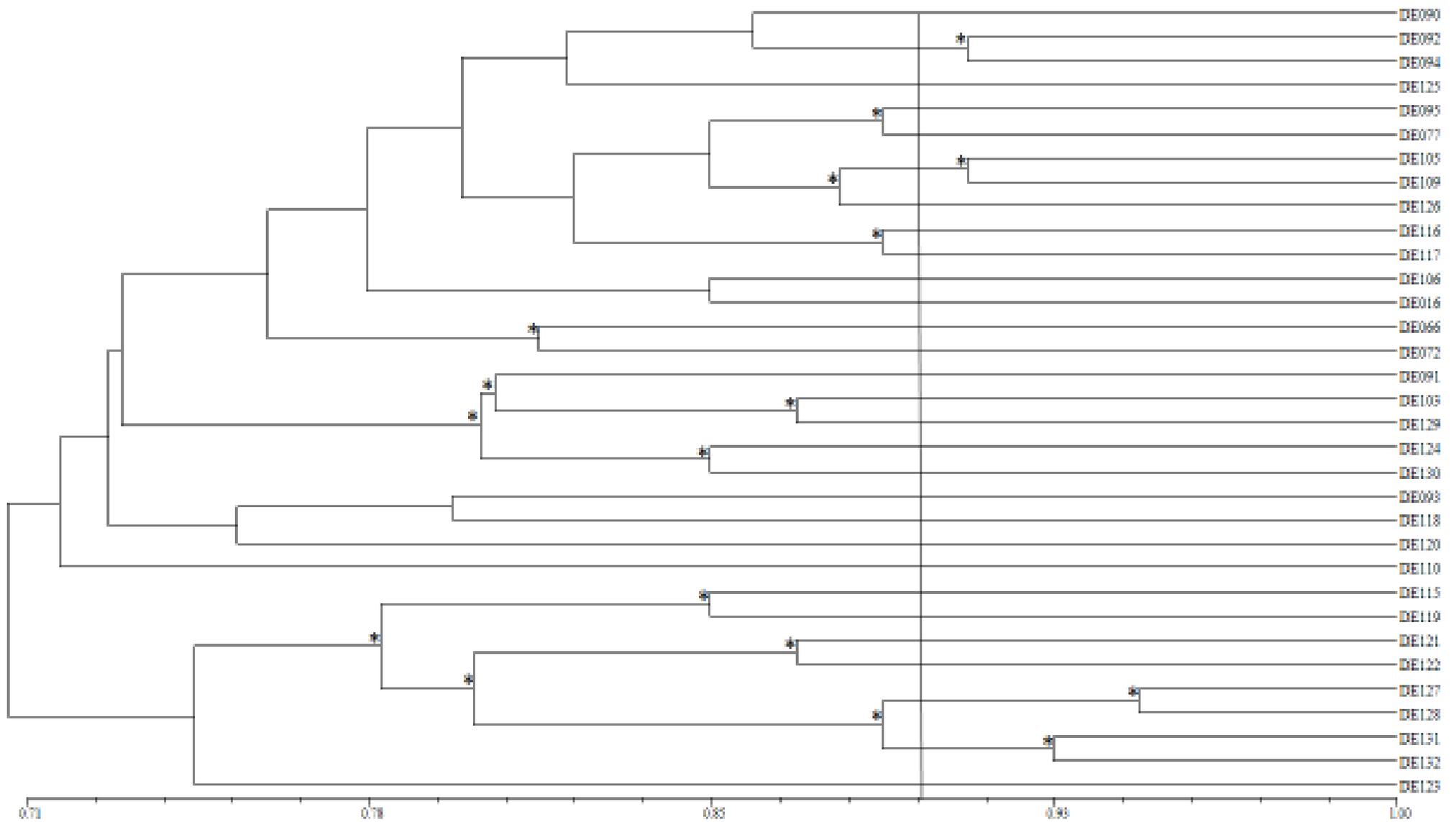


Figura 9. Dendrograma UPGMA basado en el análisis de taxonomía numérica de datos fenotipicos usando el coeficiente de simple coincidencia (S_{SM}) para definir grupos fenéticos de bacterias, al 90% de similitud.

El asterisco (*) representa relaciones encontradas tanto con el coeficiente S_{SM} y el de Jaccard.

4.3 Discusión de resultados

El presente estudio se enfocó en la determinación preliminar de producción de compuestos bioactivos de actinomicetes y bacterias aislados de ecosistemas glaciares andinos y antárticos. Para ello se realizaron experimentos de aislamiento selectivo, divididos en dos bioensayos para posteriormente realizar caracterización fenotípica e identificación de compuestos bioactivos. En el Bioensayo 1 se observó que los microorganismos crecieron lentamente al compararlos con el experimento del Bioensayo 2, lo que probablemente fue consecuencia de la influencia del pretratamiento térmico (Vinueza & Rodríguez, 2010). En el segundo bioensayo, dicho fenómeno evidentemente no se observó debido a la ausencia del tratamiento térmico, lo que provocó que los microorganismos crezcan más fácilmente al no estar estresados. Por otro lado, fue evidente que el tratamiento térmico influyó en la posibilidad de que los actinomicetes puedan crecer con facilidad, debido a que en el Bioensayo 2, bacterias y hongos contaminantes crecieron mucho más rápido que los actinomicetes al no verse afectados por la temperatura de 55°C. Es necesario recordar que el metabolismo de los actinomicetes es más lento que el de bacterias, levaduras y hongos (Correa & Rodríguez, 2013), por lo que crecieron más lento en los platos de aislamiento del Bioensayo 2 y fueron literalmente cubiertos por el crecimiento de los hongos filamentosos y bacterias comunes. Esto provocó dificultades en la determinación del número de ufc/g de suelo seco y en la posibilidad de aislarlos en cultivo puro. Por tal razón, los resultados obtenidos, mostraron que el pretratamiento térmico probablemente provocó la eliminación de microorganismos con características psicrófilas y psicrótrofas, ya que todos fueron clasificados como mesófilos, y que un mayor número de actinomicetes fueron aislados a partir del Bioensayo 1 que del Bioensayo 2. Cabe recalcar que los actinomicetes soportan ambientes extremos gracias a que pueden producir esporas en su estructura, las que les brindan mayor capacidad de supervivencia.

Al analizar la influencia del tipo de medio de cultivo usado para el aislamiento selectivo de los actinomicetes, el agar avena, agar almidón caseína y GYM son medios ricos en carbohidratos y otros ingredientes fácilmente asimilables por los actinomicetes, mientras que el agar extracto de suelo es un medio pobre, que incluso podría considerarse como un medio mínimo, en donde los ácidos húmicos y ciertas macromoléculas son las únicas fuentes de nutrientes. Sin embargo, al replicar de una manera bastante cercana las condiciones en que los actinomicetes pueden crecer en el ambiente, y al ser descomponedores secundarios de materia orgánica, el agar extracto de suelo demostró ser el medio más favorable para el aislamiento de actinomicetes a partir de las

muestras usadas en el presente estudio. Por otro lado, el agar almidón caseína fue el medio que permitió el menor desarrollo de actinomicetes. Los resultados de producción de enzimas extracelulares demuestran un alto porcentaje de los actinomicetes aislados en cultivo puro tienen la capacidad de producir amilasas (Tabla D 5, Anexo D). Esto significa que el almidón no pudo ser un nutriente limitante para el crecimiento de los actinomicetes y más bien fue la caseína la que probablemente se constituyó en el factor que impidió que más actinomicetes puedan crecer en este medio de cultivo (Pandey, Chimire, & Prasad, 2004). Al revisar los resultados correspondientes a los aislamientos de las bacterias, éstas crecieron en su mayoría en agar GYM y agar almidón caseína, medios ricos en carbono y nitrógeno. A más de ello mostraron resistencia al bactericida utilizado, probablemente porque en su mayoría fueron bacilos gram positivos. En la composición de su pared celular poseen una gruesa capa de peptidoglicano, que dificulta la entrada del antibiótico impidiendo la inhibición del inicio de la transcripción del ARN (Procópio et al., 2012).

Las características fisicoquímicas del suelo fueron factores determinantes para el crecimiento de microorganismos (Ramos & Zúñiga, 2008). Las muestras provenientes de Chimborazo poseen mayor porcentaje de humedad y materia orgánica, características que lo hacen un mejor suelo para la proliferación de microorganismos tanto en población como en diversidad, en comparación con los suelos de Cotopaxi y la Antártida, esto se debe a que los ecosistemas glaciares pese a tener la mayoría del tiempo hielo en su corteza y bajas temperaturas, presentan alta humedad, factor que influye en la disponibilidad de oxígeno y nutrientes en sus suelos, convirtiéndolos en una fuente diversa de microorganismos y mayor calidad nutricional (Hofstede, 2001). Otro factor trascendente en la presente investigación fue la altura, ya que se observó que a un promedio de 4800 msnm se obtuvo mayor población de los microorganismos aislados, valores que pertenecen a las muestras provenientes de Chimborazo y Cotopaxi. Se han registrado estudios donde se han aislado actinomicetes como *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Saccharopolyspora*, *Micromonospora* y *Actinocynema* con actividad antimicrobiana a alturas entre los 5000 y 5300 msnm, el área de Lobuche, Nepal (Pandey, Chimire, & Prasad, 2004). Las dos investigaciones son evidencias de las adaptaciones fisiológicas y moleculares que han desarrollado los microorganismos para sobrevivir al medio en el que se encuentran, al punto de soportar alturas extremas, radiación, bajas temperaturas y poca disponibilidad de oxígeno.

La mayoría de los actinomicetes crecieron a pHs bajos, clasificándolos en el grupo de los ácidotolerantes, esto se debe a que la clase Actinobacteria desarrolló adaptaciones moleculares

como enzimas extracelulares y proteínas redox activadas, que captan protones del medio y las transportan hacia el interior de la célula (Johnson, 2007), además las características fisicoquímicas de los suelos donde fueron aislados presentaron pHs ligeramente ácidos. Resultados similares son reportados en el estudio de Curipallo & Rodríguez (2011), quienes mencionan que los actinomicetes se desarrollan óptimamente a pHs bajos. Pese a que estas características en los actinomicetes no son comunes, se ha reportado la presencia y capacidad de dichos microorganismos con capacidad de desarrollarse en medios ácidos, asociados al género *Streptacidiphilus* (Kim, Lonsdale, Seong, & Goodfellow, 2003). Por otro lado, la mayoría de las bacterias crecieron a pHs neutros, que se asemejan al medio óptimo de crecimiento para el correcto funcionamiento enzimático (Ramos & Zúñiga, 2008). Los actinomicetes no toleraron altas concentraciones de NaCl, mientras que las bacterias en su mayoría fueron halófilas extremas, este comportamiento se explica con la investigación de Oren (2007), quien afirma que la mayoría de las especies procariotas halófilas y halotolerantes pertenecen al dominio Bacteria, ya que poseen enzimas especializadas que se encuentran en su configuración activa, lo que les permite soportar altas concentraciones de sal y evitar la desnaturalización de proteínas (Akond, Jahan, Sultana, & Rahman, 2016). Sin embargo, en el presente estudio, solamente las bacterias presentaron dicha maquinaria enzimática ya que se desarrollaron hasta una concentración del 15% p/v de NaCl y los actinomicetes no soportaron ni el 1% p/v de NaCl, pese a pertenecer al mismo dominio.

Tras realizar la determinación de producción de metabolitos secundarios, se obtuvo que el 84% de los actinomicetes y el 79% de las bacterias controlaron al menos uno de los agentes patógenos utilizados. Esto se debe a que, según explica Procópio et al. (2012), el 80% de los antibióticos existentes son producidos por los actinomicetes, especialmente del género *Streptomyces*. También existe una tendencia de que los mejores biocontroladores provienen de Chimborazo y que tanto actinomicetes como bacterias controlan de mejor manera a hongos fitopatógenos, posiblemente porque en la colección de cepas provenientes de Chimborazo existan actinomicetes productores de antibióticos típicos, por lo tanto esta afirmación abre las puertas a una investigación de origen molecular para determinar su clasificación y si estamos frente a una nueva especie.

Villacís & Rodríguez (2015) señalan en su estudio, que el 95% de actinomicetes tuvieron capacidad antagónica frente a bacterias gram positivas y el 65% frente a gram negativas, contrastando con el presente trabajo, donde se obtuvo un mayor control en bacterias gram negativas con el 32% y tan solo el 26% en gram positivas. Además, las bacterias mostraron poder inhibitorio del 30% en gram positivas y el 14% en gram negativas, datos similares a los de Sierra,

Romero, & Orduz (2012), que indican que es común encontrar que las bacterias poseen mayor actividad contra especies gram positivas y menor actividad contra bacterias gram negativas.

Las pruebas fenotípicas realizadas por taxonomía numérica muestran datos más reales de los grupos especie ya que el dendrograma establece relación entre 44 y 55 características para actinomicetes y bacterias respectivamente, mientras que los grupos color se basa en la caracterización macroscópica por el pigmento de la colonia, lo que lo hace más inexacta pero necesaria para una previa clasificación de los microorganismos (Garzón & Rodríguez, 2013).

Si bien es cierto, en la investigación no se obtuvo microorganismos psicrófilos y psicrótrofos, sin embargo, los mesófilos aislados muestran características útiles frente a agentes altamente tóxicos, lo que da pie a la búsqueda de usos industriales biotecnológicos y además surge la necesidad de identificar los metabolitos secundarios producidos y realizar una caracterización molecular de los actinomicetes y bacterias que han mostrado capacidad antagónica, para conocer si se tratan de nuevas especies de microorganismos, ampliando las alternativas ecológicas y de esta manera reemplazar el uso excesivo de sustancias químicas tanto en medicina como en el agro.

4.4 Discusión general del trabajo

El presente estudio se enfocó en buscar alternativas biológicas para la producción de compuestos bioactivos, que permitan controlar microorganismos patógenos de importancia comercial tanto en la agricultura como en la industria alimentaria asociada al consumo humano, y así reemplazar el uso de pesticidas que a la larga provocan que los microorganismos desarrollen resistencia a varios compuestos bioactivos y sintéticos usados en el control de agentes tóxicos (Bressan & Figueiredo, 2005), aportando con posibles nuevas fuentes de biocontrol, especialmente en el área agrícola.

Además se demostró fenotípicamente que existe diversidad de microorganismos de ecosistemas glaciares, tal es el caso de los actinomicetes provenientes de la Antártida, similares a las especies aisladas de suelos de Chimborazo y Cotopaxi que proceden de alturas de aproximadamente 5000 msnm, lo cual demuestra que los individuos de un mismo grupo fenético pese a estar separados por miles de kilómetros uno del otro, presentan capacidad evolutiva para adaptarse al contexto del medio que habitan (Navas & Rodríguez, 2016).

Se ha aportado con una plataforma en la cual la colección de cultivos de microorganismos del Grupo de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la

Universidad Técnica de Ambato, ha incrementado su número, por la adición de 75 actinomicetes y 32 bacterias potenciales para la producción de compuestos bioactivos, los cuales en posteriores investigaciones deben ser analizados genotípicamente y además es importante determinar el tipo de metabolito secundario que producen para explotarlos a escala industrial.

Finalmente, es trascendente acotar que, esta investigación demuestra la riqueza microbiana potencial que posee el Ecuador en ecosistemas extremos, que involucran a microorganismos que sobreviven en ambientes inhóspitos similares a los de la Antártida, además poseen alto grado de importancia ya que han desarrollado nuevos mecanismos enzimáticos adaptados al medio en donde se encuentran para utilizar sustratos que quizás ningún otro microorganismo lo puede degradar, asimismo presentan novedosas capacidades de producción de metabolitos de interés, siendo así, una opción prometedora para que la biotecnología impulse el desarrollo sustentable industrial, introduciendo bioproductos más amigables con el ambiente y rentables, en el área médica, agrícola, alimentaria para mejorar la calidad de vida del ser humano.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El germoplasma de microorganismos aislados de ecosistemas glaciares andinos y antárticos provenientes de suelo y arena de Chimborazo, Cotopaxi y Antártida, fue ampliado al añadir 75 cepas de actinomicetes y 32 de bacterias en cultivo puro, además se determinó que fue necesario el pre tratamiento térmico para el aislamiento selectivo de actinomicetes.

Los actinomicetes fueron divididos en cuarenta y un grupos-especie de los cuales veintiocho fueron unimiembros y trece multimiembros. Las bacterias aisladas presentaron veintinueve grupos-especie de los cuales veinticinco fueron unimiembros y cuatro multimiembros, demostrando así la diversidad biológica.

El 84% de actinomicetes y el 70% de bacterias presentaron algún tipo de actividad frente a microorganismos patógenos utilizados en las pruebas de antagonismo, de ellos, 5 actinomicetes presentaron actividad antifúngica y 2 antibacterial. Las bacterias no tuvieron dichas características. Además, ninguno de los actinomicetes y bacterias presentaron actividad antimicrobiana de amplio espectro.

5.2 Recomendaciones

Realizar nuevos aislamientos selectivos buscando alternativas para obtener la fracción psicrófila y psicrótrófa que probablemente se encuentran presentes en las muestras del presente estudio.

Identificar molecularmente los microorganismos aislados en la presente investigación, para determinar la posibilidad de estar frente a nuevas especies.

Caracterizar los antibióticos obtenidos para establecer el tipo de metabolito que está provocando la capacidad del antagonismo.

Desarrollar procesos que permitan continuar con los estudios de potencial uso para la elaboración de bioproductos en base de dichos microorganismos, para la agricultura y alimentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelfattah, M. S., Elmallah, M. I. Y., Hawas, U. W., Abou El-Kassema, L. T., & Eid, M. A. G. (2016). Isolation and characterization of marine-derived actinomycetes with cytotoxic activity from the Red Sea coast. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.004>
- Akond, M., 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, 1(2), 10–15.
- Arráiz, N., Bermúdez, V., & Urdaneta, B. (2005). Resistencia a drogas en M. Tuberculosis: Bases moleculares. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 24(1), 23–31.
- Banco Central del Ecuador. (2015, septiembre 30). PIB del Ecuador 2015. Recuperado a partir de <https://www.bce.fin.ec/index.php/boletines-de-prensa-archivo/item/836-en-el-segundo-trimestre-de-2015-el-pib-de-ecuador-mostró-un-crecimiento-inter-anual-de-10>
- Barcat, J. (2006). Sobre la historia de la penicilina. La segunda línea. Recuperado a partir de <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v66n4/v66n4a15.pdf>
- Belloso, W. (2002). Historia de los antibióticos. Recuperado 18 de mayo de 2017, a partir de https://www.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias_attachs/47/documentos/7482_102-111-belloso.pdf
- Benavides, A. B., Ulcuango, M., Yépez, L., & Tenea, G. N. (2016). Assessment of the in vitro bioactive properties of lactic acid bacteria isolated from native ecological niches of Ecuador. *Revista Argentina De Microbiología*, 48(3), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.003>
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites, 58(1), 1–26.
- Bolívar, H. J., Contreras, M. L., & Teherán, L. G. (2016). Burkholderia tropica, una Bacteria con Gran Potencial para su Uso en la Agricultura. *TIP*, 19(2), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.003>
- Bressan, W., & Figueiredo, J. E. F. (2005). Biological Control of Stenocarpella maydis in Maize Seed with Antagonistic Streptomyces sp. Isolates. *Journal of Phytopathology*, 153(10), 623–626. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01014.x>
- Briceño, G., Schalchli, H., Mutis, A., Benimeli, C., Palma, G., Tortella, G., & Diez, M. (2016). Use of pure and mixed culture of diazinon-degrading Streptomyces to remove other organophosphorus pesticides. *ResearchGate*, 193–202.
- Cano, M. (2013). Biological strategies for disease management in strawberry growing (*Fragaria* spp.).

Recuperado a partir de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-21732013000200011

- Cavicchioli, R., Siddiqui, K. S., Andrews, D., & Sowers, K. R. (2002). Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 253–261.
- Cevallos, C., & Rodríguez, C. (2014). *Determinación de la biodiversidad y distribución geográfica de levaduras asociadas a frutos de mora de castilla (Rubus glaucus) de tres localidades de la provincia de Tungurahua*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. Recuperado a partir de <http://repo.uta.edu.ec/handle/123456789/8466>
- Chan, Y., Van Nostrand, J. D., Zhou, J., Pointing, S. B., & Farrell, R. L. (2013). Functional ecology of an Antarctic Dry Valley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 8990–8995. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300643110>
- Clarke, A. C., Johnston, N. M., Murphy, E. J., & Rogers, A. D. (2012). Antarctic ecology in a changing world. En A. D. Rogers, N. M. Johnston, E. J. Murphy, & A. Clarke (Eds.), *Antarctic Ecosystems: An Extreme Environment in a Changing World* (pp. 1–9). Blackwell Publishing Ltd. Recuperado a partir de <http://nora.nerc.ac.uk/18270/>
- Comerio, R., Tarapow, M., Vázquez, S., & Mac Cormack, W. (2007). Buscando bacterias psicrófilas en la Antártida. *ResearchGate*, 17(99), 1–13. <https://doi.org/https://www.researchgate.net/publication/260790459>
- Correa, J., & Rodríguez, C. (2013). *Comparación de la Biodiversidad de Hongos Psicrófilos y Psicrótrofos presentes en Ecosistemas Glaciares de la Antártida y el Chimborazo*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Cowan, D. A., Casanueva, A., & Stafford, W. (2007). Ecology and Biodiversity of Cold-Adapted Microorganisms. En G. Gerday & N. Glansdorff (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Extremophiles* (pp. 119–132). Washington, D.C.: ASM Press. Recuperado a partir de <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555815813.ch09>
- Cragg, G., & Newman, D. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads, 3670–3695. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., & Ousley, M. A. (1993). Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a Fungal Root Pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), 3899–3905.
- Curipallo, G., & Rodríguez, C. (2011). *Caracterización e Identificación preliminar de Bacterias responsables de la Descomposición de materia orgánica durante la Fabricación de Compost*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. Recuperado a partir de <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/830>

- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Reports*, 7(4), 385–389. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400662>
- Evangelista, Z., & Moreno, A. (2007). Metabolitos secundarios de Importancia Farmacéutica producidos por Actinomicetos. *ResearchGate*, 11(3), 37–50.
- Fernández, E., Lombó, F., Méndez, C., & Salas, J. A. (1996). An ABC transporter is essential for resistance to the antitumor agent mithramycin in the producer *Streptomyces argillaceus*. *Molecular and General Genetics MGG*, 251(6), 692–698. <https://doi.org/10.1007/BF02174118>
- Garzón, D., & Rodríguez, C. (2013). *Determinación de la Biodiversidad Bacteriana en Ecosistemas Glaciares de la Antártida*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. Recuperado a partir de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3179/1/BQ37.pdf>
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J. P., Claverie, P., Collins, T., ... Feller, G. (2000). Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 18(3), 103–107.
- González, Y. (2010, mayo). *Los actinomicetos: Una visión como promotores de Crecimiento Vegetal*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado a partir de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8665/tesis618.pdf;jsessionid=30B467991B467EC73F1250A30B5C4AA9?sequence=1>
- Goo, K., Tsuda, M., & Ulanova, D. (2014). *Salinispora arenicola* from temperate marine sediments: New intra-species variations and atypical distribution of secondary metabolic genes, 105(1), 207–219. <https://doi.org/doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10482-013-0067-2>
- Hofstede, R. (2001). Impactos de las Actividades Humanas sobre el Páramo. Recuperado 10 de mayo de 2017, a partir de http://www.portalces.org/sites/default/files/references/095_Hofstede%202001%20Paramo%20Ecuador%20impacto.pdf
- Johnson, B. (2007). Physiology and Ecology of Acidophilic Microorganisms. En *Physiology and Biochemistry of Extremophiles* (p. 259). Washington, D.C.: ASM Press.
- Kim, S., Lonsdale, J., Seong, C., & Goodfellow, M. (2003). *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae, 107–116.
- Luteyn, J. (1999). Paramos A Checklist of Plant Diversity Geographical Distribution and Botanical Literature. Recuperado 10 de mayo de 2017, a partir de <http://lib.icimod.org/record/10268/files/235.pdf>
- Matsuda, S., Adachi, K., Matsuo, Y., Nukina, M., & Shizuri, Y. (2009). Salinisporamycin, a novel metabolite from *salinispora arenicola*, 62(9), 519–526. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1038/ja.2009.7>
- Ministerio De Finanzas. (2016). Generalidades. Presupuesto General del Estado. Recuperado a partir de

https://www.unicef.org/ecuador/ASAMBLEA_Presentacion_Proforma_del_PGE_2016_GastoSociaNinez_Adolescencia_FS.pdf

- Ministerio del Ambiente. (2015). Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador [Estado]. Recuperado 22 de junio de 2017, a partir de <http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/es/todas-areas-protegidas-por-region?t=S>
- Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39(2), 144–167.
- Navas, D., & Rodríguez, C. (2016). *Caracterización molecular de actinomicetes provenientes de ecosistemas Antárticos*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. Recuperado a partir de <http://redi.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22867/1/BQ%2087.pdf>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548–572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>
- Oren, A. (2007). Biodiversity in Highly Saline Environments. En *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. Washington, D.C.: ASM Press.
- Pandey, B., Chimire, P., & Prasad, V. (2004). Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal.
- Procópio, R. E. de L., Silva, I. R. da, Martins, M. K., Azevedo, J. L. de, & Araújo, J. M. de. (2012). Antibiotics produced by Streptomyces. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Ramírez, N., Serrano, J. A., & Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México, 37(3), 56–71.
- Ramos, E., & Zúñiga, D. (2008). Efecto de la Humedad, Temperatura y pH del suelo en la Actividad Micobiana a nivel de laboratorio, 7(1,2), 123–130.
- Rhodes. (2013). Alpine and Arctic Soil Microbial Communities in The Prokaryotes. En *Prokaryotic Communities and Ecophysiology*. Rosenberg et. Al Eds.
- Rodríguez, A., Olano, C., Vilches, C., Méndez, C., & Salas, J. A. (1993). Streptomyces antibioticus contains at least three oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily. *Molecular Microbiology*, 8(3), 571–582. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01601.x>
- Rogers, A. D. (2007). Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362(1488), 2191–2214. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1948>
- Santambrosio, E., & Ortega, M. (2009). Tinción y observación de microorganismos. Recuperado 10 de mayo de 2017, a partir de

https://www.firro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf

- Sierra, I., Romero, M., & Orduz, S. (2012). Determinación de la Actividad Antimicrobiana e Insecticida de Extractos producidos por Bacterias Aisladas de Suelo. Recuperado 10 de mayo de 2017, a partir de <http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v34n96/v34n96a01.pdf>
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Srividya, A. R., Saritha, G. S., & Suresh, B. (2008). Study of the Soil Isolates for Antimicrobial Activity. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(6), 812–815. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.49132>
- Villacís, J., & Rodríguez, C. (2015). *Diversidad Biológica y Metabólica de actinomicetes aislados de suelo y arena de ecosistemas glaciares de la Antártida y del Chimborazo*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Vinueza, A., & Rodríguez, C. (2010). *Determinación de la relación entre la capacidad fenotípica y genotípica de actinomicetes como mecanismo de replicación de microorganismos útiles en Biotecnología*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. Recuperado a partir de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1725/1/BQ2%20Ref.%203356.pdf>
- Wadetwar, R., & Patil, A. (2013). Isolation and characterization of bioactive actinomycetes from soil in and around Nagpur. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(4), 1428–1433.
- Xu, Y., Nogi, Y., Kato, C., Liang, Z., Rüger, H.-J., De Kegel, D., & Glansdorff, N. (2003). *Moritella profunda* sp. nov. and *Moritella abyssi* sp. nov., two psychropiezophilic organisms isolated from deep Atlantic sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 2), 533–538. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02228-0>

ANEXOS

ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Medios de cultivo

Tabla A 1. Agar Avena (AV)

Solución Sales traza	1 mL
Avena	20 g
Bacto agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla A 2. Agar Glucosa, extracto de levadura y malta (GYM)

Glucosa	4 g
Extracto de levadura	10 g
Extracto de malta	10 g
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	2 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla A 3. Agar Extracto de suelo (AS)

Suelo negro	1000 g
Sales traza	1 mL
Agar	12 g
Agua destilada	1000 mL

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla A 4. Agar Almidón caseína (AC)

Almidón soluble	10 g
Fosfato ácido de potasio (K ₂ HPO ₄)	3 g
Nitrato de potasio (KNO ₃)	3 g
NaCl	3 g
Caseína	3 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ – 7H ₂ O)	0,05 g
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	0,02 g
Sulfato de hierro (FeSO ₄ – 7H ₂ O)	0,01 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla A 5. Agar Medio basal

Polisacárido (almidón, celulosa o quitina)	1 g
Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4)	0,5 g
Sales traza	1 mL
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Soluciones

Tabla A 6. Sales traza

Sulfato de cobre II penta hidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	1 mg/mL
Sulfato de hierro III [$Fe_2(SO_4)_3$]	1 mg/mL
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1 mg/mL
Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	1 mg/mL

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla A 7. Búfers

pH	Ácido cítrico 0,1 M	Fosfato ácido de potasio 0,1 M
2,6	89,10 mL	10,90 mL
3	79,45 mL	20,55 mL
3,5	69,75 mL	30,25 mL
4	61,45 mL	38,55 mL
4,5	64,57 mL	45,43 mL
5	48,50 mL	51,50 mL
5,5	43,13 mL	56,87 mL
6	36,85 mL	63,15 mL
6,5	29,04 mL	70,96 mL
7	17,65 mL	82,35 mL
7,5	7,62 mL	92,38 mL

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

ANEXO B. ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Tabla B 1. Muestra compuesta de Suelo Antártida 2010, 2011 y 2012

Rango	Código	Fuente	Año
1	CA	ANT001 Cerca PEVIMA – Suelo Puyango – Líquenes verdes	2010
		ANT002 Cerro Puyango	
		ANT007 Meseta Punta Ambato 03	
		ANT010 Barriente 03 – Cubierta vegetal de musgos	
		ANT016 Cerro Puyango – Musgo	
		M1 (102-103) Suelo bajo Musgos	
		M6 (138) Suelo bajo Musgos – Barrientos	
		M12 (146) Musgo – Suelo pedregoso – Torres	
		M13 (147) Suelo bajo Cubierta de líquenes – Torres	2012
		M22 (193) Líquenes roca – Bese Puyango	
		M23 (194) Líquenes suelo pedregoso – Puyango	
		514 (119) Suelo bajo musgos – Barrientos	
		515 (109) Suelo pasto – Torres	
		519 (106) Suelo rico en materia orgánica debajo de musgo – Pedregoso – Roberts	
		522 (111) Suelo bajo líquenes – Torres	
		523 (118) Suelo de líquenes – Punta Ambato	
525 Muestra 2 asociada a planta vascular – Cima Puyango			
526 Muestra 1 asociada a líquenes – Cima Puyango			

Datos de Muestras de Suelo de la Antártida (CA) recolectadas de diferentes fuentes a una sola altura, en los años 2010, 2011 y 2012.

Fuente: Villacís y Rodríguez, 2015

Tabla B 2. Caracterización Físicoquímica de las muestras

Muestra	Humedad %	pH	Materia orgánica %	Conductividad [µs/cm]
CH0	11,4	5,93	2,6	85,91
CH1	6,7	6,17	4,7	81,87
CH2	17,3	5,80	30,6	86,80
CH3	8,0	6,16	3,0	84,34
CX0	1,9	6,33	0,6	74,50
CX1	0,1	6,36	2,1	76,30
CX2	6,6	6,34	3,6	77,47
CX3	0,6	6,37	17,3	51,37
CA	1,7	6,03	5,8	99,73

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

ANEXO C. AISLAMIENTO SELECTIVO Y PRUEBAS FISIOLÓGICAS

Tabla C 1. Número de colonias de actinomicetes de Bioensayo 1 aislados de muestras de suelos andinos y antárticos

Muestra	Bioensayo	Medio	Temperatura °C	Dilución	Réplica	N
CH0	1	GYM	8	10 E -1	1	5
CH0	1	Avena	8	10 E -1	2	2
CH0	1	Caseína	8	10 E -1	1	2
CH0	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	28
CH0	1	GYM	8	10 E -2	2	2
CH0	1	Extracto de suelo	8	10 E -2	2	3
CH1	1	Extracto de suelo	8	10 E -2	1	15
CH2	1	Avena	8	10 E -1	1	17
CH2	1	Avena	8	10 E -1	2	7
CH2	1	Caseína	8	10 E -1	1	1
CH2	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	2	56
CH3	1	Avena	8	10 E -1	1	7
CH3	1	Avena	8	10 E -1	2	4
CH3	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	INC
CH3	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	2	39
CX0	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	2	11
CX2	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	1
CX3	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	111
CX3	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	2	91
CX3	1	Caseína	8	10 E -2	1	1
CA	1	Caseína	8	10 E -2	1	1

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 2. Número de colonias del Bioensayo 1 de bacterias aisladas de muestras de suelos andinos y antárticos

Muestra	Bioensayo	Medio	Temperatura °C	Dilución	Réplica	N
CH0	1	GYM	8	10 E -1	1	3
CH0	1	Caseína	8	10 E -1	1	1
CH0	1	Avena	8	10 E -2	2	1
CH1	1	GYM	8	10 E -2	1	1
CH1	1	GYM	8	10 E -2	2	1
CH2	1	GYM	8	10 E -1	2	2
CH2	1	Avena	8	10 E -1	1	2
CH2	1	Caseína	8	10 E -1	2	1
CH3	1	GYM	8	10 E -1	2	6
CH3	1	Avena	8	10 E -1	1	2
CH3	1	Caseína	8	10 E -1	2	1
CH3	1	Avena	8	10 E -2	2	1
CX0	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	30
CX1	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	76
CX2	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	1
CX2	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	2	1
CA	1	Avena	8	10 E -1	2	1
CH0	1	Avena	26	10 E -1	1	2
CH0	1	Extracto de suelo	26	10 E -2	2	2
CH1	1	GYM	26	10 E -1	2	INC
CH1	1	Extracto de suelo	26	10 E -1	1	8
CH1	1	GYM	26	10 E -2	1	1
CH2	1	GYM	26	10 E -1	2	1
CH2	1	GYM	26	10 E -2	1	3
CH3	1	GYM	26	10 E -1	1	10
CH3	1	GYM	26	10 E -1	2	3
CH3	1	Extracto de suelo	26	10 E -1	2	3
CX1	1	GYM	26	10 E -1	1	INC
CX1	1	Avena	26	10 E -1	2	5
CX2	1	Avena	26	10 E -1	2	49
CX2	1	Avena	26	10 E -2	2	1
CX3	1	Avena	26	10 E -1	2	7

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 3. Número de colonias de actinomicetes de Bioensayo 2 aislados de muestras de suelos andinos y antárticos

Muestra	Bioensayo	Medio	Temperatura °C	Dilución	Réplica	N
CX3	2	Avena	26	10 E-2	2	1
CX3	2	Avena	26	10 E-2	1	1
CX3	2	Extracto de suelo	26	10 E-2	1	1
CX3	2	Caseína	26	10 E-1	2	1
CX3	2	Caseína	26	10 E-2	2	1
CX2	2	Extracto de suelo	26	10 E-2	2	1
CX2	2	Extracto de suelo	26	10 E-2	1	1
CX1	2	Caseína	8	10 E-2	2	1
CX0	2	Extracto de suelo	26	10 E-2	2	1
CH3	2	Extracto de suelo	26	10 E-2	1	1
CH3	2	Caseína	26	10 E-1	2	1
CH0	2	GYM	26	10 E-2	2	4
CA	2	GYM	26	10 E-2	1	1
CA	2	GYM	26	10 E-2	2	1
CA	2	Caseína	8	10 E-1	2	1

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 4. Número de colonias de bacterias de Bioensayo 2 aisladas de muestras de suelos andinos y antárticos

Muestra	Bioensayo	Medio	Temperatura °C	Dilución	Réplica	N
CX3	2	Avena	26	10 E-2	1	2
CX3	2	GYM	26	10 E-2	1	2
CX3	2	GYM	26	10 E-2	2	1
CX3	2	GYM	26	10 E-1	1	1
CX3	2	GYM	8	10 E-2	1	1
CX2	2	Caseína	26	10 E-1	1	2
CX2	2	Caseína	8	10 E-1	2	1
CX2	2	GYM	8	10 E-1	2	1
CX1	2	Caseína	8	10 E-2	1	2
CX0	2	GYM	8	10 E-2	1	1
CH3	2	Caseína	26	10 E-1	2	1
CH2	2	Caseína	26	10 E-2	1	1
CH1	2	GYM	8	10 E-2	1	1
CH1	2	Caseína	8	10 E-2	1	1
CH1	2	Caseína	8	10 E-1	2	1
CH0	2	GYM	8	10 E-2	1	1
CA	2	GYM	26	10 E-2	1	1

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 5. Número de unidades formadoras de colonias de actinomicetes aislados de muestras de suelos andinos y antárticos

Muestra	Bioensayo	Medio	Temperatura °C	Dilución	Réplica	UFC
CH3	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	INC
CH0	1	Extracto de suelo	26	10 E-1	2	INC
CH2	1	Extracto de suelo	26	10 E-1	2	INC
CX3	1	Extracto de suelo	26	10 E-1	2	INC
CH1	1	Extracto de suelo	8	10 E -2	1	135000
CX3	1	Extracto de suelo	8	10 E-1	1	99900
CX3	1	Extracto de suelo	8	10 E-1	2	81900
CX3	1	Avena	26	10 E-1	1	63000
CH2	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	2	50400
CX2	1	Extracto de suelo	26	10 E-1	1	44100
CX3	1	Avena	26	10 E-1	2	44100
CH0	1	GYM	26	10 E-2	2	36000
CH3	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	2	35100
CH0	1	Extracto de suelo	8	10 E -2	2	27000
CH0	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	25200
CH2	1	Avena	26	10 E-1	2	20700
CH0	1	GYM	8	10 E -2	2	18000
CH0	1	GYM	26	10 E-2	1	18000
CX3	1	Extracto de suelo	26	10 E-2	1	18000
CH2	1	Avena	8	10 E -1	1	15300
CH3	1	Extracto de suelo	26	10 E-1	2	12600
CX0	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	2	9900
CX3	1	Caseína	8	10 E-2	1	9000
CA	1	Caseína	8	10 E-2	1	9000
CH1	1	Extracto de suelo	26	10 E-1	1	9000
CH3	1	Extracto de suelo	26	10 E-2	1	9000
CX2	1	Avena	26	10 E-2	2	9000
CH0	1	Caseína	26	10 E-1	1	8100
CH0	1	GYM	26	10 E-1	2	7200
CH2	1	Avena	8	10 E -1	2	6300
CH3	1	Avena	8	10 E -1	1	6300
CH3	1	Avena	26	10 E-1	1	6300
CH0	1	GYM	26	10 E-1	1	5400
CH0	1	GYM	8	10 E -1	1	4500
CH3	1	Avena	8	10 E -1	2	3600
CH0	1	Avena	8	10 E -1	2	1800
CH0	1	Caseína	8	10 E -1	1	1800

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 6. Número de unidades formadoras de colonias de bacterias aisladas del Bioensayo 1 de muestras de suelos andinos y antárticos

Muestra	Bioensayo	Medio	Temperatura °C	Dilución	Réplica	UFC
CH1	1	GYM	26	10 E -1	2	INC
CX1	1	GYM	26	10 E -1	1	INC
CX1	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	68400
CX2	1	Avena	26	10 E -1	2	44100
CX0	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	27000
CH2	1	GYM	26	10 E -2	1	27000
CH0	1	Extracto de suelo	26	10 E -2	2	18000
CH0	1	Avena	8	10 E -2	2	9000
CH1	1	GYM	8	10 E -2	1	9000
CH1	1	GYM	8	10 E -2	2	9000
CH3	1	Avena	8	10 E -2	2	9000
CH1	1	GYM	26	10 E -2	1	9000
CH3	1	GYM	26	10 E -1	1	9000
CX2	1	Avena	26	10 E -2	2	9000
CH1	1	Extracto de suelo	26	10 E -1	1	7200
CX3	1	Avena	26	10 E -1	2	6300
CH3	1	GYM	8	10 E -1	2	5400
CX1	1	Avena	26	10 E -1	2	4500
CH0	1	GYM	8	10 E -1	1	2700
CH3	1	GYM	26	10 E -1	2	2700
CH3	1	Extracto de suelo	26	10 E -1	2	2700
CH2	1	GYM	8	10 E -1	2	1800
CH2	1	Avena	8	10 E -1	1	1800
CH3	1	Avena	8	10 E -1	1	1800
CH0	1	Avena	26	10 E -1	1	1800
CH0	1	Caseína	8	10 E -1	1	900
CH2	1	Caseína	8	10 E -1	2	900
CH3	1	Caseína	8	10 E -1	2	900
CX2	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	1	900
CX2	1	Extracto de suelo	8	10 E -1	2	900
CA	1	Avena	8	10 E -1	2	900
CH2	1	GYM	26	10 E -1	2	900

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 7. Número de unidades formadoras de colonias de actinomicetes aislados de muestras de suelos andinos y antárticos del Bioensayo 2

Muestra	Bioensayo	Medio	Temperatura °C	Dilución	Réplica	UFC
CH0	2	GYM	26	10 E-2	2	10000
CX3	2	Avena	26	10 E-2	2	2500
CX3	2	Avena	26	10 E-2	1	2500
CX3	2	Extracto de suelo	26	10 E-2	1	2500
CX3	2	Caseína	26	10 E-2	2	2500
CX2	2	Extracto de suelo	26	10 E-2	2	2500
CX2	2	Extracto de suelo	26	10 E-2	1	2500
CX1	2	Caseína	8	10 E-2	2	2500
CX0	2	Extracto de suelo	26	10 E-2	2	2500
CH3	2	Extracto de suelo	26	10 E-2	1	2500
CA	2	GYM	26	10 E-2	1	2500
CA	2	GYM	26	10 E-2	2	2500
CX3	2	Caseína	26	10 E-1	2	250
CH3	2	Caseína	26	10 E-1	2	250
CA	2	Caseína	8	10 E-1	2	250

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 8. Número de Unidades Formadoras de Colonias de bacterias aisladas de muestras de suelos andinos y antárticos del Bioensayo 2

Muestra	Bioensayo	Medio	Temperatura °C	Dilución	Réplica	UFC
CX3	2	Avena	26	10 E-2	1	5000
CX3	2	GYM	26	10 E-2	1	5000
CX1	2	Caseína	8	10 E-2	1	5000
CX3	2	GYM	26	10 E-2	2	2500
CX3	2	GYM	8	10 E-2	1	2500
CX0	2	GYM	8	10 E-2	1	2500
CH2	2	Caseína	26	10 E-2	1	2500
CH1	2	GYM	8	10 E-2	1	2500
CH1	2	Caseína	8	10 E-2	1	2500
CH0	2	GYM	8	10 E-2	1	2500
CA	2	GYM	26	10 E-2	1	2500
CX2	2	Caseína	26	10 E-1	1	500
CX3	2	GYM	26	10 E-1	1	250
CX2	2	Caseína	8	10 E-1	2	250
CX2	2	GYM	8	10 E-1	2	250
CH3	2	Caseína	26	10 E-1	2	250
CH1	2	Caseína	8	10 E-1	2	250

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 9. Codificación de actinomicetes aislados de ecosistemas Andinos y Antárticos

Código	Muestra	Bioensayo	Medio	Temperatura (°C)	Dilución	Réplica
DE 002	CH0	1	AES	26	10 E -1	1
DE 003	CH0	1	AES	26	10 E -1	1
DE 004	CH2	1	AES	26	10 E -1	2
DE 006	CH2	1	AES	26	10 E -1	2
DE 007	CH2	1	AES	26	10 E -1	2
DE 008	CH2	1	AES	26	10 E -1	2
DE 009	CX3	1	AES	26	10 E-2	2
DE 010	CH2	1	AES	26	10 E -1	2
DE 011	CH1	1	AES	26	10 E -1	1
DE 012	CH0	1	AES	26	10 E -1	2
DE 013	CH0	1	AES	26	10 E-2	2
DE 014	CH2	1	AA	26	10 E -1	2
DE 015	CH2	1	AA	26	10 E -1	2
DE 018	CH2	1	GYM	26	10 E -1	2
DE 019	CH2	1	AES	26	10 E -1	2
DE 020	CH2	1	GYM	26	10 E -1	1
DE 021	CX3	1	GYM	26	10 E-2	1
DE 022	CH0	1	GYM	26	10 E -1	2
DE 023	CH0	1	GYM	26	10 E -1	2
DE 024	CH0	1	GYM	26	10 E-2	1
DE 025	CH0	1	AA	26	10 E -1	1
DE 026	CH0	1	AA	26	10 E -1	1
DE 027	CH3	1	GYM	26	10 E -1	2
DE 029	CH3	1	GYM	26	10 E -1	2
DE 030	CX1	1	GYM	26	10 E-2	1
DE 031	CH3	1	GYM	26	10 E-2	1
DE 032	CH3	1	GYM	26	10 E-2	2
DE 033	CH2	1	AA	26	10 E -1	2
DE 034	CH2	1	AA	26	10 E -1	2
DE 035	CH3	1	AA	26	10 E-2	1
DE 036	CX2	1	AA	26	10 E -1	1
DE 037	CX3	1	AA	26	10 E -1	2
DE 038	CH0	1	AAC	26	10 E -1	1
DE 039	CH1	1	AAC	26	10 E -1	2
DE 040	CH3	1	AA	26	10 E -1	2
DE 041	CH3	1	AA	26	10 E -1	2
DE 042	CX1	1	GYM	26	10 E -1	1
DE 044	CH2	1	AA	8	10 E -1	2
DE 045	CH3	1	AA	8	10 E -1	1
DE 047	CH2	1	AAC	8	10 E -1	1
DE 049	CH0	1	GYM	8	10 E -1	2
DE 050	CH0	1	GYM	8	10 E -1	1
DE 051	CH2	1	AA	8	10 E -1	1
DE 052	CH2	1	AA	8	10 E -1	1
DE 053	CH0	1	AA	8	10 E -1	2
DE 054	CH2	1	AES	8	10 E -1	2

Tabla C 9. (Continuación)

DE 055	CH2	1	AES	8	10 E -1	2
DE 056	CH0	1	GYM	8	10 E-2	2
DE 057	CH0	1	GYM	8	10 E-2	1
DE 058	CH0	1	GYM	8	10 E-2	1
DE 059	CH0	1	GYM	8	10 E -1	2
DE 060	CA	1	AES	8	10 E -1	2
DE 061	CH0	1	AA	8	10 E -1	1
DE 062	CH3	1	AES	8	10 E -1	1
DE 063	CH0	1	AES	8	10 E-2	2
DE 064	CH3	1	AES	8	10 E-1	1
DE 065	CH0	2	GYM	26	10 E-2	2
DE 067	CX3	2	AA	26	10 E-2	2
DE 068	CA	2	GYM	26	10 E-2	1
DE 069	CH0	2	GYM	26	10 E-2	2
DE 070	CH0	2	GYM	26	10 E-2	2
DE 071	CH0	2	GYM	26	10 E-2	2
DE 073	CX3	2	AA	26	10 E-2	1
DE 074	CX3	2	AAC	26	10 E-1	2
DE 075	CA	2	GYM	26	10 E-2	2
DE 076	CH3	2	AAC	26	10 E-1	2
DE 078	CX3	2	AAC	26	10 E-2	2
DE 079	CX3	2	AAC	26	10 E-2	2
DE 080	CA	2	AAC	8	10 E-1	2
DE 081	CX1	2	AAC	8	10 E-2	2
DE 082	CX2	2	AES	26	10 E-2	2
DE 083	CX3	2	AES	26	10 E-2	1
DE 084	CX2	2	AES	26	10 E-2	1
DE 085	CH3	2	AES	26	10 E-2	1
DE 088	CX0	2	AES	26	10 E-2	2
DG 106	A-Sed	-	AN	26	10 E-2	2
DG 139	A-Aren	-	WA	26	10 E-2	1
DG 148	A-Aren	-	WA	26	10 E-1	2
DG 161	A-Aren	-	WA	26	10 E-2	1

Tabla C 10. Codificación de bacterias aisladas de ecosistemas Andinos y Antárticos

Código	Muestra	Bioensayo	Medio	Temperatura (°C)	Dilución	Réplica
DE 016	CH3	1	AA	26	10 E-2	1
DE 066	CA	2	GYM	26	10 E-2	1
DE 072	CX3	2	AA	26	10 E-2	1
DE 077	CH3	2	AAC	26	10 E-1	2
DE 090	DR 031	-	PDA	26	-	1
DE 091	CH0	1	AA	26	10 E-1	1
DE 092	CH1	1	AA	26	10 E-1	2
DE 093	CH0	1	AA	26	10 E-1	1
DE 094	CH3	1	AES	26	10 E-1	2
DE 095	CH2	1	GYM	26	10 E-1	2
DE 103	CH0	1	AA	26	10 E-1	1
DE 105	CH3	1	AAC	8	10 E-1	2
DE 106	CH2	1	AAC	8	10 E-1	2
DE 109	CH3	1	GYM	8	10 E-2	2
DE 110	CH1	1	AES	8	10 E-1	1
DE 115	CX3	2	GYM	26	10 E-2	1
DE 116	CH1	2	GYM	8	10 E-2	1
DE 117	CH0	2	GYM	8	10 E-2	1
DE 118	CX3	2	GYM	26	10 E-2	1
DE 119	CX3	2	GYM	26	10 E-2	2
DE 120	CX3	2	AA	26	10 E-2	1
DE 121	CH1	2	AAC	8	10 E-2	1
DE 122	CH1	2	AAC	8	10 E-1	2
DE 123	CX0	2	GYM	8	10 E-2	1
DE 124	CX3	2	GYM	26	10 E-1	1
DE 125	CH2	2	AAC	26	10 E-2	1
DE 126	CX2	2	AAC	26	10 E-1	1
DE 127	CX2	2	AAC	26	10 E-1	1
DE 128	CX2	2	AAC	8	10 E-1	2
DE 129	CX1	2	AAC	8	10 E-2	1
DE 130	CX1	2	AAC	8	10 E-2	1
DE 131	CX2	2	GYM	8	10 E-1	2
DE 132	CX3	2	GYM	8	10 E-2	1

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 11. Grupos color formado por los cultivos de actinomicetes aislados del medio agar avena

Grupo de color	Color		Códigos
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	
1	White	White	DE 008, DE 009, DE 011
2	White	Salmon pink	DE 012, DE 034
3	White	Current red	DE 015, DE 084
4	White	Aprient	DE 023
5	White	Golden brown	DE 026, DE 035, DE 045, DE 051, DE 052, DE 054, DE 055, DE 062, DE 063, DE 064, DG 161
6	White	Biscuit	DE 030
7	White	Light buff	DE 031, DE 039, DE 044, DE 065, DE 067, DE 069, DE 085
8	White	Deep cream	DE 075
9	White	Manilla	DE 080
10	White	Camouflage beige	DG 106, DG 139, DG 148
11	Biscuit	Ruby	DE 003
12	Biscuit	Light buff	DE 027, DE 078, DE 079
13	Biscuit	Biscuit	DE 032, DE 061
14	Biscuit	Golden brown	DE 076,
15	Biscuit	Golden yellow	DE 081
16	Biscuit	Cherry	DE 004
17	Camouflage beige	Golden brown	DE 013
18	Camouflage beige	Current red	DE 019
19	Cherry	Cherry	DE 002
20	Golden brown	Ruby	DE 040, DE 053, DE 060
21	Light brown	Golden brown	DE 020, DE 033, DE 047, DE 088
22	Light brown	Current red	DE 025
23	Light brown	Ruby	DE 041
24	Light buff	Cherry	DE 007, DE 010, DE 014, DE 018, DE 038
25	Light buff	Golden yellow	DE 068
26	Light violet	Biscuit	DE 050
27	Light violet	Light buff	DE 056, DE 057, DE 058, DE 059
28	Manilla	Manilla	DE 006
29	Manilla	Light buff	DE 037, DE 042, DE 049
30	Pale cream	Deep cream	DE 029
31	Pale roundel red	Aprient	DE 022
32	Pale roundel red	Salmon pink	DE 024
33	Salmon pink	Pale roundel red	DE 021
34	Salmon pink	Biscuit	DE 036
35	Salmon pink	Golden yellow	DE 070, DE 071, DE 073, DE 074
36	Transparente	Deep cream	DE 082, DE 083

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 12. Grupos color formado por los cultivos de actinomicetes aislados del medio GYM

Grupo de color	Color		Códigos
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	
1	Sky blue	Golden brown	DE 043
2	Deep cream	Light buff	DE 061, DE 032
3	Light buff	Apricot	DE 024
4	Manila	Light buff	DE 042, DE 022
5	Manila	Vellum	DE 027
6	Manila	Manila	DE029, DE030, DE068
7	Manila	Biscuit	DE 023
8	Manila	Salmon pink	DE 014
9	Biscuit	Primrose	DE 082
10	Biscuit	Light buff	DE 046
11	Beige	Golden yellow	DE 018
12	Camouflage beige	Deep cream	DE 005
13	Camouflage beige	Lemon	DE 026
14	Camouflage beige	Golden yellow	DE 010, DE 020, DE 033, DE 038, DE 047
15	Camouflage beige	Bold yellow	DE 002, DE 003, DE 053, DE 060
16	Camouflage beige	Beige	DE 084, DE 013, DE 039
17	Salmon pink	Manila	DE 075
18	Salmon pink	Salmon pink	DE 037
19	Pale roundel red	Pale roundel red	DE 056
20	White	Primrose	DE 078, DE 079, DE 058
21	White	Salmon pink	DE 041
22	White	Pale cream	DE 080
23	White	Golden yellow	DE 025
24	White	Light buff	DE 031, DE 040, DE 083
25	White	Manilla	DE 011, DE 049, DE 067, DE 070, DE 071, DE 073, DE 074, DE 088
26	White	Biscuit	DE 012, DE 035, DE 065, DE 069, DE 085
27	White	Salmon pink	DE 004, DE 007, DE 015, DE 016, DE 036, DE 044, DE 045, DE 051, DE 052, DE 054, DE 055 DE 062, DE 063, DE 064, DE 076, DE 087
28	White	Pale roundel red	DE 019, DE 034, DE 050
29	White	White	DE 006, DE 008, DE 009, DE 021
30	Transparente	Manilla	DE 081

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 13. Grupos color formados por los cultivos de bacterias aisladas del medio GYM

Grupo de color	Color	Códigos
1	White	DE 089, DE 090, DE 093, DE 094, DE 097, DE 099, DE 101, DE 105, DE 106, DE 107, DE 109, DE 110, DE 115, DE 116, DE 117, DE 118, DE 119, DE 121, DE 122, DE 123, DE 125, DE 126, DE 127, DE 128, DE 131, DE 132
2	Canary yellow	DE 124, DE 130
3	Light buff	DE 016, DE 066
4	Bold yellow	DE 072
5	Manilla	DE 092, DE 103, DE 129
6	Biscuit	DE 091, DE 095, DE 098
7	Salmon pink	DE 077
8	Pale roundel red	DE 096, DE 102, DE 120
9	Light orange	DE 100, DE 108

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 14. Caracterización microscópica de actinomicetes aislados de ecosistemas Andinos y Antárticos

Código	Morfología de Cadenas de Esporas	Código	Morfología de Cadenas de Esporas
DE 002	Recta corta	DE 049	Incompleta
DE 003	Recta corta	DE 050	Incompleta
DE 004	Recta corta	DE 051	Flexous
DE 006	Recta corta	DE 052	Recta corta
DE 007	Recta corta	DE 053	Recta corta
DE 008	Recta corta	DE 054	Recta corta
DE 009	Flexous	DE 055	Flexous
DE 010	Recta corta	DE 056	Incompleta
DE 011	Recta corta	DE 057	Incompleta
DE 012	Recta corta	DE 058	Incompleta
DE 013	Recta corta	DE 059	Incompleta
DE 014	Recta corta	DE 060	Recta corta
DE 015	Flexous	DE 061	Esporangios
DE 018	Incompleta	DE 062	Recta corta
DE 019	Recta corta	DE 063	Recta corta
DE 020	Incompleta	DE 064	Recta corta
DE 021	Recta corta	DE 065	Recta corta
DE 022	Recta corta	DE 067	Recta corta
DE 023	Recta corta	DE 068	Recta corta
DE 024	Incompleta	DE 069	Recta corta
DE 025	Recta corta	DE 070	Recta corta
DE 026	Recta corta	DE 071	Recta corta

Tabla C 14. (Continuación)

DE 027	Recta corta	DE 073	Recta corta
DE 029	Incompleta	DE 074	Recta corta
DE 030	Incompleta	DE 075	Recta corta
DE 031	Recta corta	DE 076	Recta corta
DE 032	Esporangios	DE 078	Recta corta
DE 033	Recta corta	DE 079	Recta corta
DE 034	Recta corta	DE 080	Incompleta
DE 035	Recta corta	DE 081	Recta corta
DE 036	Incompleta	DE 082	Recta corta
DE 037	Recta corta	DE 083	Recta corta
DE 038	Recta corta	DE 084	Recta corta
DE 039	Recta corta	DE 085	Recta corta
DE 040	Recta corta	DE 088	Recta corta
DE 041	Flexous	DG 106	Recta corta
DE 042	Incompleta	DG 139	Incompleta
DE 044	Flexous	DG 148	Incompleta
DE 045	Flexous	DG 161	Incompleta
DE 047	Recta corta		

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 15. Caracterización microscópica de bacterias aisladas de ecosistemas Andinos y Antárticos

Código	Forma		Tinción de Gram	
	Coco	Bacilo	Gram +	Gram -
DE 016	1	0	1	0
DE 066	0	1	1	0
DE 072	0	1	1	0
DE 077	0	1	1	0
DE 090	0	1	1	0
DE 091	0	1	1	0
DE 092	0	1	1	0
DE 093	0	0	1	0
DE 094	0	1	1	0
DE 095	0	1	1	0
DE 103	0	1	1	0
DE 105	0	1	1	0
DE 106	0	1	1	0
DE 109	1	0	1	0
DE 110	0	1	0	1
DE 115	1	0	1	0
DE 116	0	1	1	0

Tabla C 15. (Continuación)

DE 117	0	1	1	0
DE 118	1	0	1	0
DE 119	1	0	1	0
DE 120	0	0	1	0
DE 121	0	1	1	0
DE 122	0	1	1	0
DE 123	0	1	1	0
DE 124	0	1	1	0
DE 125	0	1	1	0
DE 126	0	1	1	0
DE 127	0	1	1	0
DE 128	0	1	1	0
DE 129	0	1	1	0
DE 130	0	1	1	0
DE 131	0	1	1	0
DE 132	1	0	1	0

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 16. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura

Código	Temperatura °C			Clasificación	Código	Temperatura °C			Clasificación
	4	20	26			4	20	26	
DE 002	1	1	1	Mesófilo	DE 049	1	1	1	Mesófilo
DE 003	1	1	1	Mesófilo	DE 050	1	1	1	Mesófilo
DE 004	1	1	1	Mesófilo	DE 051	1	1	1	Mesófilo
DE 006	0	1	1	Mesófilo	DE 052	1	1	1	Mesófilo
DE 007	1	1	1	Mesófilo	DE 053	1	1	1	Mesófilo
DE 008	0	1	1	Mesófilo	DE 054	1	1	1	Mesófilo
DE 009	0	1	1	Mesófilo	DE 055	1	1	1	Mesófilo
DE 010	0	1	1	Mesófilo	DE 056	1	1	1	Mesófilo
DE 011	0	1	1	Mesófilo	DE 057	1	1	1	Mesófilo
DE 012	1	1	1	Mesófilo	DE 058	1	1	1	Mesófilo
DE 013	1	1	1	Mesófilo	DE 059	1	1	1	Mesófilo
DE 014	1	1	1	Mesófilo	DE 060	1	1	1	Mesófilo
DE 015	1	1	1	Mesófilo	DE 061	1	1	1	Mesófilo
DE 018	1	1	1	Mesófilo	DE 062	1	1	1	Mesófilo
DE 019	1	1	1	Mesófilo	DE 063	1	1	1	Mesófilo
DE 020	1	1	1	Mesófilo	DE 064	1	1	1	Mesófilo
DE 021	0	1	1	Mesófilo	DE 065	1	1	1	Mesófilo
DE 022	1	1	1	Mesófilo	DE 067	0	1	1	Mesófilo
DE 023	0	1	1	Mesófilo	DE 068	1	1	1	Mesófilo
DE 024	1	1	1	Mesófilo	DE 069	1	1	1	Mesófilo

Tabla C 16. (Continuación)

DE 025	0	1	1	Mesófilo	DE 070	1	1	1	Mesófilo
DE 026	1	1	1	Mesófilo	DE 071	0	1	1	Mesófilo
DE 027	1	1	1	Mesófilo	DE 073	0	1	1	Mesófilo
DE 029	0	1	1	Mesófilo	DE 074	0	1	1	Mesófilo
DE 030	0	1	1	Mesófilo	DE 075	0	1	1	Mesófilo
DE 031	0	1	1	Mesófilo	DE 076	1	1	1	Mesófilo
DE 032	1	1	1	Mesófilo	DE 078	0	1	1	Mesófilo
DE 033	1	1	1	Mesófilo	DE 079	1	1	1	Mesófilo
DE 034	1	1	1	Mesófilo	DE 080	1	1	1	Mesófilo
DE 035	1	1	1	Mesófilo	DE 081	1	1	1	Mesófilo
DE 036	0	1	1	Mesófilo	DE 082	0	1	1	Mesófilo
DE 037	0	1	1	Mesófilo	DE 083	1	1	1	Mesófilo
DE 038	1	1	1	Mesófilo	DE 084	1	1	1	Mesófilo
DE 039	0	1	1	Mesófilo	DE 085	1	1	1	Mesófilo
DE 040	1	1	1	Mesófilo	DE 088	1	1	1	Mesófilo
DE 041	1	1	1	Mesófilo	DG 106	1	1	1	Mesófilo
DE 042	1	1	1	Mesófilo	DG 139	0	1	1	Mesófilo
DE 044	1	1	1	Mesófilo	DG 148	0	1	1	Mesófilo
DE 045	1	1	1	Mesófilo	DG 161	0	1	1	Mesófilo
DE 047	1	1	1	Mesófilo					

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 17. Clasificación de bacterias de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura

Código	Temperatura °C			Clasificación
	4	20	26	
DE 016	1	1	1	Mesófilo
DE 066	1	1	1	Mesófilo
DE 072	1	1	1	Mesófilo
DE 077	1	1	1	Mesófilo
DE 090	1	1	1	Mesófilo
DE 091	1	1	1	Mesófilo
DE 092	1	1	1	Mesófilo
DE 093	1	1	1	Mesófilo
DE 094	1	1	1	Mesófilo
DE 095	1	1	1	Mesófilo
DE 103	1	1	1	Mesófilo
DE 105	1	1	1	Mesófilo
DE 106	1	1	1	Mesófilo

Tabla C 17. (Continuación)

DE 109	1	1	1	Mesófilo
DE 110	1	1	1	Mesófilo
DE 115	1	1	1	Mesófilo
DE 116	1	1	1	Mesófilo
DE 117	1	1	1	Mesófilo
DE 118	1	1	1	Mesófilo
DE 119	1	1	1	Mesófilo
DE 120	0	1	1	Mesófilo
DE 121	1	1	1	Mesófilo
DE 122	1	1	1	Mesófilo
DE 123	1	1	1	Mesófilo
DE 124	1	1	1	Mesófilo
DE 125	1	1	1	Mesófilo
DE 126	1	1	1	Mesófilo
DE 127	1	1	1	Mesófilo
DE 128	1	1	1	Mesófilo
DE 129	1	1	1	Mesófilo
DE 130	1	1	1	Mesófilo
DE 131	1	1	1	Mesófilo
DE 132	1	1	1	Mesófilo

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 18. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento del pH del medio de cultivo

Código	pH					Clasificación	Código	pH					Clasificación
	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5			4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	
DE 002	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 049	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 003	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 050	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 004	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 051	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 006	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 052	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 007	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 053	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 008	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 054	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 009	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 055	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 010	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 056	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 011	1	1	1	1	0	Neutrotolerante	DE 057	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 012	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 058	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 013	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 059	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 014	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 060	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 015	1	1	1	1	1	Neutrófilo extremo	DE 061	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 018	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 062	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 019	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 063	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 020	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 064	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 021	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 065	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 022	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 067	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 023	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 068	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 024	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 069	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 025	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 070	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 026	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 071	1	1	1	0	0	Acidófilo

Tabla C 18. (Continuación)

DE 027	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 073	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 029	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 074	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 030	1	1	1	1	0	Neutrotolerante	DE 075	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 031	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 076	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 032	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 078	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 033	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 079	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 034	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 080	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 035	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 081	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 036	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 082	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 037	0	0	1	0	0	Neutrotolerante	DE 083	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 038	1	1	1	0	0	Acidófilo	DE 084	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 039	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 085	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 040	1	1	1	0	0	Neutrotolerante	DE 088	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 041	1	1	1	0	0	Acidófilo	DG 106	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 042	1	1	1	1	1	Álcalitolerante	DG 139	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 044	1	1	1	0	0	Acidófilo	DG 148	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 045	1	1	1	1	0	Neutrotolerante	DG 161	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 047	1	1	1	0	0	Acidófilo							

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 19. Clasificación de bacterias de acuerdo al rango de crecimiento del pH del medio de cultivo

Código	pH					Clasificación
	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	
DE 016	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 066	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 072	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 077	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 090	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 091	1	1	1	1	1	Neutrotolerante extremo
DE 092	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 093	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 094	1	1	1	1	1	Neutrotolerante extremo
DE 095	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 103	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 105	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 106	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 109	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 110	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 115	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 116	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 117	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 118	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 119	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 120	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 121	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 122	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 123	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 124	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 125	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 126	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 127	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 128	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 129	1	1	1	1	0	Acidófilo
DE 130	1	1	1	0	0	Acidófilo
DE 131	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DE 132	1	1	1	1	0	Neutrotolerante

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 20. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de la concentración de NaCl del medio de cultivo

Código	NaCl %			Clasificación	Código	NaCl %			Clasificación
	1	10	15			1	10	15	
DE 002	1	0	0	Halófilo débil	DE 049	1	0	0	Halófilo débil
DE 003	1	0	0	Halófilo débil	DE 050	1	0	0	Halófilo débil
DE 004	1	0	0	Halófilo débil	DE 051	1	0	0	Halófilo débil
DE 006	1	0	0	Halófilo débil	DE 052	1	0	0	Halófilo débil
DE 007	1	0	0	Halófilo débil	DE 053	1	0	0	Halófilo débil
DE 008	1	0	0	Halófilo débil	DE 054	1	0	0	Halófilo débil
DE 009	1	0	0	Halófilo débil	DE 055	1	0	0	Halófilo débil
DE 010	1	0	0	Halófilo débil	DE 056	1	0	0	Halófilo débil
DE 011	1	0	0	Halófilo débil	DE 057	1	0	0	Halófilo débil
DE 012	1	0	0	Halófilo débil	DE 058	1	0	0	Halófilo débil
DE 013	1	0	0	Halófilo débil	DE 059	1	0	0	Halófilo débil
DE 014	1	0	0	Halófilo débil	DE 060	1	0	0	Halófilo débil
DE 015	1	0	0	Halófilo débil	DE 061	1	0	0	Halófilo débil
DE 018	1	0	0	Halófilo débil	DE 062	1	0	0	Halófilo débil
DE 019	1	0	0	Halófilo débil	DE 063	1	0	0	Halófilo débil
DE 020	1	0	0	Halófilo débil	DE 064	1	1	1	Halófilo extremo
DE 021	1	0	0	Halófilo débil	DE 065	1	0	0	Halófilo débil
DE 022	1	0	0	Halófilo débil	DE 067	1	0	0	Halófilo débil
DE 023	1	0	0	Halófilo débil	DE 068	1	1	0	Halófilo
DE 024	1	0	0	Halófilo débil	DE 069	1	0	0	Halófilo débil
DE 025	1	0	0	Halófilo débil	DE 070	1	1	1	Halófilo extremo
DE 026	1	0	0	Halófilo débil	DE 071	1	0	0	Halófilo débil
DE 027	1	0	0	Halófilo débil	DE 073	1	0	0	Halófilo débil
DE 029	1	0	0	Halófilo débil	DE 074	1	0	0	Halófilo débil
DE 030	1	1	1	Halófilo extremo	DE 075	1	0	0	Halófilo débil
DE 031	1	0	0	Halófilo débil	DE 076	1	0	0	Halófilo débil
DE 032	1	0	0	Halófilo débil	DE 078	1	0	0	Halófilo débil
DE 033	1	0	0	Halófilo débil	DE 079	1	0	0	Halófilo débil
DE 034	1	0	0	Halófilo débil	DE 080	1	1	0	Halófilo
DE 035	1	0	0	Halófilo débil	DE 081	1	0	0	Halófilo débil
DE 036	1	0	0	Halófilo débil	DE 082	1	1	0	Halófilo
DE 037	1	0	0	Halófilo débil	DE 083	1	0	0	Halófilo débil
DE 038	1	0	0	Halófilo débil	DE 084	1	1	0	Halófilo
DE 039	1	0	0	Halófilo débil	DE 085	1	0	0	Halófilo débil
DE 040	1	0	0	Halófilo débil	DE 088	1	0	0	Halófilo débil
DE 041	1	0	0	Halófilo débil	DG 106	1	1	1	Halófilo extremo
DE 042	1	0	0	Halófilo débil	DG 139	1	1	0	Halófilo

Tabla C 20. (Continuación)

DE 044	1	0	0	Halófilo débil	DG 148	1	1	0	Halófilo
DE 045	1	0	0	Halófilo débil	DG 161	1	1	0	Halófilo
DE 047	1	0	0	Halófilo débil					

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla C 21. Clasificación de bacterias de acuerdo al rango de la concentración de NaCl del medio de cultivo

Código	NaCl %			Clasificación
	1	10	15	
DE 016	1	1	1	Halófilo extremo
DE 066	1	1	1	Halófilo extremo
DE 072	1	0	0	Halófilo débil
DE 077	1	0	0	Halófilo débil
DE 090	1	1	1	Halófilo extremo
DE 091	1	1	1	Halófilo extremo
DE 092	1	0	0	Halófilo débil
DE 093	1	1	1	Halófilo extremo
DE 094	1	1	1	Halófilo extremo
DE 095	1	1	1	Halófilo extremo
DE 103	1	1	1	Halófilo extremo
DE 105	1	1	1	Halófilo extremo
DE 106	1	1	1	Halófilo extremo
DE 109	1	1	1	Halófilo extremo
DE 110	1	0	0	Halófilo débil
DE 115	1	1	1	Halófilo extremo
DE 116	1	0	0	Halófilo débil
DE 117	1	0	0	Halófilo débil
DE 118	1	1	1	Halófilo extremo
DE 119	1	1	1	Halófilo extremo
DE 120	1	1	1	Halófilo extremo
DE 121	1	0	0	Halófilo débil
DE 122	1	1	1	Halófilo extremo
DE 123	1	1	1	Halófilo extremo
DE 124	1	1	1	Halófilo extremo
DE 125	1	0	0	Halófilo débil
DE 126	1	1	1	Halófilo extremo
DE 127	1	0	0	Halófilo débil
DE 128	1	0	0	Halófilo débil
DE 129	1	0	0	Halófilo débil
DE 130	1	1	1	Halófilo extremo

Tabla C 21. (Continuación)

DE 131	1	0	0	Halófilo débil
DE 132	1	0	0	Halófilo débil

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

ANEXO D. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETES Y BACTERIAS AISLADOS DE ECOSISTEMAS GLACIALES

Tabla D 1. Determinación de la actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados frente a bacterias patógenas, medida según el diámetro del halo de inhibición después de 24 horas

Código	<i>B. coagulans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
DE 002	23	24	0	21,5	40	15,5	0	13
DE 003	7,5	0	0	0	0	0	0	0
DE 004	15,5	0	0	0	0	0	0	0
DE 006	10	0	0	11	0	0	0	12,5
DE 007	11	0	0	0	0	0	0	0
DE 008	19	16,5	0	11	0	13,5	0	9
DE 009	19	16	0	20,5	0	14	0	14
DE 011	0	7	0	7	0	0	0	0
DE 012	7,5	0	0	7,5	0	0	0	0
DE 013	9,5	0	0	0	0	10	0	0
DE 014	9	0	0	0	0	0	0	0
DE 015	10	0	0	0	0	0	0	0
DE 018	22,5	23,5	0	20,5	0	17,5	0	18
DE 019	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 020	25	25,5	0	34	0	0	0	22
DE 021	10	0	0	0	0	10,5	0	0
DE 022	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 023	13	0	0	0	0	0	0	0
DE 024	0	0	0	19	0	0	0	0
DE 025	24,5	20,5	0	18	0	15,5	0	18,5
DE 026	19,5	17,5	0	6	0	11,5	0	16
DE 027	0	0	0	22	0	10	0	0

Tabla D 1. (Continuación)

DE 029	21,5	17	0	0	30	17,5	0	16
DE 030	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 031	0	0	0	0	0	20	0	0
DE 032	0	0	0	26	0	10	0	0
DE 033	19	16	0	0	0	11	0	16
DE 034	0	0	0	0	0	10	0	0
DE 035	9,5	0	1,25	0	0	13,5	0	0
DE 036	11,5	0	1,5	31	0	0	0	10
DE 037	21,5	0	0	27	0	12,5	0	0
DE 038	21	20	0	0	0	15,5	0	18,5
DE 039	0	0	0	0	0	20	0	0
DE 040	0	0	0	11,5	0	0	0	0
DE 041	0	0	1,35	0	0	0	0	0
DE 042	0	11	0	15	0	0	0	0
DE 044	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 045	18,5	0	0	22	0	0	0	0
DE 047	26	26	0	0	32	0	0	22
DE 049	0	0	0	19,5	0	0	0	0
DE 050	0	0	0	17	0	0	0	0
DE 051	12	0	2,5	0	35	0	0	0
DE 052	14	0	1,5	19	16	0	0	0
DE 053	23,5	19	1,35	14	23	0	0	17,5
DE 054	0	0	0	0	16	0	0	0
DE 055	0	0	0	0	0	10	0	0
DE 056	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla D 1. (Continuación)

DE 057	0	0	0	17	0	0	0	0
DE 058	0	0	0	17	0	0	0	0
DE 059	0	0	0	17	0	0	0	0
DE 060	21	21	0	0	0	0	0	17,5
DE 061	0	0	2,5	0	0	0	0	0
DE 062	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 063	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 064	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 065	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 067	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 068	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 069	11,5	0	0	0	0	0	0	0
DE 070	0	0	1,5	0	11	0	0	0
DE 071	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 073	0	0	0	8,5	0	0	0	8
DE 074	0	0	0	8,5	0	0	0	8
DE 075	9	0	0	0	0	0	0	8,5
DE 076	7,5	0	0	0	0	0	0	0
DE 078	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 079	0	0	0	0	0	0	0	0
DE 080	19	0	2,25	0	0	0	0	17
DE 081	19	0	2,25	0	0	0	0	17
DE 082	0	11	0	15	0	0	0	0
DE 083	0	0	1,35	0	0	0	0	0
DE 084	9	0	22,5	0	0	0	0	0

Tabla D 1. (Continuación)

DE 085	0	0	20	0	0	0	0	0	0
DE 088	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DG 106	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DG 139	0	0	17	0	0	0	0	0	0
DG 148	0	0	11	0	0	0	0	0	0
DG 161	0	0	20,5	0	0	0	0	0	0

Promedio en milímetros de la medida del halo de inhibición polar y ecuatorial

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla D 2. Determinación de la actividad antimicrobiana de bacterias aisladas frente a bacterias patógenas, medida según el diámetro del halo de inhibición después de 24 horas

Código	<i>B. coagulans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
DE 072	0	8	0
DE 077	0	11,5	0
DE 091	11,5	0	10
DE 100	0	13,5	0
DE 103	9	0	7
DE 105	10	0	0
DE 106	15,5	0	0
DE 110	0	9,5	0
DE 116	9	0	0
DE 117	14,5	0	0
DE 120	0	12,5	0
DE 123	30	0	20
DE 124	0	16	0
DE 127	9	0	0
DE 130	0	8,5	0
DE 131	9	0	0
DE 132	9	0	0

Promedio en milímetros de la medida del halo de inhibición polar y ecuatorial.

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla D 3. Determinación de la actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados frente a hongos fitopatógenos, medida según el diámetro del halo de inhibición, después de 48 horas

Código	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Phoma</i>	<i>Saccharomyces</i>
DE 002	0	11	0	0	20	0	0
DE 003	0	10	0	0	18	0	0
DE 006	24	7	37	10	16	20	0
DE 009	0	10,5	0	0	16,5	0	0
DE 010	0	0	0	0	12	0	0
DE 012	0	7	0	0	0	0	0
DE 017	0	11	0	0	16	0	0
DE 018	0	10,5	0	19,5	16	7	0
DE 020	0	0	0	0	13	0	0
DE 023	0	0	0	0	0	0	8
DE 025	0	7	0	0	19	7	0
DE 029	0	0	12	0	0	0	0
DE 031	11,5	10	0	9,5	11	17,5	11,5
DE 032	0	10	21	0	0	0	0
DE 033	10,5	10	0	0	19	0	0
DE 034	15	0	25,5	0	0	7	0
DE 038	8	0	0	19,5	0	8,5	0
DE 039	20,5	0	0	0	0	0	0
DE 047	0	0	0	0	14	13,5	0
DE 053	12,5	7	0	0	15,5	15	0

Tabla D 3. (Continuación)

DE 056	7	0	0	0	15,5	0	0
DE 057	7	0	0	0	15,5	0	0
DE 058	7	0	0	0	15,5	0	0
DE 059	7	0	0	0	15,5	0	0
DE 060	0	7	0	0	0	0	0
DE 068	0	10	0	0	0	0	0
DE 070	0	0	0	0	13	0	0
DE 081	29,5	25,5	36	23,5	40	34	0
DE 083	29,5	25,5	36	23,5	40	34	0
DE 084	29	17	40	20,5	36	32	19
DE 087	3,5	7	20	0	23,5	0	0
DG 106	0	0	22	0	13	20	0

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

Tabla D 4. Determinación de la actividad antimicrobiana de bacterias aisladas frente a hongos fitopatógenos, medida según el diámetro del halo de inhibición, después de 48 horas

Código	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Phoma</i>
DE 016	0	0	0	13	0	0
DE 072	0	0	0	0	11	0
DE 117	0	0	0	25	0	0
DE 119	35,5	40	39	0	0	31,5
DE 121	27,5	0	0	25	0	23
DE 122	33	0	0	25	0	22
DE 123	20,5	27,5	0	35	0	24
DE 125	29	36	45	0	0	26,5
DE 126	0	0	0	25	0	0
DE 127	13,5	0	0	17,5	0	21
DE 128	7	0	0	34	0	19
DE 131	14,5	0	7	22	0	28
DE 132	15	0	12	27,5	0	0

Elaborado por: Díaz y Estrada, 2017.

ANEXO E. TABLAS DE COLORES

British Standard Specification of Colors for Identification Coding and Special Purposes



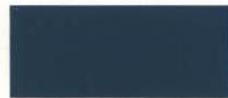
172 Pale roundel blue



112 Arctic blue



101 Sky blue



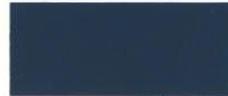
103 Peacock blue



104 Azure blue



109 Middle blue



113 Deep Saxe blue



110 Roundel blue



105 Oxford blue



106 Royal blue



280 Verdigris green



283 Aircraft grey green



216 Eau-de-Nil



210 Sky



217 Sea green



267 Deep chrome green



225 Light Brunswick green



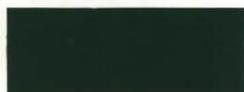
285M NATO green



220 Olive green



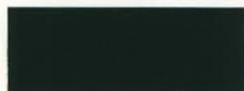
241 (641) Dark green



226 Middle Brunswick green



298 Olive drab



227 Deep Brunswick green



223 Middle bronze green



224 Deep bronze green



310 Primrose



367 Manilla



365 Vellum



353 Deep cream



369 Biscuit



352 Pale cream



384 Light straw



389 Camouflage beige



388 Beige



358 Light buff



361 Light stone



320 (410) Light brown



337 (437) Very dark drab



499 Service brown



447 Salmon pink



797 Light violet



454 Pale roundel red



414 Golden brown



411 Middle brown



445 Venetian red



542 Ruby



436M Dark camouflage brown



412 Dark brown



541 Maroon



796 Dark violet



108 Aircraft blue



166 French blue



175 Light French blue



107 Strong blue



228 Emerald green



262 Bold green



221 Brilliant green



218 Grass green



309 Canary yellow



363 Bold yellow



355 Lemon



356 Golden yellow



568 (368) Apricot



557 Light orange



592 International orange



593 Rail red



537 Signal red



564 Bold red



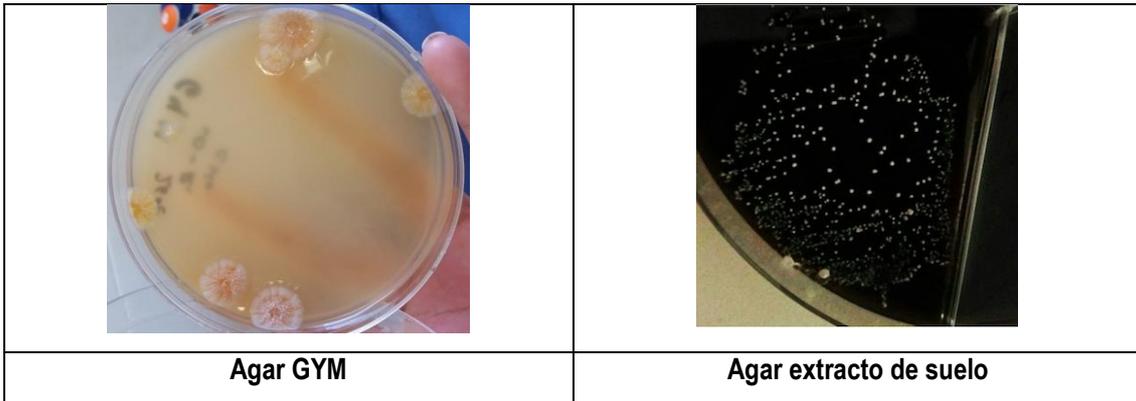
539 Currant red



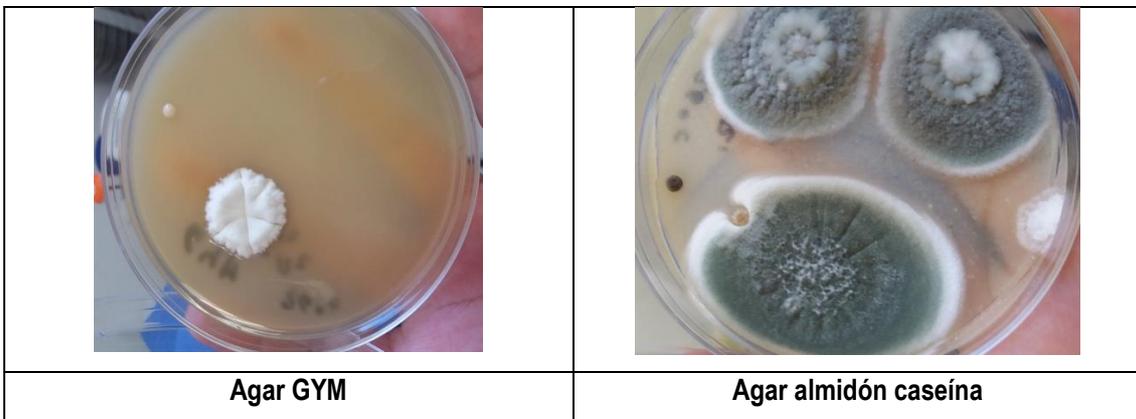
538 Cherry

ANEXO F. FOTOGRAFÍAS

Aislamiento selectivo en el Bioensayo 1

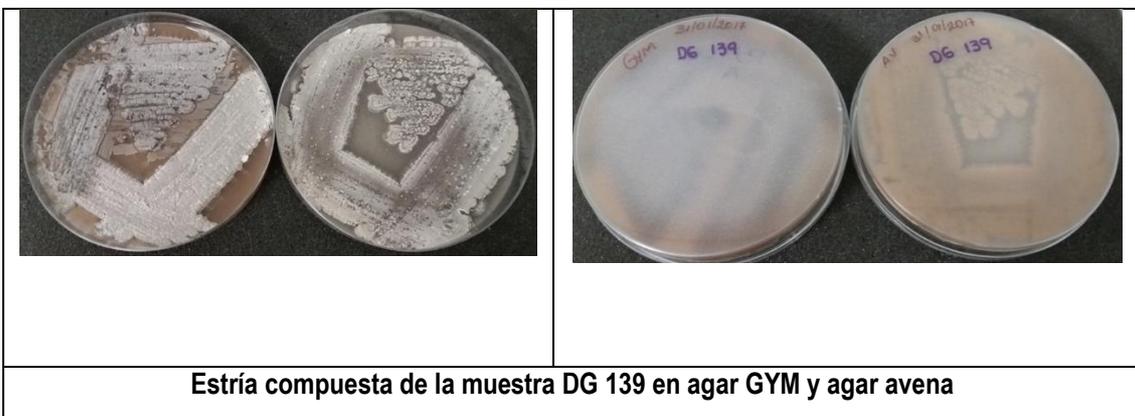
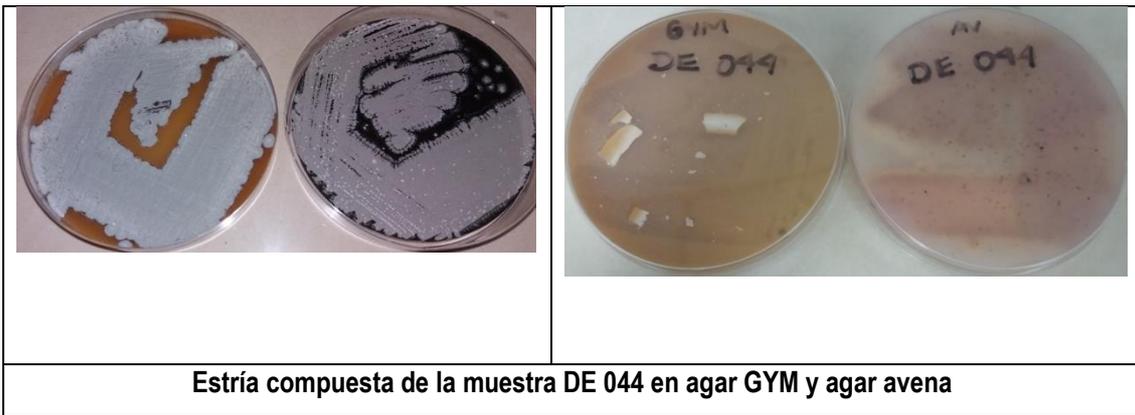


Aislamiento selectivo en el Bioensayo 2

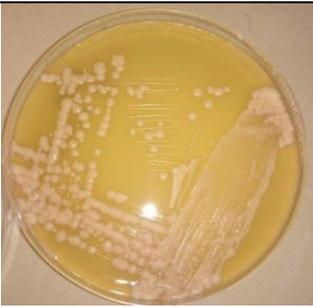
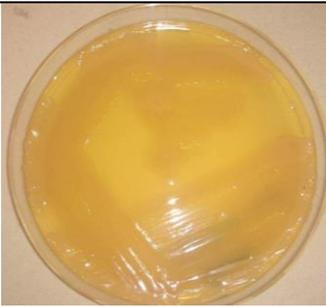


Caracterización macroscópica de actinomicetes

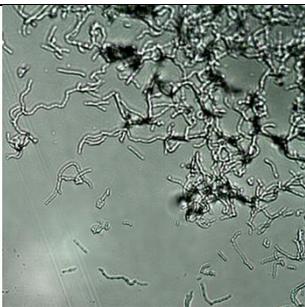
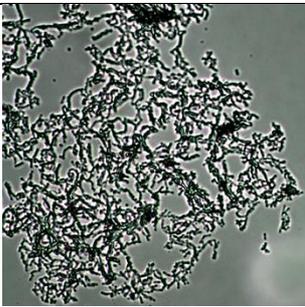




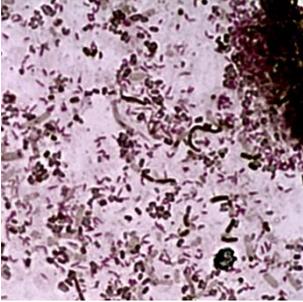
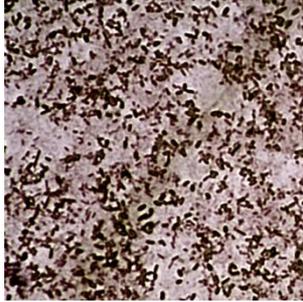
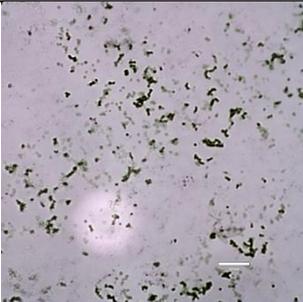
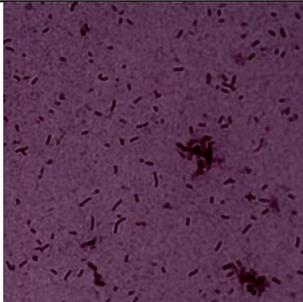
Caracterización macroscópica de bacterias en medio GYM

	
Estría compuesta de la muestra DE 118	Estría compuesta de la muestra DE 093
	
Estría compuesta de la muestra DE 105	Estría compuesta de la muestra DE 117

Caracterización microscópica de actinomicetes en medio GYM

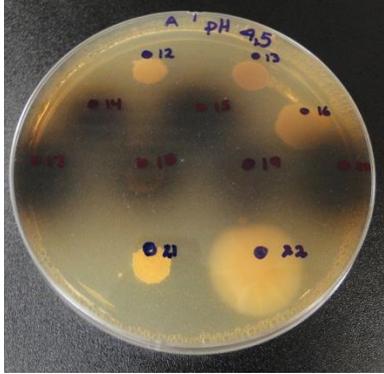
	
DE 002	DE 006
	
DE 013	DE 020

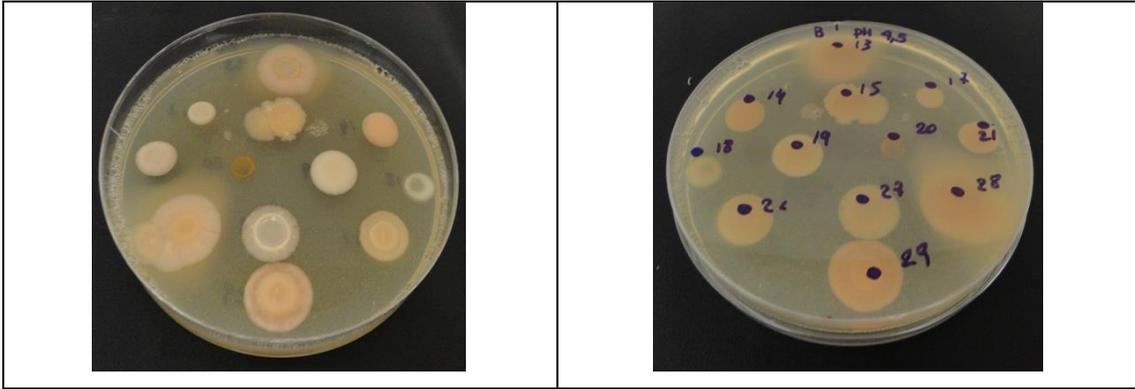
Caracterización microscópica de bacterias en medio GYM

	
DE 105	DE 110
	
DE 120	DE 127

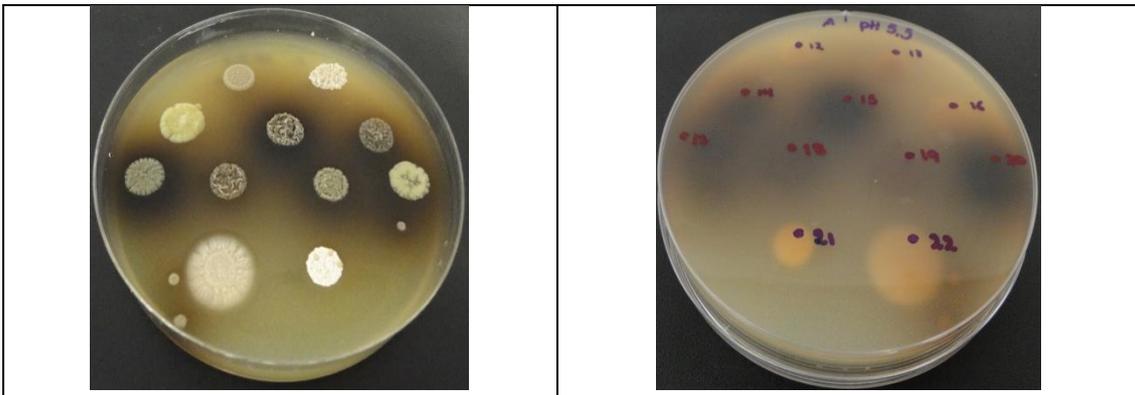
Caracterización fisiológica y bioquímica de los aislamientos

Crecimiento de microorganismos en función del pH

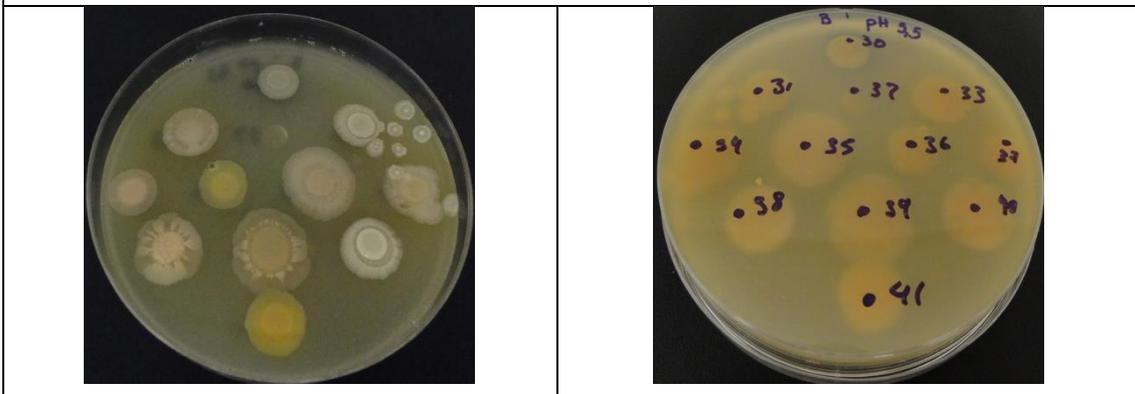
	
Taxonomía numérica de actinomicetes en medio GYM a pH 4.5	



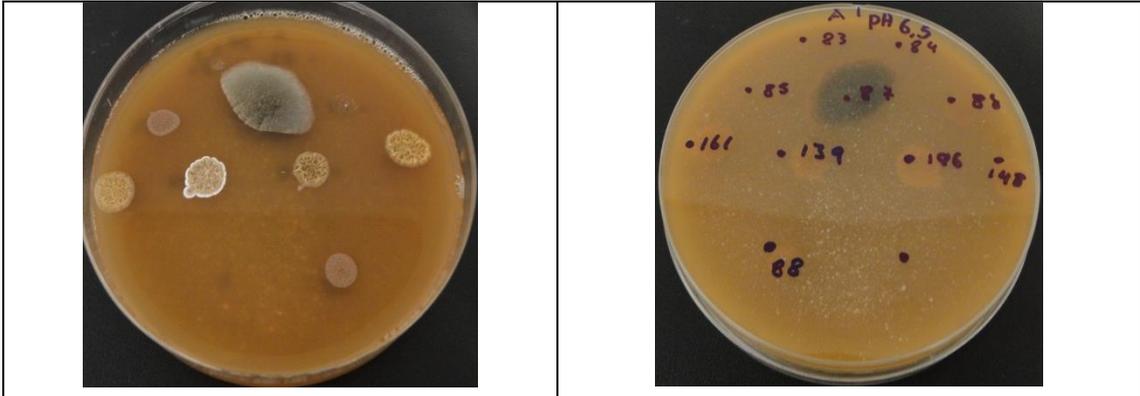
Taxonomía numérica de bacterias en medio GYM a pH 4.5



Taxonomía numérica de actinomicetes en medio GYM a pH 5.5



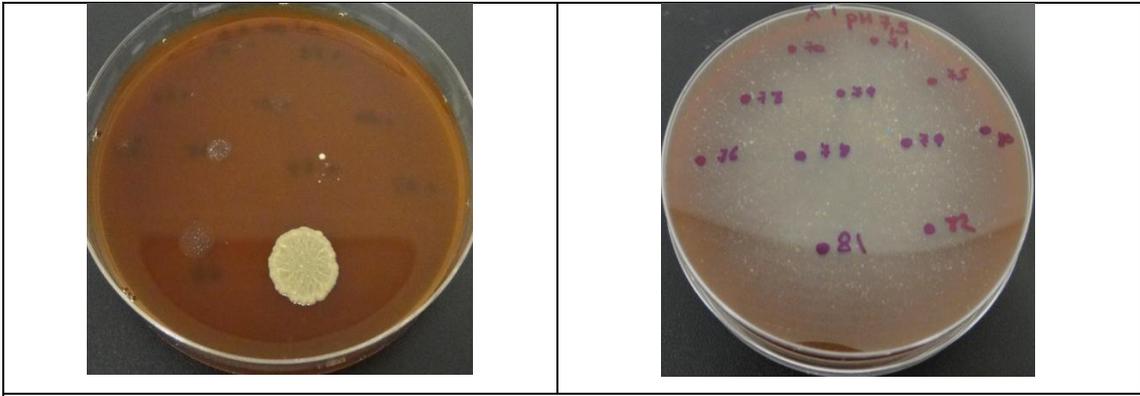
Taxonomía numérica de bacterias en medio GYM a pH 5.5



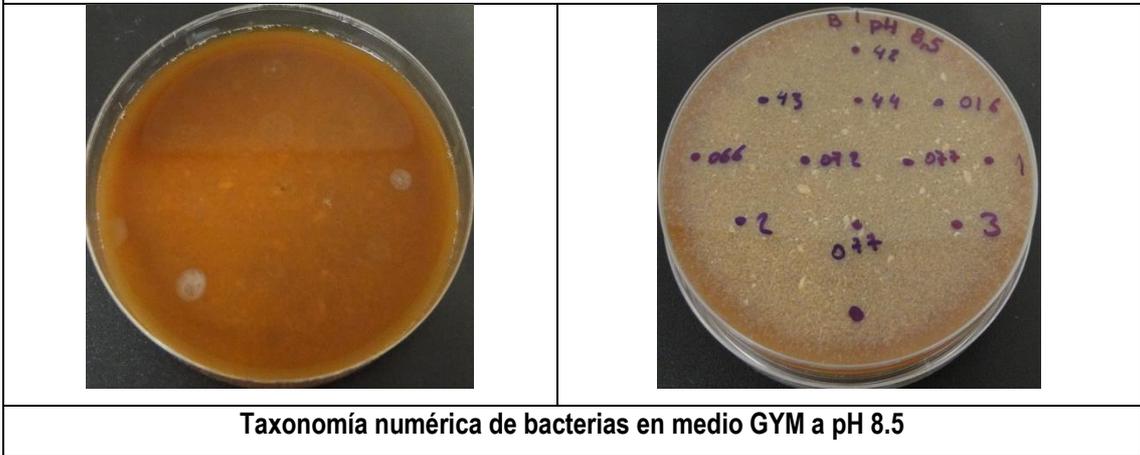
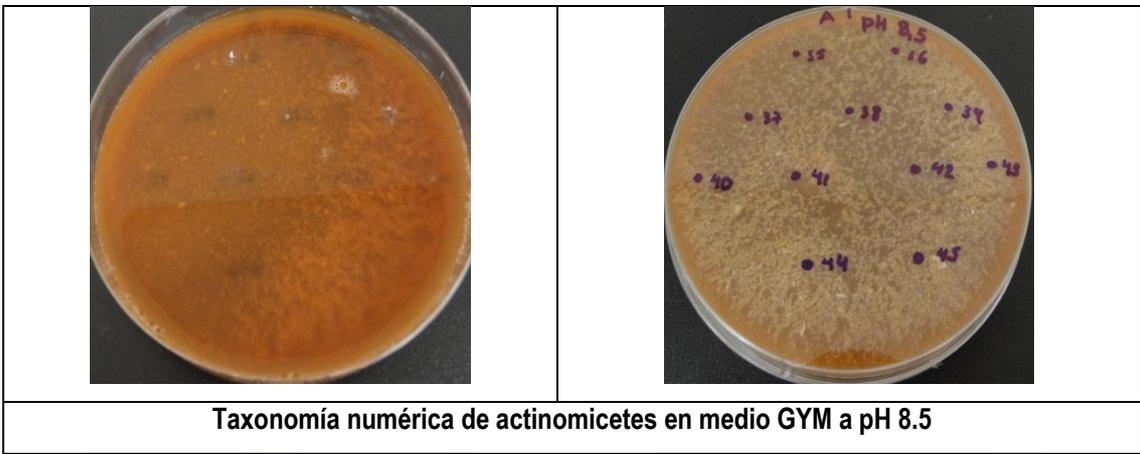
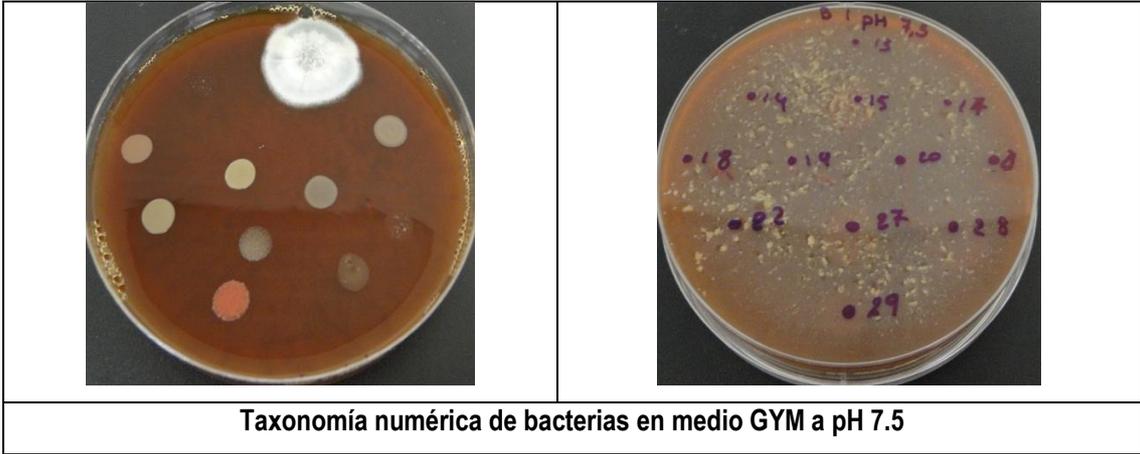
Taxonomía numérica de actinomicetes en medio GYM a pH 6.5



Taxonomía numérica de bacterias en medio GYM a pH 6.5



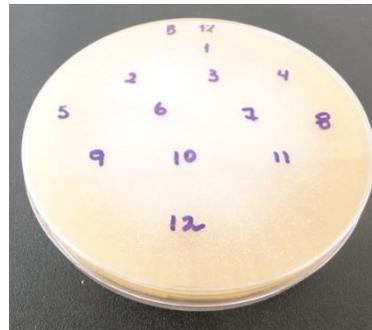
Taxonomía numérica de actinomicetes en medio GYM a pH 7.5



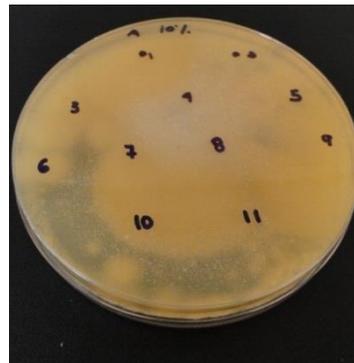
Crecimiento de microorganismos en función de la salinidad



Taxonomía numérica de actinomicetes al 1% de NaCl en medio GYM



Taxonomía numérica de bacterias al 1% de NaCl en medio GYM



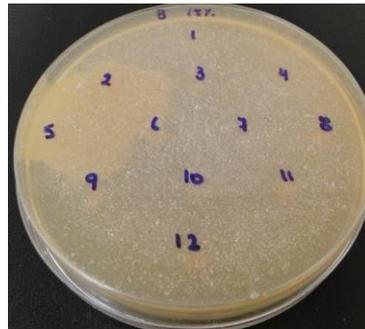
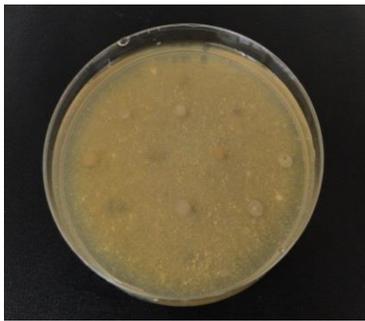
Taxonomía numérica de actinomicetes al 10% de NaCl en medio GYM



Taxonomía numérica de bacterias al 10% de NaCl en medio GYM

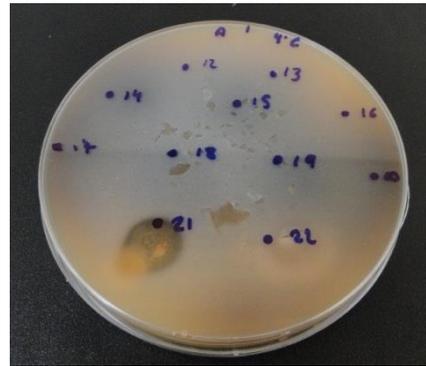
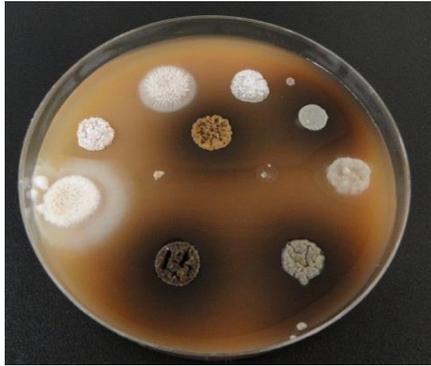


Taxonomía numérica de actinomicetes al 15% de NaCl en medio GYM

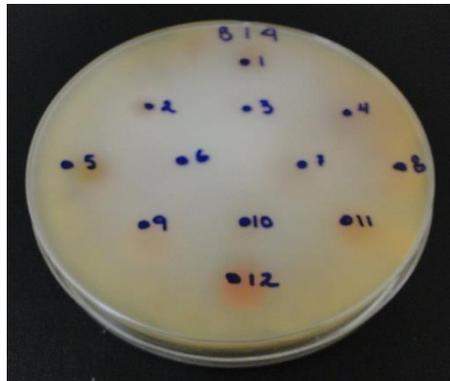


Taxonomía numérica de bacterias al 15% de NaCl en medio GYM

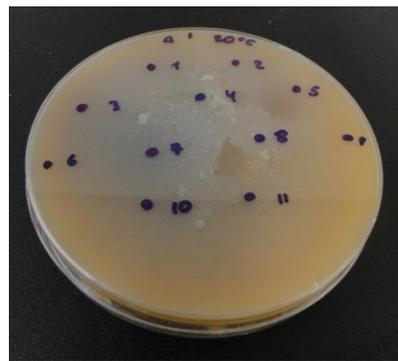
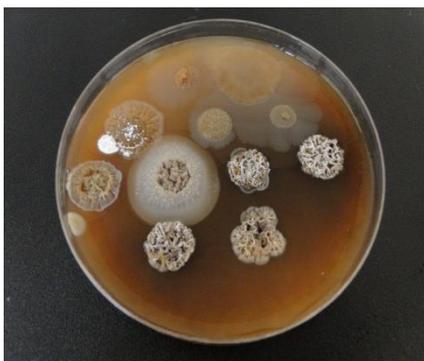
Crecimiento de microorganismos en función de la temperatura



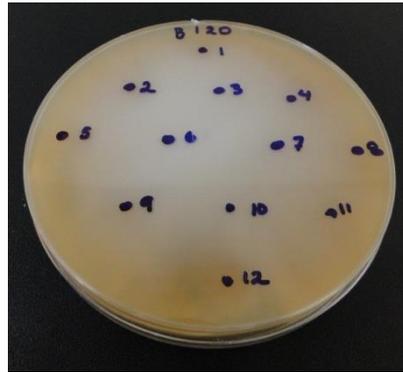
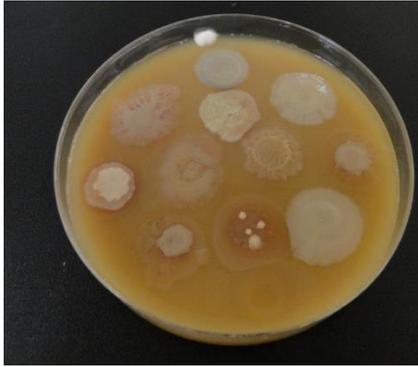
Taxonomía numérica de actinomicetes en medio GYM a 4°C



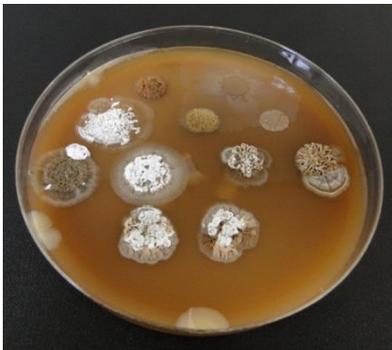
Taxonomía numérica de bacterias en medio GYM a 4°C



Taxonomía numérica de actinomicetes en medio GYM a 20°C



Taxonomía numérica de bacterias en medio GYM a 20°C

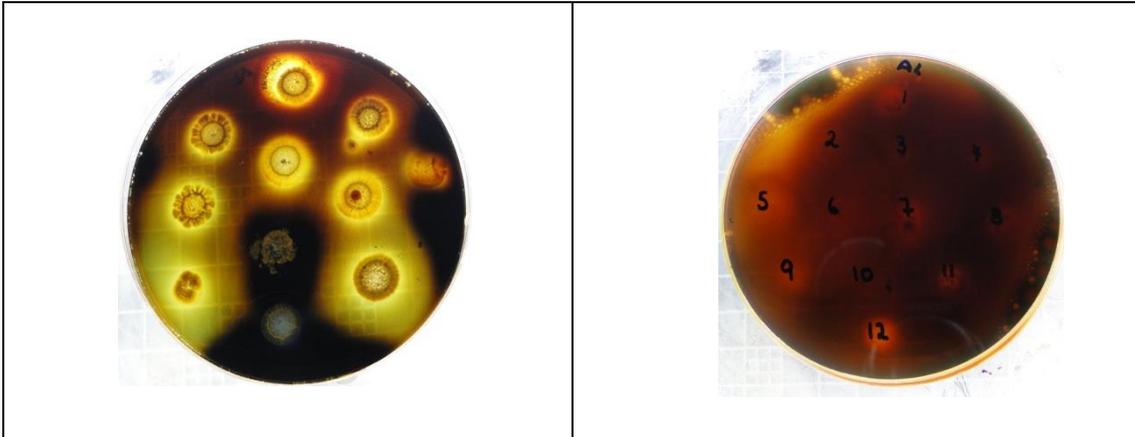


Taxonomía numérica de actinomicetes en medio GYM a 26°C

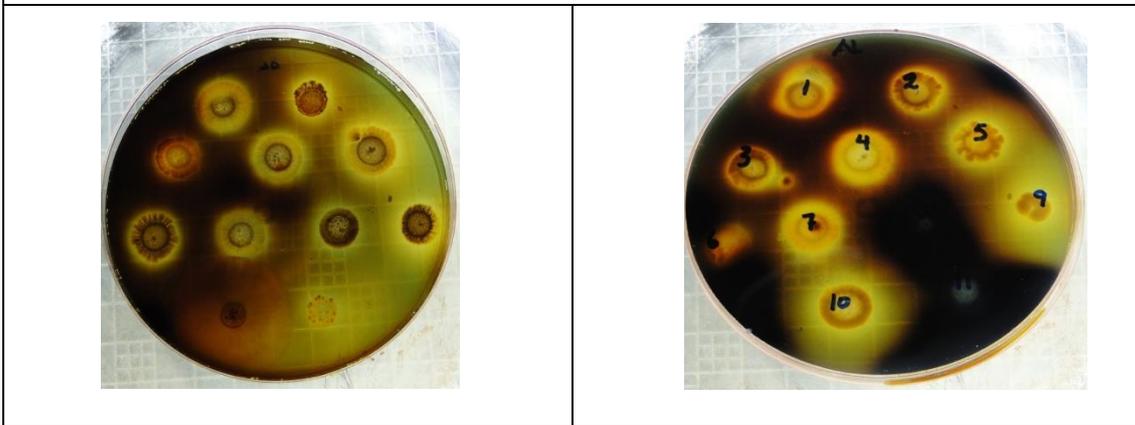


Taxonomía numérica de bacterias en medio GYM a 26°C

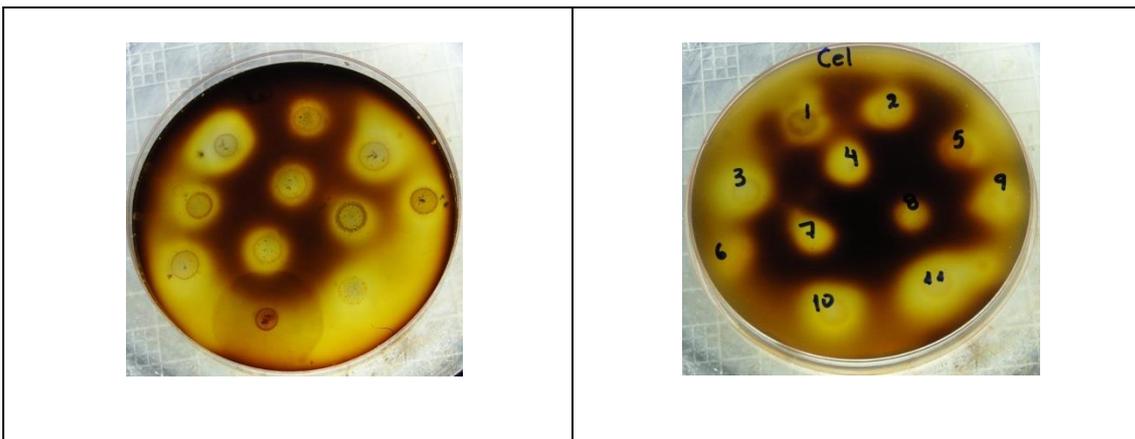
Producción de enzimas extracelulares



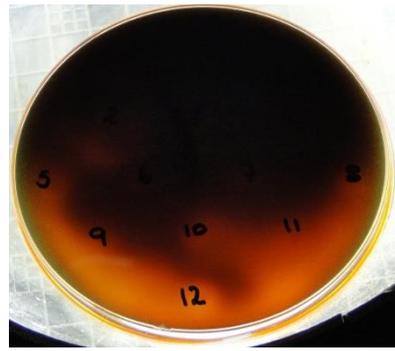
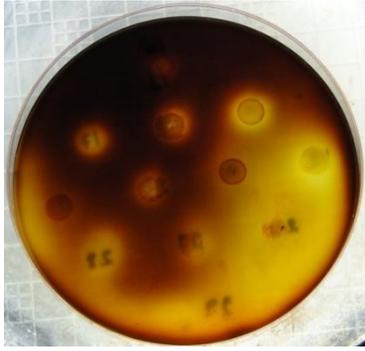
Producción de amilasas a partir de actinomicetes



Producción de amilasas a partir de bacterias



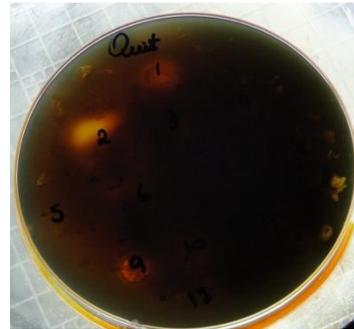
Producción de celulasas a partir de actinomicetes



Producción de celulasas a partir de bacterias



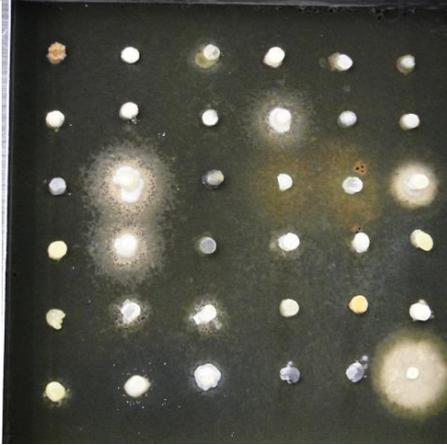
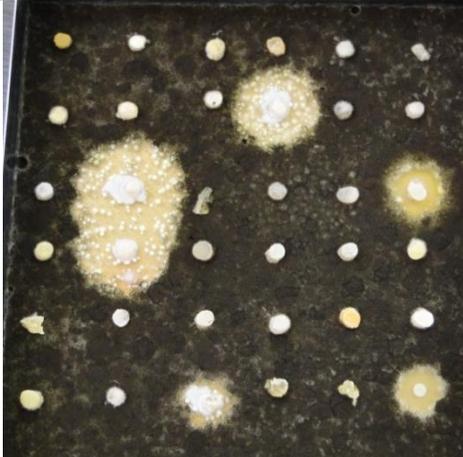
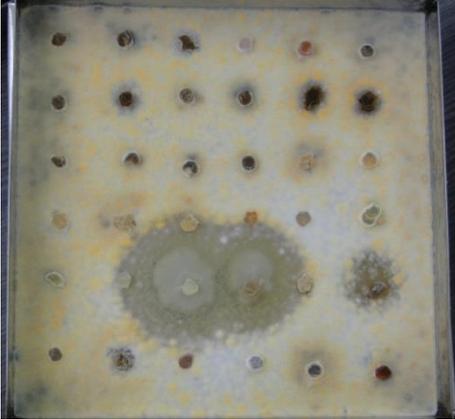
Producción de quitinasas a partir de actinomicetes

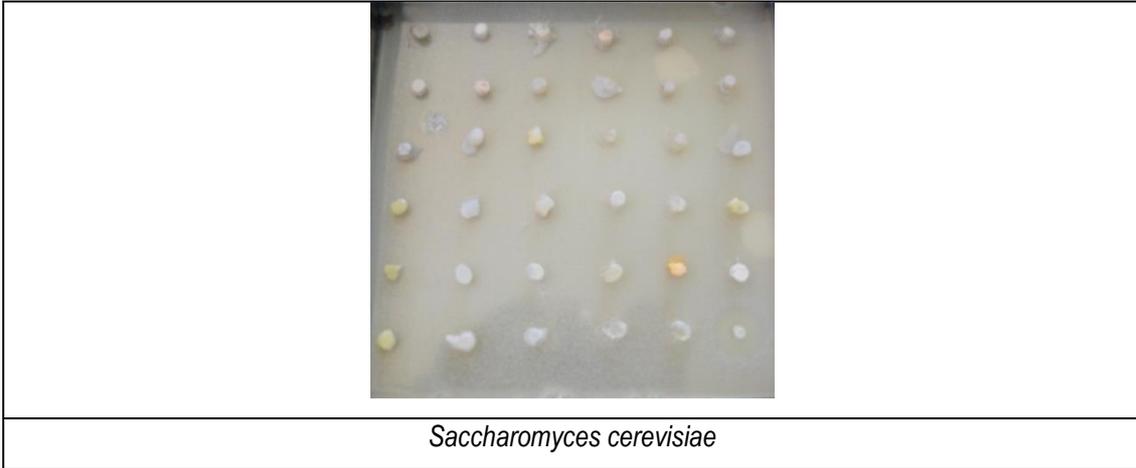


Producción de quitinasas a partir de bacterias

Pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos y bacterias patógenas

Pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos

	
<p><i>Alternaria</i></p>	<p><i>Aspergillus</i></p>
	
<p><i>Botrytis</i></p>	<p><i>Fusarium</i></p>
	
<p><i>Penicillium</i></p>	<p><i>Phoma</i></p>



Pruebas de antagonismo frente a bacterias patógenas

