



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



**“caracterización fenotípica de actinomicetes aislados de suelos
contaminados con hidrocarburos”.**

Trabajo de titulación, Modalidad: Proyecto de Investigación, presentado como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autora: Jessica Paola Chamorro Medina

Tutor: Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza

Ambato - Ecuador

Julio- 2018

APROBACION DEL TUTOR

Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza Ph. D.

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, 06 de junio del 2018



Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza Ph. D.

Ci: 1802166502

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Chamorro Medina Jessica Paola, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, autentico y personales; a excepción de las citas.



Jessica Paola Chamorro Medina

Ci: 180480024-9

AUTORA

APROBACION DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria Ph. D.

Ci:180214246-1



Mg. Ing. Manolo Alexander Córdova Suárez

Ci: 180284250-8

Ambato, 04 de Julio del 2018

DEDICATORIA

A Dios, por obsequiarme la vida y colocar a muchas personas buenas en mi camino.

A mis Padres, Gloria y Humberto, por siempre creer en mí, y ser el pilar fundamental en mi vida.

A mi Esposo, Alejandro, por siempre regalarme su amor incondicional, su apoyo, su fortaleza y sobre todo por regalarme la familia que somos. Te Amo.

A mis hijas Analía y Luciana por siempre colocar una sonrisa en mis labios aun en los momentos difíciles, son la luz que ilumina mi vida, son mi más grande bendición. Les Amo hijas.

A mi gran amiga Judicita, por el apoyo y la confianza depositada en mí.

Jessy

AGRADECIMIENTOS

Dejo constancia de mis agradecimientos a:

La Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por haberme formado como profesional.

Al Dr. Carlos Rodríguez, por haberme permitido llevar a cabo este trabajo.

A mis padres Gloria y Humberto, por siempre motivarme e impulsarme a terminar este trabajo, gracias por todo lo que me han enseñado y por la fortaleza que me han dado a lo largo de mi vida, Uds. siempre han confiado en mí, y por Uds. hoy soy la persona que soy.

A mi esposo Alejandro, por todo tu amor, por el apoyo, confianza y todos los sacrificios realizados para que hoy sea lo que soy, gracias sobre todo por la hermosa familia que hemos construido y todas las experiencias vividas que nos han permitido crecer, madurar y amarnos.

Índice

PORTADA.....	I
APROBACION DEL TUTOR.....	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	III
APROBACION DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	IV
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCION	14
CAPITULO I	
EL PROBLEMA.....	16
1.1.- TEMA DE INVESTIGACIÓN.....	16
1.2. - JUSTIFICACIÓN	16
1.3. - OBJETIVOS.....	17
CAPITULO II	
MARCO TEORICO.....	18
2.1. - Antecedentes.....	18
2.1.1. Contaminación con hidrocarburos en el Ecuador.....	18
2.1.2. Petróleo, generalidades y derivados	19
2.1.5. Microbiota del suelo.....	20
2.1.6. Actinomicetes.....	20
2.1.7. Actinomicetes con capacidad degradadora de hidrocarburos.....	22
2.1.8. Fenética (Taxonomía numérica)	22
2.1.9. Marco legal	23
CAPITULO III	
MATERIALES Y METODOS.....	25

3.1. -METODOLOGIA	25
3.1.1. Activación, purificación y almacenamiento de los actinomicetes	25
3.1.2. Recolección de datos fenotípicos para taxonomía numérica	27
3.1.2.1 Caracterización macroscópica de los aislamientos.....	27
3.1.2.2. Caracterización microscópica.....	28
3.1.2.3. Determinación del intervalo de crecimiento en función de la Temperatura.....	29
3.1.2.4. Determinación del intervalo de crecimiento en función del pH.....	29
3.1.2.5. Determinación del intervalo de crecimiento en función de la Salinidad	30
3.1.2.6. Determinación del uso de hidrocarburos como fuente única de carbono.....	30
3.2. - Plan de procesamiento y análisis de la información.....	30
3.2.1. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	30

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
4.1.- Análisis de resultados.....	31
4.1.1. Caracterización macroscópica	31
4.1.1.1. Color del micelio:.....	31
4.1.1.2. Forma de la Colonia	34
4.1.1.3. Elevación de la colonia.....	34
4.1.1.4. Esporulación	35
4.1.1.5. Pigmento Difusible	35
4.1.2. Determinación del intervalo de temperatura.....	36
4.1.3. Determinación del intervalo de pH.....	37
4.1.4. Determinación del intervalo de salinidad.....	37
4.1.5. Determinación de la capacidad para usar hidrocarburos como única fuente de carbono.....	38
4.2.- Determinación de grupos-especie (Dendograma).....	39
4.3. Discusión de los resultados.....	41
4.3.1. Caracterización macroscópica y microscópica.....	41
4.3.2. Pruebas taxonómicas y fenotípicas.....	41
4.3.2.1. Influencia de la temperatura.....	41
4.3.2.2. Influencia del pH	41

4.3.2.3. Influencia de la concentración de NaCl.....	42
4.3.2.4. Influencia de los hidrocarburos como única fuente de carbono	42
4.4. Discusión General del trabajo.....	43
4.5.- Verificación de la hipótesis.....	44

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	45
5.1.- Conclusiones.....	45
5.2. Recomendaciones.....	45

8. BIBLIOGRAFÍA.....	46
-----------------------------	-----------

ANEXOS.....	54
A. Herramientas experimentales	55
B. Medios de Cultivo y Soluciones	62
C. Fotografías	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburrifera, incluidas las estaciones de servicios..	23
Tabla 2. Descripción de las características de los suelos de aislamiento de la colección de actinomicetes. Campo Sacha provincial de Orellana.	25
Tabla 3. Descripción de los tipos de morfología de las cadenas de esporas	28
Tabla 4. Determinación del tipo de microorganismos en función de la temperatura de crecimiento.....	29
Tabla 5. Grupos de color en función de la combinación de micelio aéreo y micelio sustrato.	31
Tabla 6. Determinación del grupo –especie.	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción morfológica de colonias bacterianas.	28
Figura 2: Distribución de cepas en placa petri.	29
Figura 3. Caracterización macroscópica de micelio aéreo.....	33
Figura 4. Caracterización macroscópica de micelio sustrato.	34

Figura 5. Representación porcentual de la agrupación de actinomicetes de acuerdo a la forma de la colonia.....	34
Figura 6. Representación porcentual de la agrupación de actinomicetes de acuerdo a la elevación de la colonia.....	35
Figura 7. Representación porcentual del tipo de cadena de espora.....	35
Figura 8. Frecuencia de color de pigmento difusible según código CM.....	36
Figura 9. Evaluación del número de cepas tolerantes a diferentes temperaturas de incubación.	36
Figura 10. Evaluación del número de cepas tolerantes a diferentes pH.....	37
Figura 11. Evaluación del número de cepas tolerantes a diferentes concentraciones de NaCl.....	38
Figura 12. Evaluación del número de cepas tolerantes a hidrocarburos como única fuente de carbono en el medio.....	38
Figura 13: Dendograma.....	40

Anexos

A. Herramientas experimentales

A1. Resumen de datos fenotípicos.....	55
A2. Matriz de colores RAL.....	56
A3. Resumen de la caracterización macroscópica de las colonias.	60
A4. Agrupación de colores RAL en grupos CM para caracterización macroscópica de cepas.	61
A5. Datos físico-químicos Petróleo de las unidades de bombeo de Testing Bloque 56 de Petroamazonas, recolectado en la empresa SERTECPET, Provincia de Sucumbíos, Cantón Lago Agrio.	61

B. Medios de cultivo y soluciones

B1. Medio GYM.....	62
B2. Medio SCA.....	62
B3. Medio Bushnell-Haas.....	62
B4. Receta Buffers.....	62

C. Fotografías

C1. Activación de cepas en estría simple.....	63
---	----

C2. Purificación de cepas en estría compuesta.....	63
C3. Morfología de la cadena de esporas.....	63
C4. Pigmento difusible.....	64
C5. Crecimiento de las cepas en diferentes temperaturas.....	64
C6. Crecimiento de las cepas a diferentes pH.....	64
C7. Crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de NaCl.....	65
C8. Crecimiento de las cepas con diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono.....	65

RESUMEN

Noventa y tres cepas de actinomicetes, aisladas de suelos contaminados con derivados de petróleo, del campo Sacha fueron utilizados para la determinación de diversidad fenotípica y metabólica. Dieciocho grupos-especie fueron identificados, al presentar una similaridad mayor al 90%, luego de realizar taxonomía numérica de datos fenotípicos. Así mismo, todos los cultivos fueron crecidos en medio Bushnell-Hass, enriquecido con gasolina, diésel y petróleo, como única fuente de carbono y energía. Se determinó que el 89% de los microorganismos pueden utilizar diferentes hidrocarburos en su metabolismo y que solamente los representantes de dos grupos-especie no poseen esta capacidad. El 92.2% de los actinomicetes puede usar gasolina como sustrato, el 83,9% diésel y el 60% petróleo. Los resultados demuestran que éste grupo de actinomicetes presenta una gran diversidad fenotípica y metabólica. Estas, características podrían ser estudiadas para determinar el potencial uso en procesos de biorremediación *in-situ*.

Palabras claves: Caracterización fenotípica, Actinomicetes, contaminación de suelos, contaminación por hidrocarburos, Fenética,

ABSTRACT

Ninety-three strains of actinomycetes, isolated from soils contaminated with petroleum derivatives, from the Sacha field were used for the determination of phenotypic and metabolic diversity. Eighteen groups-species were identified, presenting a similarity greater than 90%, after performing numerical taxonomy of phenotypic data. Likewise, all crops were grown in Bushnell-Hass, enriched with gasoline, diesel and oil, as the only source of carbon and energy. It was determined that 89% of microorganisms can use different hydrocarbons in their metabolism and that only the representatives of two groups-species do not have this capacity. 92.2% of actinomycetes can use gasoline as a substrate, 83.9% diesel and 60% oil. The results show that this group of actinomycetes presents a great phenotypic and metabolic diversity. These characteristics could be studied to determine the potential use in in-situ bioremediation processes.

Key words: Phenotypic characterization, Actynomicetes, Soil contamination, Oil pollution, Phenetic.

INTRODUCCION

El manejo inadecuado de los procesos de extracción, refinamiento y transporte de hidrocarburos derivados del petróleo y sus residuos, han generado a escala mundial un problema de contaminación en suelos, agua y aire (Benavides et. al., 2006). Una de las consecuencias más importantes ha sido la alteración de la composición físico-química de los procesos biológicos que influyen directamente con el equilibrio del ecosistema (Velasco y Volke, 2003).

Según el Instituto Americano de Petróleo (API), la contaminación con hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) proviene de diferentes fuentes, las que influyen directamente en la zona y la forma de intoxicar al suelo. Los lodos de perforación de tipo inversa y recortes, contienen aceites muy similares al diésel en concentraciones $\pm 10\%$ que afectan principalmente a suelos arcillosos, las tuberías corroídas, contaminan suelos de las zonas bajas que poseen altos contenidos de materia orgánica y gran permeabilidad empleados en la agricultura, los tiraderos de desechos aceitosos semisólidos intoxican pozos cerrados o que nunca produjeron petróleo así como también a los ambientes cercanos por medio de infiltraciones y escurrimientos (API, 1981; Benavides et. al., 2006).

Ponce (2014), indica que la contaminación del suelo con hidrocarburos, aunque se origina en la industria de extracción del petróleo, no siempre proviene de la misma fuente. Las áreas urbanas y rurales, se contaminan con hidrocarburos por la industria textil, estaciones de servicio, centrales termoeléctricas, minería, industria pecuaria, lavadoras de vehículos y mecánicas automotrices.

Actualmente, los avances tecnológicos en el campo de la remediación de suelos y aguas contaminadas con TPHs, incluyen procesos *in situ* que combinan tanto métodos físicos como biológicos. Estos contribuyen a la oxidación, degradación, transformación y completa mineralización de las sustancias contaminantes. La eficacia del proceso depende principalmente de la capacidad de los organismos para degradar los contaminantes en dióxido de carbono, agua y biomasa (Penberthy y Weston, 2000).

En las investigaciones realizadas en Long Beach durante el año 1981, ha permitido conocer que *Bacillus fusiformis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii* y *Pseudomonas sp.*, poseen la capacidad de degradar diésel *in situ* (Penberthy y Weston. 2000).

El actinomicete del género *Rhodococcus* y algunas cepas de *Gordonia* y *Nocardia*, poseen gran versatilidad metabólica asociada al uso de TPHs como fuentes de carbono y energía. Presentan enzimas con actividad de oxigenasas y peroxidasas, y otras enzimas como la fenilalanina-deshidrogenasa y endoglucosidasa, asociadas al uso del dibenzotiofeno (DBT) como nutriente, y así desulfurar suelos contaminados con petróleo y diésel. Otras especies de *Rhodococcus* presentan una mutación que les otorga la capacidad de degradar compuestos alifáticos con enlaces dobles principalmente en el noveno carbono del grupo metilo terminal (Rivera et. al., 2002; Benavides et. al., 2006; López de Mesa, 2006).

La taxonomía polifásica combina el análisis de datos fenotípicos y moleculares, proporcionando amplios conocimientos acerca de la distribución y abundancia de la diversidad microbiana del suelo convirtiéndose en una herramienta básica en la búsqueda de microorganismos con utilidad en biotecnología ya que no solamente permite determinar la diversidad biológica, sino también identificar características metabólicas que puedan ser usadas, por ejemplo, en procesos de biorremediación *in situ* (Whyte et al., 1998).

CAPITULO I EL PROBLEMA

1.1.- TEMA DE INVESTIGACIÓN

Caracterización Fenotípica de Actinomicetes Aislados de Suelos Contaminados con Hidrocarburos

1.2 - JUSTIFICACIÓN

Ecuador, es uno de los países que ha explotado por más de 30 años las reservas petroleras de su subsuelo. Debido a los procesos asociados a la extracción, almacenamiento y transporte del crudo, existen lugares que han sido contaminados con petróleo y sus derivados (Quadri, 1994; Saval, 1995; López de Mesa et al., 2006).

Procesos de biorremediación han sido implementados tanto en condiciones *ex situ* como *in situ* para disminuir la contaminación y/o recuperar los espacios usados por las compañías petroleras. Sin embargo, los impactos en el ecosistema, producto de la explotación, siguen siendo evidentes. Por ello, se requiere el desarrollo de técnicas modernas que combinen métodos tradicionales con herramientas biotecnológicas, en donde el uso de microorganismos se convierte en un pilar fundamental en la implementación de procesos de biorremediación (Brito, et al., 2018; Morgan y Watkinson, 1989; Martínez y López, 2001).

Tradicionalmente, los principales microorganismos que han sido usados en biorremediación pertenecen al grupo de las bacterias, en donde varias especies del género *Pseudomonas* presentan una gran capacidad metabólica para desintoxicar sitios contaminados con TPHs. Individuos de la clase *Actinobacteria* han demostrado que pueden descomponer derivados de hidrocarburos. Dentro del Orden *Actinomycetales*, miembros de los géneros *Rhodococcus* y *Gordonia* han sido estudiados por su potencial para disminuir contaminación asociada a TPHs (López de Mesa et al., 2006; Martínez et al., 2011).

Sin embargo, poco se conoce acerca del potencial de otros actinomicetes, como por ejemplo especies de *Streptomyces*, y su posible rol en procesos de transformación de los hidrocarburos. La

importancia de los actinomicetes en procesos de remediación está vinculada a su gran biodiversidad filogenética y metabólica, asociándolos a procesos de descomposición de materia orgánica, transformación de materiales recalcitrantes, degradación de productos químicos, y en el control biológico de plagas y enfermedades (Rodríguez y Julia, s/f.; Strackebrandt et al., 1997; Soler et al., 2012).

Esta investigación pretende identificar potenciales individuos o grupos de individuos pertenecientes al Orden *Actinomycetales* en procesos de remediación de sitios contaminados con petróleo o sus derivados, empleando como herramienta de trabajo la Fenética, debido a que facilita la agrupación de cepas por homologías, permitiendo el ordenamiento natural debido a las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y metabólicas que comparten entre ellas.

La importancia de esta investigación radica en la ampliación del conocimiento de los actinomicetes en el ecosistema generando líneas de investigación en el campo de la biotecnología. La utilización de estos microorganismos en procesos de descontaminación garantiza el uso de una tecnología sustentable, económica y de fácil acceso en nuestro país, sustentada en la versatilidad de los actinomicetes para adaptarse a diferentes condiciones ambientales y limitación de nutrientes. La Constitución del Ecuador aprobada en el 2008, presenta a la naturaleza como sujeto de derecho y El Plan del Buen Vivir en su cuarto objetivo lo ratifica.

1.3. - OBJETIVOS

1.3.1. General

- Caracterizar fenotípicamente actinomicetes aislados de suelos contaminados con hidrocarburos

1.3.2. Específicos

- Caracterizar macroscópicamente y microscópicamente los diferentes cultivos aislados.
- Determinar la capacidad del grupo de actinomicetes de utilizar derivados de hidrocarburos como única fuente de carbono.
- Determinar la similitud entre las poblaciones de actinomicetes mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. - Antecedentes

2.1.1. Contaminación con hidrocarburos en el Ecuador

Ecuador ha sido en los últimos años el protagonista de una lucha contra Chevron, compañía transnacional que compró en el año 2001 todas las acciones de la empresa Texaco, que mantuvo sus operaciones petroleras en la provincia de Sucumbíos desde 1964 hasta 1991. Los daños causados al medio ambiente como resultado del proceso de extracción, refinamiento y transporte ambientalmente irresponsable del crudo y sus derivados por parte de Texaco, involucraron al Ecuador en un litigio legal como resultado de la campaña “La mano sucia de Chevron” implementada en el gobierno de Rafael Correa (Aranda, 2013; Ramonet, 2015; Cancillería del Ecuador, 2017)

Chevron es responsable de 103 millones de litros de crudo derramado (650 mil barriles), 63000 millones de litros de agua tóxica arrojada a ríos y la contaminación de dos millones de hectáreas donde vivían y trabajaban pueblos indígenas y campesinos (Aranda, 2013).

La Corte Provincial de Sucumbíos en 2012 condenó a Chevron a pagar una indemnización de 9500 millones de dólares por haber causado uno de los desastres medioambientales más graves en el mundo. Decenas de vertederos de alquitrán no sellados, han contaminado el suelo y el agua de la zona, misma que ya no es apta para consumo, además de haber aniquilado a gran parte de la biodiversidad de la región (Aguilar, 2016; Ramonet, 2015).

En la actualidad, es un tema de preocupación la explotación de petróleo en el bloque 43, ubicado en el Parque Nacional Yasuní, también conocido como bloque ITT, puesto que integra los campos Ishpingo, Tambacocha y Tiputini del cantón Aguarico, provincia de Orellana. Este es uno de los sitios más biodiversos del planeta, que tras el fracaso de la iniciativa Yasuní ITT, ahora se encuentra en riesgo, gracias a la aprobación de su explotación petrolera por parte de la Asamblea Nacional en 2013 bajo el Gobierno de Rafael Correa, el que señala que se están usando 70 medidas de

protección ambiental, que las ONG no respaldan por no brindar garantías (El Comercio, 2012; Aranda, 2013; La República, 2013; Ramonet, 2015; Aguilar, 2016).

2.1.2. Petróleo, generalidades y derivados

La palabra petróleo proviene de dos palabras latinas, *petra* (roca) y *óleum* (aceite) definiéndolo como roca oleosa o aceite de piedra. Químicamente el petróleo es una mezcla compleja de miles de compuestos principalmente hidrogeno y carbono, además de heterocompuestos de nitrógeno, oxígeno, azufre y metales como el vanadio y níquel (Martínez, 2006). El 84 a 87% es carbono (C), el 11 al 14% es hidrógeno (H), del 0 al 8% es azufre (S), y del 0 al 4% es oxígeno (O) y nitrógeno (N), además de metales como el níquel y el vanadio (Clark y Brown, 1977; Howe- Grant, 1996; Fernández y Alaniz, 1993; Bárcenas y Yáñez, 2012).

La teoría más aceptada sobre su origen, implica la agrupación de residuos vegetales y animales transformados en hidrocarburos debido a condiciones de temperatura y presión. La calidad del petróleo se define de acuerdo a parámetros API (American Petroleum Institute), los petróleos extra pesados poseen un grado API de 10 y los súper ligeros mayores a 39 (Cubaeduca, 2016, Gómez, 2003).

Gracias a procesos físico-químicos como la destilación fraccionada, se obtienen diferentes subproductos o fracciones de petróleo, entre las que tenemos gasolina (nafta ligera y pesada), querosina (turbosina), diésel (gasóleo ligero) y gasóleo pesado o FCC (Fluid Catalytic Cracking) (Gómez, 2003; López y Lozada, 2011).

2.1.1. Gasolina

Es una mezcla de subproductos resultado de diferentes procesos de refinamiento, cuyo número de átomos de carbono varía entre C_4 y C_{11} . Su principal componente es la nafta reformada. La capacidad de auto ignición de la gasolina a determinadas condiciones de presión y temperatura, está provista por el número de octanos. El proceso de Reforming o Platforming incrementan el número de octanos desde valores inferiores a 50 hasta 97 y 100 RON (Research Octane Number). La transformación de hidrocarburos parafínicos y nafténicos en aromáticos de mayor numero de

octanos esta aparejado al incremento de la densidad del producto (García, 2016; Martínez, 2006; Pedro, 2007).

2.1.2. Diésel (Gasóleo)

Existen dos tipos de gasóleo, el utilizado por motores de combustión interna y el gasoil de calefacción utilizado en hornos, calderas y grupos electrógenos. Está compuesto principalmente por hidrocarburos saturados parafínicos y aromáticos. La diferencia está enmarcada en el contenido de azufre; para automotores varía entre 10-50ppm mientras que para calefacción se admiten valores mayores. Su principal cualidad es el número de cetano, que mide la tendencia a autoinflamarse o también conocido como la resistencia a producir golpeteo (Martínez, 2006; López y Estrada, 2008; Gonzales, 2010; Melero, 2012).

2.1.5. Microbiota del suelo

El suelo tiene una gran variedad de microorganismos por cada gramo de suelo formado por una mezcla de miles y millones de bacterias, actinomicetes, hongos, protozoos y algas, que cumplen un rol esencial en los procesos biogeoquímicos de la materia. Los hongos (basidiomicetos), bacterias y actinomicetes son productores de metabolitos biológicamente activos, sin embargo, los actinomicetes han sido apenas investigados (Rodríguez y Julia, s/f).

2.1.6. Actinomicetes

Etimológicamente, actinomicete significa, hongo en forma de rayo de sol. Estos forman un grupo de microorganismos morfológicamente muy heterogéneo, perteneciente al dominio *Bacteria*. Son gram-positivos y poseen un alto contenido de G+C. Dos de sus propiedades más significativas son la capacidad para desarrollarse sobre sustratos muy diversos y su aptitud para sintetizar numerosos metabolitos pertenecientes al sector petroquímico. Gracias al peptidoglucano que posee su pared celular son sensibles a la penicilina (Soler, 2012; Quinayas et. al., 2014).

En 1997 se propuso la clase *Actinobacteria* compuesta por actinomicetes formadores de micelio y esporas y sus parientes filogenéticos, en función del contenido G+C. La segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2005)*, recoge la clasificación actual, en la que la clase *Actinobacteria* se eleva al rango de *Phylum*. Dentro del *phylum* se reconoce una única clase,

Actinobacteria, que mantiene la siguiente estructura jerárquica en el que están incluidos 6 órdenes, 39 familias y más de 130 géneros (Stackebrandt et al., 1997; Garrity y Holt, 2001).

Los géneros dentro del orden *Actinomycetales* son muy diversos e incluyen algunos patógenos para animales y el hombre. Los más importantes de estos son los llamados corineformes y nocardioformes que incluyen los siguientes géneros: *Corynebacterium* (*C. diphtheriae*), *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*), *Nocardia* (*N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum*, *N. brasiliensis*), *Rhodococcus* (*R. equi*), *Gordonia*, *Tsukamurella* y *Actinomadura* (*A. madurae*). El género más representativo del orden es *Streptomyces*, el que contiene más de 500 especies descritas, lo que lo convierte en el género con mayor diversidad conocida en el Dominio *Bacteria* (Goodfellow y Williams, 1983; Boone et al., 2001).

Streptomyces, es el principal responsable en la maduración del compost mediante la humificación de los materiales orgánicos en descomposición y uno de los principales productores de compuestos bioactivos. Otros géneros importantes en el orden *Actinomycetales* son *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Streptosporangium* y *Thermomonospora* (Gonzales, 2010).

A los actinomicetes se les atribuyen algunas funciones en el ecosistema, entre las que se menciona la capacidad para descomponer material animal y vegetal con liberación de ácidos orgánicos de los esqueletos carbonados y amoniaco de las sustancias nitrogenadas (Zaitlin et al., 2004), además de participar en los procesos de humificación y en particular en la génesis de sustancias melánicas, (Fritz et al., 2003), producir sustancias antibióticas, con el fin de producir equilibrios genéricos y antagónicos específicos ante la microflora bacteriana (Ibáñez, 2007), y aumentar la tolerancia o resistencia a patógenos radiculares y al estrés abiótico, como sequedad y toxicidad por metales (Takefumi et al., 2005). Factores como el contenido de humedad relativa, pH, naturaleza y abundancia de materia orgánica proveniente de mesofauna y vegetación circundante, controlan la densidad y diversidad de los actinomicetes en el ecosistema (Jayasinghe y Parkinson, 2008).

2.1.7. Actinomicetes con capacidad degradadora de hidrocarburos.

Parés y Juárez (1997), reportan que la asimilación de hidrocarburos derivados del petróleo puede ser llevada a cabo por un gran grupo de bacterias, entre las que se encuentran miembros de la clase *Actinobacteria*, especialmente de los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia*.

Rivera et al. (2002), encontró consorcios de microorganismos degradadores de hidrocarburos, entre los de mayor interés tenemos a los que se forman por representantes del género *Rhodococcus*. Las características bioquímicas encontradas en algunas de estas cepas son la producción de poli-3-hidroxicanoatos, además del acaparamiento de metales pesados y enzimas como la fenilalanina-deshidrogenasa y endoglucosidasas (Alexander y Wiley, 1987).

Rhododoccus posee una gran variedad de vías metabólicas que le otorgan la capacidad de sobrevivir y desarrollarse en medios con insuficientes nutrientes, la carencia de un sistema de represión catabólica y su persistencia ambiental, hacen de estos organismos excelentes candidatos para tratamientos de biorremediación (López de Mesa et. al., 2006).

2.1.8. Fenética (Taxonomía numérica)

La Fenética, es la aplicación de una metodología para agrupar un grupo determinado de individuos. En los estudios de diversidad poblacional de microorganismos, es de suma importancia. Se cimienta en la búsqueda de un gran número de características comunes y también no comunes entre los organismos de un centro de estudio, donde a mayor número de características comunes mayor acercamiento de especies (Michener y Sokal, 2014; Toro, 2004).

Los distintos microorganismos y las características que se van a comparar se entrelazan en una matriz transversal anidada en código binario. Las comparaciones fenotípicas detallan particularidades de cada microorganismo analizado de acuerdo a sus propiedades bioquímicas y morfológicas, se puede robustecer aún más la matriz incluyendo además las características genotípicas, comparando fragmentos provenientes de técnicas de fingerprinting del ADN cromosomal (Toro, 2004).

Un programa estadístico apropiado permite calcular los índices de similitud entre las características determinadas para cada uno de los organismos estudiados, favoreciendo a la construcción de un fenograma. La similitud entre los distintos organismos que se traza en el fenograma, muestra la información en forma de *clúster* o *grupos* y valorar la biodiversidad de uno o varios ecosistemas (Sokal y Sneath, 1963). Para visualizar fácilmente las similitudes entre microorganismos se realiza una representación gráfica llamada dendograma. Esto involucra un análisis multifactorial de la matriz simétrica formada con código binario y procesado en un programa estadístico (UNLP, (s/f); Toro, 2004).

2.1.9. Marco legal

Esta investigación está sustentada en la Constitución del Ecuador aprobada en el 2008, presentando a la naturaleza como sujeto de derecho. El *Plan del Buen Vivir* en su cuarto objetivo y la Ley de gestión ambiental del Ecuador (LEY No. 37. RO/245 del 30 de Julio de 1999) promulgada en la constitución de 1998, de acuerdo al Libro VI: Calidad Ambiental Anexo 2: Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados. A continuación, se muestra la Tabla 1 promulgada en la ROAH. Decreto Ejecutivo N° 1215. Registro oficial 265 en el cual se establecen los límites de aceptación respecto al contenido de hidrocarburos y metales pesados de acuerdo al tipo de suelo.

Tabla 1: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios.

Parámetro	Simbología	Unidad	Uso agrícola	Uso industrial	Ecosistemas sensibles
Hidrocarburos totales de petróleo	TPH	mg/kg	<2.500	<4.000	<1.000
Hidrocarburos aromáticos poli-cíclicos	HAPs	mg/kg	<2	<5	<1
Cadmio	Cd	mg/kg	<2	<10	<1
Níquel	Ni	mg/kg	<50	<100	<40
Plomo	Pb	mg/kg	<100	<500	<80

Fuente: Tabla 6 - ROAH, Decreto Ejecutivo N° 1215, Registro Oficial 265 de 13-02-2001 citado en: Rodríguez, L. 2008. Evaluación de dos sustratos en la técnica de Land Farming para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.

2.2.- HIPOTESIS

2.2.1. Hipótesis de Investigación

La diversidad de actinomicetes se manifiesta por la presencia de más de cinco grupos-especie definidos por taxonomía numérica de datos fenotípicos

2.2.2. Hipótesis nula

Existen menos de cinco grupos-especie de actinomicetes definidos por taxonomía de datos fenotípicos.

2.3.- SEÑALAMIENTO DE VARIABLES

VI: Los datos fenotípicos de la colección son amplios.

- Determinación de la temperatura de crecimiento de la colección.
- Determinación del pH de crecimiento de la colección.
- Determinación de la concentración de sal apta para el crecimiento de la colección.
- Determinación de la utilización de hidrocarburos derivados de petróleo como única fuente de carbono.

VD: La colección de actinomicetes es diversa.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. - METODOLOGIA

3.1.1. Activación, purificación y almacenamiento de los actinomicetes.

Noventa y tres cepas de actinomicetes aislados de dos tipos de suelos contaminados con hidrocarburos como se describe en la Tabla 2, fueron recibidos como una suspensión de esporas y micelio en glicerol al 20% (v/v). Veinte microlitros de cada suspensión fueron tomados e inoculados en cajas petri con agar glucosa extracto de malta y extracto de levadura (GYM) según receta Anexo B1 y agar almidón caseína (SCA) Anexo B2. Se usó la técnica de estría simple para la siembra y los cultivos fueron incubados a 28°C por 7 días.

Luego del período de incubación, fueron repicados en estría compuesta y una vez confirmada su pureza, almacenados en tubos de centrifugación de 1,5 mililitros, los que contenían glicerol al 20% (w/v). Todas las nuevas suspensiones de esporas y micelio fueron almacenadas a -10°C en un congelador, para lograr su preservación a largo plazo. Al mismo tiempo, se preparó un stock adicional en 1000 uL de agua de llave estéril, los que fueron almacenados a 4°C, para su uso posterior en las diferentes pruebas de este estudio.

Tabla 2. Descripción de las características de los suelos de aislamiento de la colección de actinomicetes. Campo Sacha provincial de Orellana.

CODIGO	MEDIO	PH DEL SUELO	TIPO DE SUELO	TPH'S
BG 002	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 004	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 007	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 008	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 009	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 010	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 011	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 014	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 015	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 016	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 019	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 020	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 032	GYM	6,4	ARENOSA	46000

Tabla 2:		Continuación...		
BG 034	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 035	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 036	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 037	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 038	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 042	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 043	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 051	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 057	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 058	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 060	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 061	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 064	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 065	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 066	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 071	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 072	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 075	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 080	GYM	6,4	ARENOSA	46000
BG 082	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 083	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 085	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 086	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 087	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 088	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 089	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 090	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 092	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 094	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 095	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 097	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 101	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 104	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 105	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 107	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 109	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 110	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 111	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 112	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 114	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 115	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 118	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 120	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000

Tabla 2: Continuación...

BG 123	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 124	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 125	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 126	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 127	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 128	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 132	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 133	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 136	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 137	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 140	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 142	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 143	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 145	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 146	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 149	SCA-AI	6,4	ARENOSA	46000
BG 150	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 151	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 152	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 153	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 154	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 155	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 158	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 159	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 160	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 161	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 163	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 165	SCA-AS	6,4	ARENOSA	46000
BG 169	GYM	5	ARCILLOSA	31000
BG 171	GYM	5	ARCILLOSA	31000
BG 174	GYM	5	ARCILLOSA	31000
BG 177	GYM	5	ARCILLOSA	31000
BG 180	GYM	5	ARCILLOSA	31000
BG 182	GYM	5	ARCILLOSA	31000
BG 187	SCA	5	ARCILLOSA	31000
BG 189	SCA	5	ARCILLOSA	31000

Fuente: (Gavilánez y Rodríguez, 2013)

3.1.2. Recolección de datos fenotípicos para taxonomía numérica

3.1.2.1 Caracterización macroscópica de los aislamientos

La pigmentación del micelio del sustrato, micelio aéreo y pigmento difusible de cada uno de los cultivos puros, fue clasificado de acuerdo al Anexo A2. Tonalidades de color similares se agruparon

en un solo código como se muestra en el Anexo A3. Se evaluó la forma, elevación y margen de cada una de las cepas de acuerdo a los parámetros establecidos en la Figura 1.

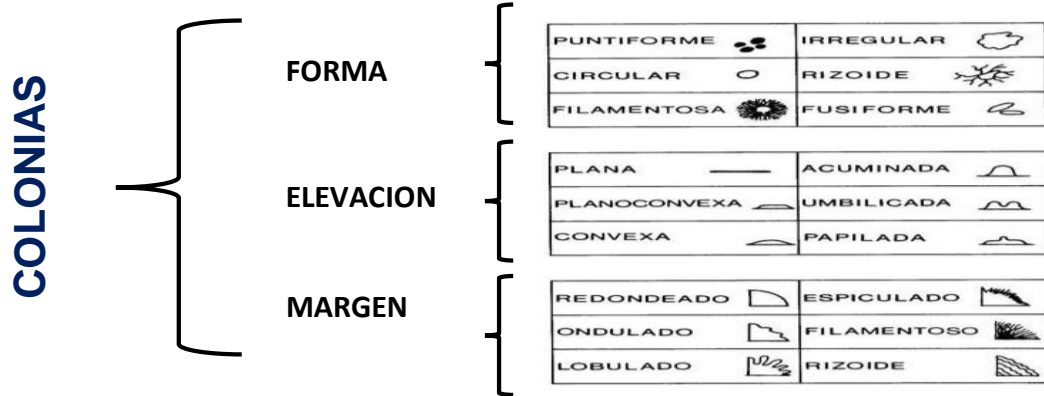


Figura 1. Descripción morfológica de colonias bacterianas

3.1.2.2. Caracterización microscópica.

Se insertó un cubreobjetos en el agar GYM de tal forma que se formó un ángulo de 45°, se matizó el estriado simple de las cepas y se incubó a 37°C por 7 días. Se procedió a retirar con cuidado el cubreobjetos a colocarlo sobre una placa portaobjetos, fue necesario fijar las dos placas con esmalte transparente con el fin de evitar el movimiento del cubreobjetos bajo el microscopio. Se observó cada una de las cepas bajo el microscopio con el lente de 40X y se clasificaron de acuerdo a la Tabla 3.

Tabla 3. Descripción de los tipos de morfología de las cadenas de esporas

SIMBOLO	TIPO	DESCRIPCION
S	Espiral	Cadena de esporas formando espirales abiertas o cerradas
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
S	Flexous	Cadenas de esporas en forma sinuosa, no espiral.

Fuente: Philips, 1994.

3.1.2.3. Determinación del intervalo de crecimiento en función de la Temperatura

Cinco uL de la suspensión de células fueron inoculadas en medio GYM de acuerdo a la Figura 2, e incubadas a 50°C, 37°C y 4°C, Los platos se evaluaron a los 7 días con código binario; la ausencia de crecimiento con 0 y a la presencia de crecimiento con 1 posteriormente se los clasificó de acuerdo a la Tabla 4.

Tabla 4. Determinación del tipo de microorganismos en función de la temperatura de crecimiento.

Tipo de microorganismos	Temperatura mínima	Temperatura óptima	Temperatura máxima
Psicrófilo	-5 +5	12 - 15	15 - 20
Psicrótrofo	-5 +5	25 - 30	30 - 35
Mesófilo	5 -15	30 - 45	35 - 47
Termófilo	40 -45	50 - 75	60 - 90

Fuente: Genmic, 2008

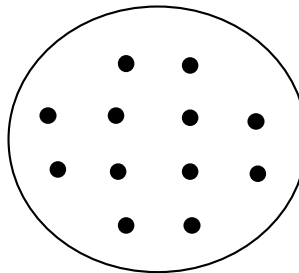


Figura 2: Distribución de cepas en placa petri

3.1.2.4. Determinación del intervalo de crecimiento en función del pH

Se tomaron 5uL del stock de células y fueron sembradas en medio GYM como se representa en la Figura 2. El medio previamente fue ajustado a diferentes pH con soluciones buffer de pH 4.5, 7.5, y 9.5 como se describe en el Anexo B4, lo que evitara que el pH varíe con el metabolismo de los actinos. Cada plato fue incubado a 37°C y evaluado a los 7 días empleando código binario, donde 1 corresponderá a si hay crecimiento y 0 a no hay crecimiento.

3.1.2.5. Determinación del intervalo de crecimiento en función de la Salinidad

Se preparó medio GYM enriquecido con NaCl al 2%, 5% y 10% (p/v), en cada plato se inoculó 5uL de cada suspensión de células de acuerdo a la Figura 2. Se incubó a 37°C durante 7 días, se evaluó cada plato de acuerdo a la presencia o ausencia de crecimiento con código binario con 1 ó 0 respectivamente.

3.1.2.6. Determinación del uso de hidrocarburos como fuente única de carbono.

Se inoculó 5uL de cada suspensión de células de la colección de acuerdo a la Figura 2 en platos con agar Bushnell-Haas enriquecido de acuerdo al Anexo B3 con diésel, gasolina y petróleo (Anexo A5). Se incubaron a 37°C durante 7 días. Se evaluó su crecimiento con código binario: 1 corresponde a, si hay crecimiento y 0 a no presenta crecimiento.

3.2. - Plan de procesamiento y análisis de la información

3.2.1. Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Con los datos obtenidos en todas las pruebas fenotípicas aplicadas a los actinomicetes aislados de suelos contaminados se construyó una base de datos en código binario. Esta información se procesó en el software estadístico NTSys, el mismo que calcula los porcentajes de similitud entre un organismo y otro, usando el coeficiente de similitud simple (S_{SM}). Los porcentajes obtenidos fueron empleados para construir un dendrograma, gracias al algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) del mismo programa. Con el gráfico listo, se identificó los grupos de microorganismos que comparten una similitud mayor al 90%, a estos se les consideró como miembros de un mismo grupo-especie.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.- Análisis de resultados

4.1.1. Caracterización macroscópica

4.1.1.1. Color del micelio:

Se determinó que la colección de actinos presenta una gran diversidad de color con 77 grupos de color, en la Tabla 5 se puede apreciar que el grupo 1, 3, 4 y 10 contienen hasta tres individuos de la colección mientras que el 84.4% de los grupos solo representan a un único individuo. La Figura 3 ilustra la variedad de color del micelio aéreo con 31 grupos de color, de los cuales los más grandes corresponden al CM007 marrón con 11 cepas; seguido está el grupo CM034 beige con 12 miembros. Respecto al micelio sustrato se obtuvo 24 grupos de color de los cuales CM002 naranjas es el más grande con 14 miembros, seguido del grupo CM004 naranjilla con 11 integrantes y por último el CM049 caqui con 10 miembros como se aprecia en la Figura 4.

Tabla 5. Grupos de color en función de la combinación de micelio aéreo y micelio sustrato

CODIGO CEPA	M. AEREO	M. SUSTRATO	#GRUPO
BG089	CM008	CM016	1
BG115	CM008	CM016	
BG160	CM008	CM016	
BG035	CM016	CM004	2
BG127	CM016	CM004	
BG011	CM034	CM034	3
BG037	CM034	CM034	
BG142 (1)	CM034	CM034	
BG120	CM009	CM007	4
BG133	CM009	CM007	
BG051	CM009	CM007	
BG010	CM002	CM002	5
BG036	CM002	CM002	
BG014	CM026	CM047	6
BG083	CM026	CM047	
BG150	CM015	CM017	7
BG110	CM015	CM017	
BG132	CM015	CM015	8
BG019	CM015	CM015	
BG118	CM017	CM015	
BG123	CM017	CM015	9
BG065(2)	CM036	CM002	

Tabla 5: Continuacion...

BG097	CM036	CM002	
BG146	CM036	CM036	11
BG159	CM036	CM036	
BG086	CM006	CM006	12
BG092	CM006	CM006	
BG002	CM016	CM008	13
BG004	CM008	CM002	14
BG007	CM034	CM031	15
BG008	CM034	CM049	16
BG009	CM009	CM002	17
BG015	CM016	CM017-CM007	18
BG016	CM034	CM006	19
BG020	CM002	CM018	20
BG032	CM017	CM002	21
BG034	CM015	CM017-CM007	22
BG038	CM004	CM004	23
BG042	CM008	CM050	24
BG043	CM049	CM049	25
BG057	CM016	CM002	26
BG060	CM020	CM016	27
BG061	CM006	CM008	28
BG064	CM008	CM015	29
BG065(1)	CM034	CM002	30
BG066	CM008	CM008	31
BG071	CM034	CM049	32
BG072	CM032	CM033	33
BG075	CM008	CM002	34
BG080	CM049	CM004	35
BG082	CM008	CM017	36
BG085	CM002-CM008	CM049	37
BG087	CM017	CM015	38
BG088	CM028	CM001	39
BG090	CM034	CM002	40
BG094	CM001	CM004	41
BG095	CM004	CM049	42
BG101	CM017	CM013	43
BG104	CM034	CM049	44
BG105	CM034	CM006	45
BG107	CM034-CM049	CM036	46
BG109	CM016	CM020	47
BG111	CM050	CM016	48
BG112	CM015	CM004	49
BG114	CM047	CM041	50
BG124	CM035-CM026	CM002	51
BG125	CM025	CM004	52
BG126	CM034	CM004	53
BG128	CM007	CM017	54

Tabla 5: Continuacion...

BG136	CM004	CM050	55
BG137	CM026	CM004	56
BG140	CM035	CM001	57
BG143	CM033	CM033	58
BG145	CM036-CM026	CM036	59
BG149	CM016	CM007	60
BG151	CM041	CM028	61
BG152	CM008	CM028	62
BG153	CM008	CM013	63
BG154	CM005	CM006	64
BG155	CM031	CM049	65
BG158	CM022	CM002	66
BG161	CM016	CM049	67
BG163	CM017	CM020	68
BG165	CM031	CM036	69
BG169	CM028	CM006	70
BG171	CM017	CM004	71
BG174	CM005	CM005	72
BG177	CM040	CM049	73
BG180	CM017	CM016	74
BG182	CM015	CM049	75
BG187	CM015	CM004	76
BG189	CM015	CM047-CM013	77

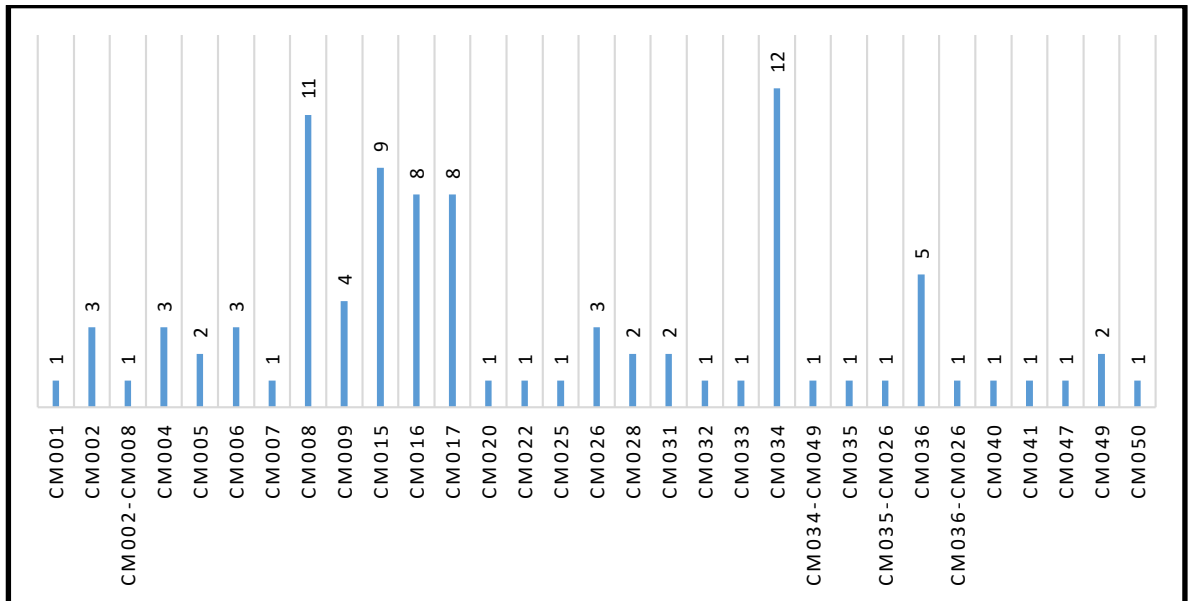


Figura 3. Caracterización macroscópica de micelio aéreo

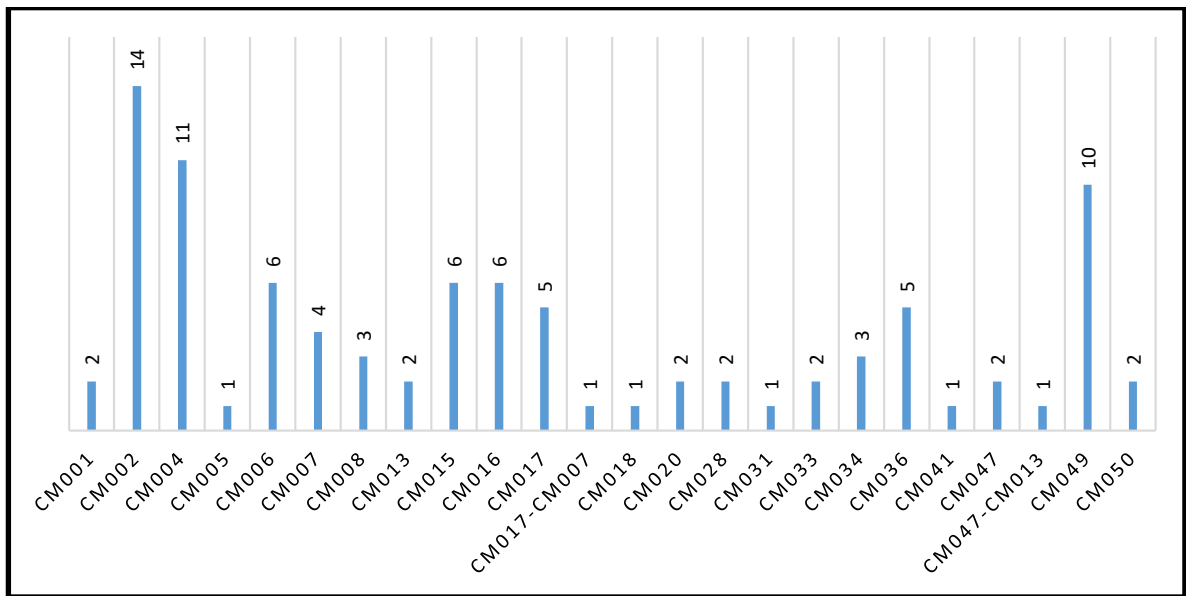


Figura 4. Caracterización macroscópica de micelio sustrato

4.1.1.2. Forma de la Colonia

Se determinó que el 48% de la población de actinomicetes presenta una colonia de forma irregular, seguida del 47% de forma circular, como se confirma en la Figura 5.

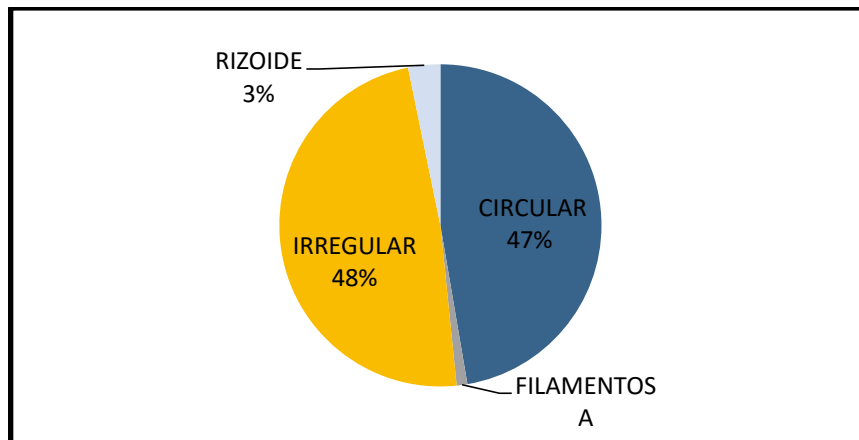


Figura 5. Representación porcentual de la agrupación de actinomicetes de acuerdo a la forma de la colonia.

4.1.1.3. Elevación de la colonia

Se evaluó el 100% de la colección bajo el criterio de la Figura 1 de la metodología, el 48% que corresponde a una elevación umbilicada, el 25% es papilada, el 18% acuminada, el 6% convexa y el 4% plana, como se observa en la Figura 6.

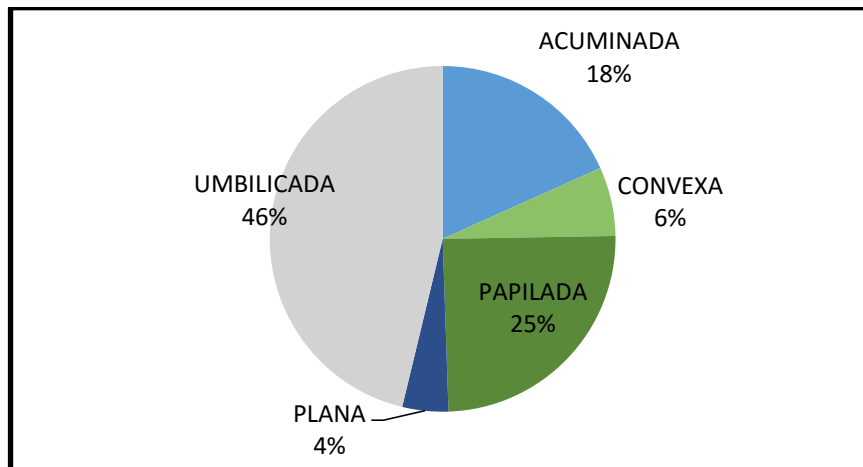


Figura 6. Representación porcentual de la agrupación de actinomicetes de acuerdo a la elevación de la colonia.

4.1.1.4. Esporulación

El 87% de la población presentó esporulación a los siete días de incubación y se evaluaron bajo los criterios de la Tabla 3. El 65% son RA y el 35% Espiral como se ilustra en la Figura 7.

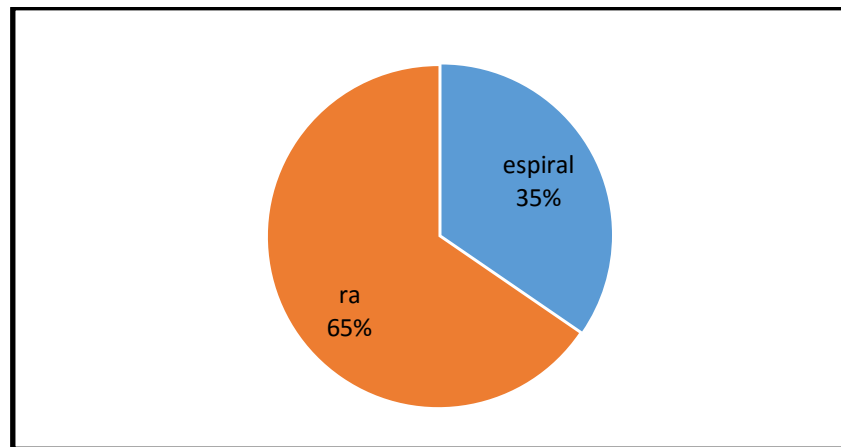


Figura 7. Representación porcentual del tipo de cadena de espora

4.1.1.5. Pigmento Difusible

El 20,4% de la colección produjo pigmentos difusibles en medio Gym, a partir de los 5 días de incubación, el color de pigmento más frecuente fue el CM004 que corresponde a una tonalidad naranjilla, el resto presentó diferentes tonalidades entre café-naranja, solo la cepa BG061 produjo un pigmento de tonalidad vino CM007 como se demuestra en la Figura 8.

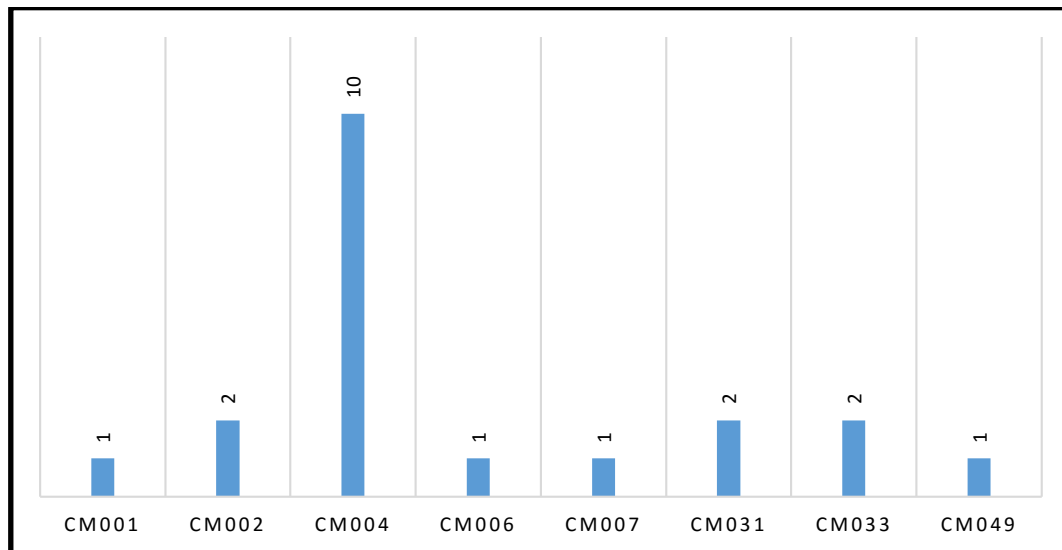


Figura 8. Frecuencia de color de pigmento difusible según código CM

4.1.2. Determinación del intervalo de temperatura

Se estableció que el rango de temperatura óptima de crecimiento para el 100% de la colección fue entre 28°C a 37°C, alcanzando a los 7 días promedio la fase de esporulación. A 50°C solo el 55% presentó crecimiento y 4°C hubo ausencia total de crecimiento como se observa en la Figura 9.

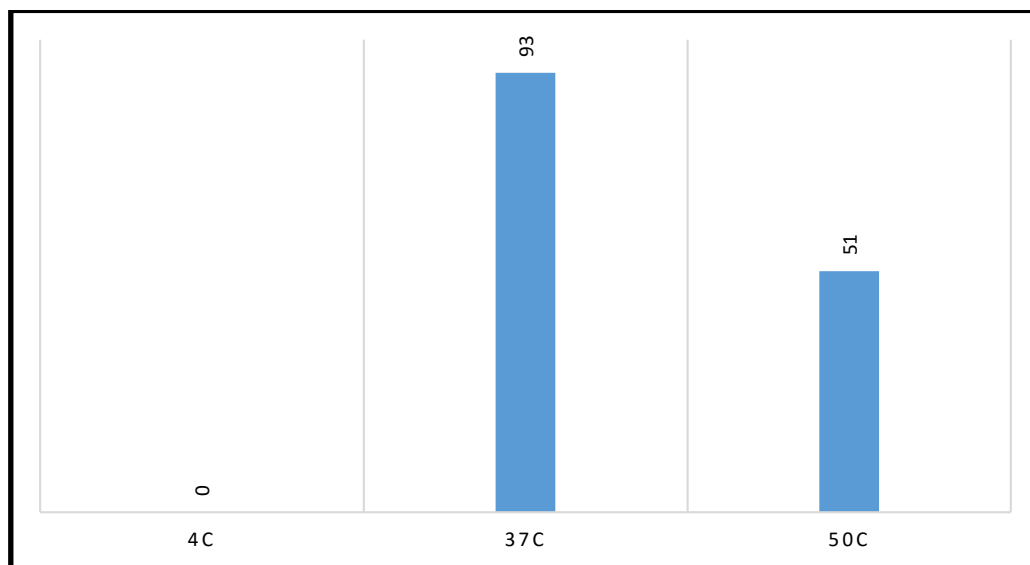


Figura 9. Evaluación del número de cepas tolerantes a diferentes temperaturas de incubación

4.1.3. Determinación del intervalo de pH

Se estableció que el 100% de la colección es tolerante al pH neutro de 7,1. El 96% tolera un pH de 4,51 lo que excluye a cuatro cepas de este grupo BG142 (1), BG143, BG146 y BG159. El 86% tolera apropiadamente un medio de pH de 9,8 a excepción de las cepas BG010, BG011, BG020, BG037, BG058, BG061, BG065 (2), BG071, BG088, BG094, BG097, BG146 y BG159. El pH influye directamente en la esporulación de la mayoría de las cepas retardando en algunas y en otras eliminándolo.

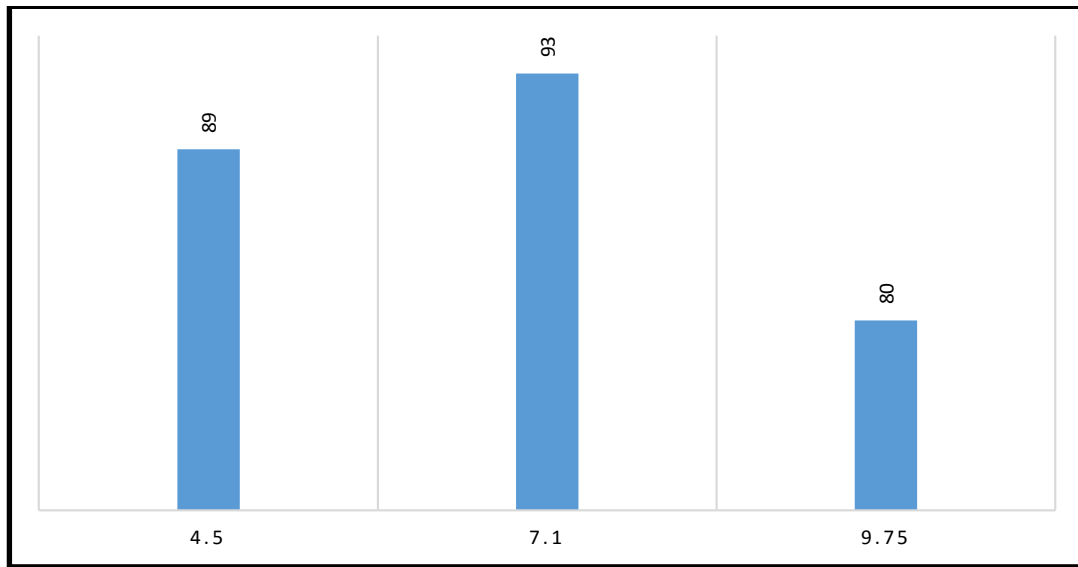


Figura 10. Evaluación del número de cepas tolerantes a diferentes pH

4.1.4. Determinación del intervalo de salinidad

Se determinó el porcentaje de salinidad (NaCl) en el medio de cultivo que puede tolerar la colección de actinomicetes. El 99% toleró una concentración de sal del 2 – al 5% solo la cepa BG111 puede ser considerada salino tolerante porque no se desarrolla en medios con menos del 5% de salinidad, el 96% de la colección el 10% de NaCl, las cepas BG043, BG046, BG054 y BG074 no soportan medios con un porcentaje mayor al 5% de salinidad. Es importante mencionar que el incremento de la concentración de sal en el medio afectó directamente en el color del micelio aéreo de las cepas tomándolas de una tonalidad blanca rosácea como se puede observar en la Figura 11.

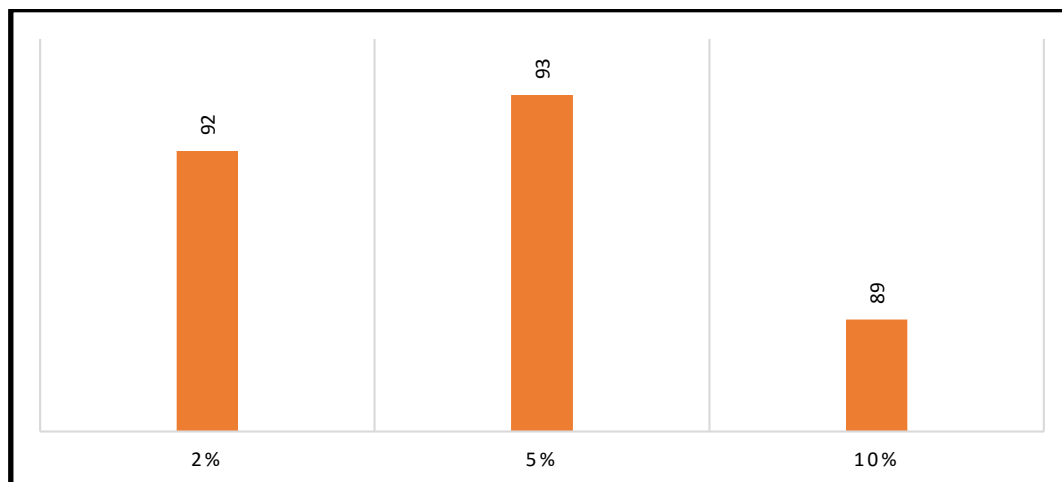


Figura 11. Evaluación del número de cepas tolerantes a diferentes concentraciones de NaCl

4.1.5. Determinación de la capacidad para usar hidrocarburos como única fuente de carbono.

Se comprobó que el 89% de la colección de actinomicetes pueden utilizar diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono. El 92.2% de los actinos asimilan de mejor manera la gasolina, el 83,9% toleró mejor el diésel y solo el 60% de la colección de actinos logró asimilar el petróleo como única fuente de carbono. Las cepas BG034, BG043, BG085 y BG107 no poseen la capacidad de asimilar metabólicamente hidrocarburos como única fuente de carbono.

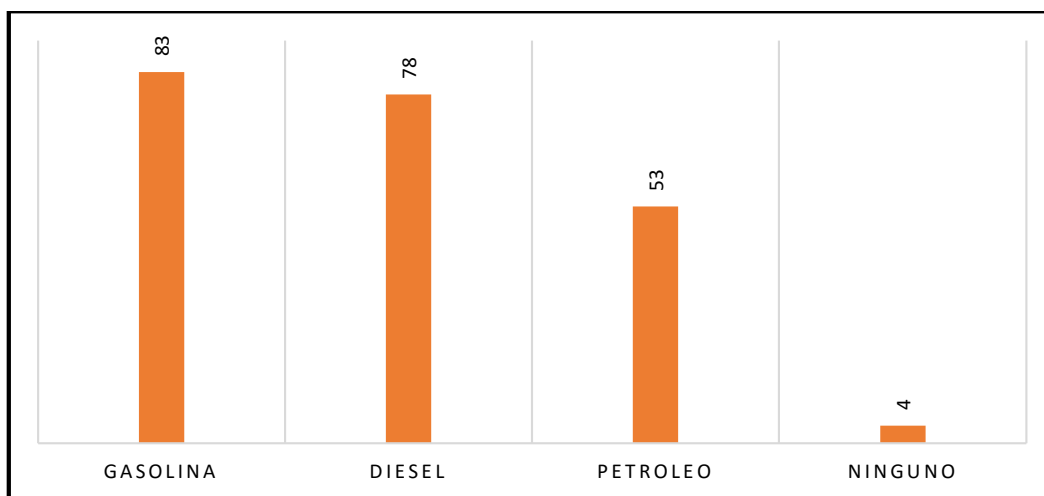


Figura 12. Evaluación del número de cepas tolerantes a hidrocarburos como única fuente de carbono en el medio.

4.2.- Determinación de grupos-especie (Dendograma)

El Dendograma con un corte al 90% de similitud determinó que existen dieciocho grupos-especie (clúster), de los cuales cinco corresponden a individuos solos (Grupo 2, 10, 14, 16 y 18) todos los demás grupos incluyen dos individuos en adelante hasta 18 individuos el más numeroso (Grupo 7) la Tabla 6 resume esta información y la Figura 13 muestra el dendograma de similitud entre individuos resultado del análisis de los datos fenotípicos del Anexo A1.

Tabla 6 Determinación del grupo –especie

Grupo-Especie	Código BG de cepa
1	2,9
2	187
3	4, 115, 82, 160
4	64, 66, 152
5	15, 16, 60, 111, 101, 109, 83, 87, 118, 123, 163, 182, 120, 92, 114
6	8, 104
7	14, 51, 133, 19, 132, 112, 189, 128, 72, 180, 153, 80, 137, 171, 127, 150, 140
8	32, 65(1), 90, 58, 38, 110, 125, 105, 169, 136
9	34, 35, 107
10	43
11	20, 154, 174
12	57, 85, 115, 126, 145, 165, 151
13	61, 86, 71, 95, 177, 75, 124, 158, 149, 161
14	143
15	7, 11, 37, 10, 36, 42, 65(2), 97
16	94
17	142(1), 146, 159
18	88

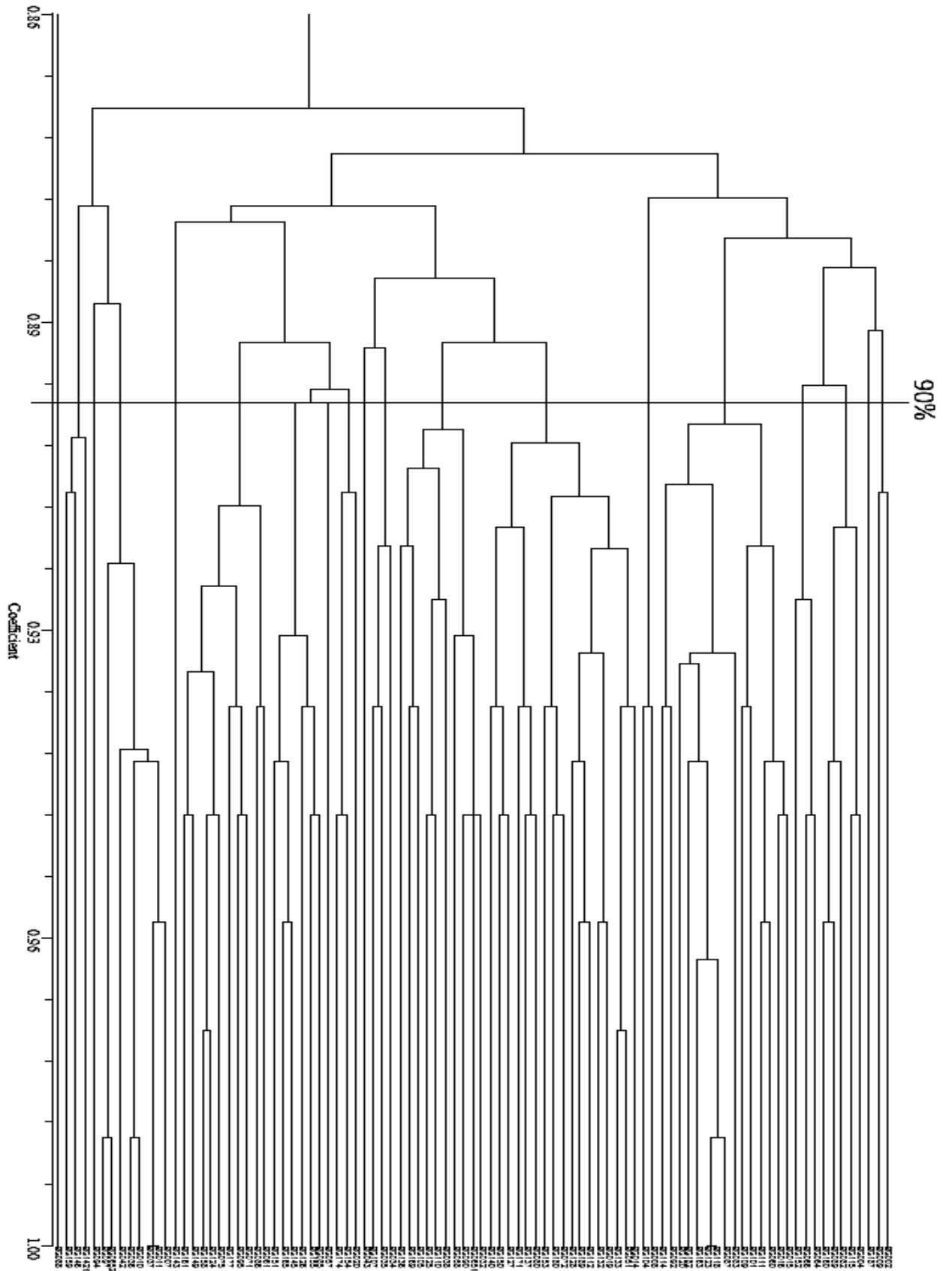


Figura 13: Dendrograma

4.3. Discusión de los resultados

4.3.1. Caracterización macroscópica y microscópica

La colección de actinomicetes es heterogénea presentando diversidad en la coloración. El micelio aéreo del 11% de la colección corresponde a CM007 marrón y el 12% a CM034 beige. El micelio sustrato presenta en un 14% la coloración CM002 naranja, un 11% con el CM004 naranjilla y un 10% CM049 caqui. El 90% de la colección en su fase exponencial de crecimiento forma esporas de las cuales el 65% de los individuos corresponden al tipo RA y el 35% del tipo espiral. Las esporas a los actinomicetes les otorgan la capacidad de resistir a condiciones ambientales extremas como el pH, temperatura y humedad hasta alcanzar las condiciones óptimas de crecimiento (Contreras, 2016). Las esporas del 100% de la colección son hidrofóbicas ya que presentan resistencia a ser suspendidas en agua.

4.3.2. Pruebas taxonómicas y fenotípicas

4.3.2.1. Influencia de la temperatura

La colección de actinomicetes es de tipo mesófila, posee la capacidad de proliferar en un rango de 27 a 50°C de temperatura sin perder sus características morfológicas. A 4°C ninguna de las cepas presentó crecimiento y murieron por congelamiento, lo cual es justificado por las características ambientales de la región amazónica del Ecuador específicamente el campo Sacha provincia de Orellana, procedencia de la colección (Gavilánez y Rodríguez, 2013), la temperatura es uno de los factores que inciden directamente en la velocidad de crecimiento microbiano (Bárceñas y Yáñez, 2012). El 100% de la colección mostró crecimiento acelerado a un intervalo de temperatura de 28-37°C lo cual implica alcanzar la esporulación a los 7 días de incubación.

4.3.2.2. Influencia del pH

El pH influye directamente en el crecimiento microbiano, independientemente de si pueden crecer en un amplio margen de pH alrededor de un óptimo, los cambios bruscos pueden ser nocivos para la membrana celular afectando al transporte de solutos e inhibiendo enzimas (Bárceñas y Yáñez, 2012). La colección de actinomicetes asimila favorablemente un rango de pH entre 4.5 a 9.8 con un óptimo de 7.1 por lo que se clasifica como neutrófila donde a los 7 días de incubación presentó esporulación, mientras que a pH alcalino y ácido esta característica desaparece a más de

presentarse una ligera modificación en el color del micelio sustrato, el mismo que puede ser resultado del sistema antiporte H^+/K^+ que sufre la pared celular por la diferencia de pH del medio.

4.3.2.3. Influencia de la concentración de NaCl

La concentración de sal en el medio influye directamente en el color del micelio sustrato y aéreo de la colección tomándolo de una tonalidad blanca rosácea, el 99% de la colección es halófila ya que se adaptan satisfactoriamente a ambientes con diferentes concentraciones de sal (Regidor, 2010). La colección de actinomicetes se desarrolla satisfactoriamente de 2% al 5% de NaCl. La cepa BG111 es salino dependiente ya que no puede desarrollarse en un medio con una concentración inferior al 5% de salinidad. El cloruro de sodio influyó directamente en el color del micelio aéreo y sustrato generando en el 80% de la colección una coloración blanca rosácea debido a procesos bioquímicos de tolerancia osmótica que se llevan a cabo en la pared celular para controlar la osmolaridad del medio externo e interno de la célula. Estudios en *E.coli* han demostrado que la capacidad fisiológica para controlar la osmolaridad el medio externo con el interno celular es una enzima denominada diamina putresina, los actinomicetes pertenecen al Dominio Bacteria y pueden poseer esta enzima como reguladora de la osmolaridad otorgándoles la capacidad de soportar diferentes concentraciones de sal dependiendo de la disponibilidad de fuentes de carbono (Stanier, 1996).

4.3.2.4. Influencia de los hidrocarburos como única fuente de carbono

Los suelos contaminados con hidrocarburos en el campo Sacha de la provincia de Orellana habitad de la colección de actinomicetes de esta investigación, como se muestra en la Tabla 6 ha permitido que el 89% de la colección de actinomicetes logre adaptarse a diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono, donde el 92,2% asimilan de mejor manera la gasolina, el 83,9% el diésel y solo el 60% el petróleo. La gran adaptabilidad e la colección la convierte en potencial biorremediador de suelos contaminados con hidrocarburos a excepción de las cepas BG034, BG043, BG085 y BG107 que no poseen la capacidad de asimilar metabólicamente hidrocarburos como única fuente de carbono, los grupos fenotípicos 9, 10 y 12 están integrados por estas cepas.

4.4. Discusión General del trabajo

Los resultados obtenidos en esta investigación han permitido confirmar la diversidad de la colección tanto biológica como metabólica con el 90% de similaridad, estableciéndose 18 grupos especie capaces de sobrellevar condiciones variables de pH, temperatura, salinidad y fuente de carbono. Uno de los factores más importante que nos ha permitido aceptar la hipótesis de investigación, fue la influencia directa de las condiciones ambientales de origen de la colección (Campo Sacha provincia de Orellana) en los resultados taxonómicos de esta investigación permitiendo categorizar al 90% de la colección como es mesófila (28°-50°C), neutrófila (pH de 4,5-9,8) y halófila (NaCl 2%-10%), además de que el 88% de la colección posee un amplio valor biorremediador por su capacidad de utilizar gasolina y diésel como única fuente de carbono y el 60% de usar petróleo. El 20,4% de la colección produce pigmentos difusibles que pueden ser de utilidad en biotecnología.

Los microorganismos sometidos a factores ambientales extremos sufren diferentes cambios en su apariencia morfológica debido a las adaptaciones metabólicas a las que son expuestos, el NaCl provocó cambios en el color tanto del micelio aéreo como sustrato de las colonias tomándolas de un color blanco raseo causado por la producción enzimática de la pared celular de los actinomicetes para adaptarse a un medio con una osmolaridad superior a la del interior de la célula. El pH ácido y alcalino hizo que la esporulación se tarde más tiempo en presentarse en relación a un pH neutro el cual favorece a los 7 días de incubación la esporulación.

El carbono es la principal fuente de energía metabólica de los microorganismos autótrofos (Mateos, s/f). En esta investigación se empleó derivados de hidrocarburos como única fuente de carbono (gasolina, diésel y petróleo). Se comprobó que la gasolina pudo ser mejor asimilada por la colección debido a su estructura química con 5-12 átomos de carbono por moléculas de hidrocarburo a diferencia del diésel, con el 75% de moléculas de hidrocarburos saturados y 25% de hidrocarburos aromáticos y el petróleo que adicional a su compleja composición química con moléculas mucho más largas de hidrocarburos posee un alto contenido de metales pesados. Esto demuestra que el lugar de origen de la cepa, influye directamente en la evolución metabólica del microorganismo en función de las condiciones ambientales, pero como toda regla tiene su excepción los grupos-especie 9, 10 y 12 incluyen cepas que no poseen esta capacidad. Se sabe de otras investigaciones que actinomicetes del grupo *Nocardia sp.* Y *Micromonospora sp.* Son capaces de degradar

hidrocarburos como el queroseno solo la caracterización genotípica nos puede confirmar si alguna de las cepas analizadas en esta investigación corresponde a alguna de estas especies.

4.5.- Verificación de la hipótesis

Hipótesis de Investigación:

La diversidad de actinomicetes se manifiesta por la presencia de más de cinco grupos-especie definidos por taxonomía numérica de datos fenotípicos

Hipótesis nula

Existen menos de cinco grupos-especie de actinomicetes definidos por taxonomía de datos fenotípicos.

Se ha comprobado que la colección de actinomicetes es diversa ya que se han determinado más de cinco grupos-especie mediante taxonomía numérica, por tanto, se acepta la hipótesis de investigación y se rechaza la hipótesis nula.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.- Conclusiones

- La colección de 93 actinomicetes posee una gran diversidad en cuanto a todas sus características fenotípicas, entre las más importantes, el color, producción de pigmentos difusibles, adaptabilidad a diversas condiciones de temperatura, salinidad, pH y utilización de hidrocarburos como única fuente de carbono.
- Con el 90% de similitud, el Dendograma demostró que existen 18 grupos – especie en la colección.
- La colección de actinos es de tipo mesófila ya que es capaz de crecer en forma adecuada y alcanzar la fase exponencial de crecimiento en menor tiempo a temperaturas desde 28C-50C.
- La población microbiana en estudio es de tipo neutrófila ya que es capaz de crecer en un ambiente con pH desde 4.5 a 9.75
- El 99% de la colección es salino-tolerante a excepción de la cepa BG111 que es salino-dependiente.
- La colección de actinomicetes posee la capacidad de utilizar gasolina, diésel y petróleo como única fuente de carbono, y en casos particulares de alcanzar la fase de esporulación en estas condiciones.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar la caracterización genotípica de la colección de actinomicetes para determinar los individuos más representativos de cada grupo-especie.
- Se recomienda realizar pruebas cuantitativas de degradación de TPHs con los actinomicetes que presentaron esporulación en el medio Bushnell-Haas enriquecido con hidrocarburos.
- Se recomienda utilizar las cepas BG034, BG043, BG085 y BG107 en otras investigaciones de utilidad biotecnológica diferente a la biorremediación de contaminaciones por hidrocarburos

8. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, D. 2016. Yasuní: Empieza la explotación petrolera en polémico bloque ubicado en la Amazonía ecuatoriana. Disponible en: <https://es.mongabay.com/2016/09/yasuni-explotacion-petrolera-amazonia-ecuador/> (21/03/2016).

Alexander, M y Wiley, J. 1987. Introduction to soil microbiology. New York. 2nd edition. 467P.

API. 1981. American Petroleum Institute vs. E. P. A. Nos. 76-4497, 79-1829 and 79-2944. 661 F.2d 340. Noviembre, 1981. Disponible en: <https://www.leagle.com/decision/19811001661f2d3401928> (14/05/2016).

Aranda, D. 2013. Petróleo y contaminación van de la mano. Disponible en: <https://darioaranda.wordpress.com/2013/02/02/petroleo-y-contaminacion-van-de-la-mano/> (21/06/2015).

Bárceñas, M. y Yáñez, P. 2012. Determinación de los niveles de tolerancia a hidrocarburos y potencial de fitorremediación de cuatro especies vegetales del sector Baeza-El Chaco, Ecuador. Rev. La Granja. Abya Yala. Universidad Politécnica Salesiana. Consultado en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8823/1/Determinacion%20de%20los%20niveles%20de%20tolerancia%20a%20hidrocarburos%20y%20potencial%20de%20fitorremediacion%20de%20cuatro%20especies%20vegetales%20del%20sector%20Baeza%20El%20Chaco%20Ecuador.pdf> (23/11/2017). Página: 20

Benavides, J.; López de Mesa; Quintero, G.; Guevara, D.; Vizcaíno, D.; Jaimes, S.; Gutiérrez, M.; Riaño, J.; García, M. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Programa de Ciencias Básicas. Universidad de La Salle. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Nova - Publicación Científica ISSN: 1794-2470 VOL.4 No. 5 enero - junio de 2006:1-116. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS1_5.pdf (17/02/2018).

Boone, D.; Castenholz, R.; Garrity, G. 2001. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag, 2ª ed., vol. 1.

Brito, O.; Ize, I.; Gavilán, A. 2018. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. La gaceta ecológica. Número 69. Disponible en: <file:///C:/Users/INTEL%202018/Downloads/Dialnet-LaRestauracionDeSuelosContaminadosConHidrocarburos-2884413.pdf> (17/02/2018).

Cancillería del Ecuador, 2017. Disponible en: <http://www.cancilleria.gob.ec/historia-de-chevron-texaco-en-ecuador/> (16/12/2017).

Clark, R.; Brown, D. 1977. Petroleum: properties and analyses in biotic and abiotic systems: Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Marine Environments and Organisms. Academic Press, New York, vol. 1

Contreras, R. 2016. La importancia de las esporas. Disponible en: <https://biologia.laguia2000.com/hongos/la-importancia-de-las-esporas> (17/02/2018).

CubaEduca. 2016. Polímeros derivados del petróleo. Consultado en: http://www.cubaeduca.cu/media/www.cubaeduca.cu/medias/cienciatodos/Libros_1/ciencia2/39/html/SEC_16.HTM. (05/06/2016).

El Comercio. (2012/05/08). Quinto derrame de hidrocarburos en Ecuador en este año. Consultado en: www.elcomercio.com.ec/negocios/Quinto-derrame-hidrocarburos_0_695930632.html. (04/06/13).

Fernández, M. y Alaniz, F. 1993. Gasificación de combustibles sólidos y de combustóleo para la generación eléctrica. Reporte del estado actual de las tecnologías de gasificación aplicadas a la generación de energía eléctrica, reporte No. 44207, IIE, División de sistemas mecánicos, Departamento de Ingeniería Mecánica.

Fritz O., E Sieverding, K. Ineichen, P. Ma Der., T. Boller y A. Wiemken. 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (5), 2816-2824. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000098&pid=S0120-9965200500020001700009&lng=en. (18/07/2017).

García, K. 2016. Alta en azufre 40% de la gasolina del país. Disponible en: <https://www.eleconomista.com.mx/empresas/Alta-en-azufre-40-de-la-gasolina-del-pais-20160510-0157.html>. (17/04/2017).

Garrity, G.H.; Holt, J.G. 2001. The road map to the manual. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic bacteria. Springer- Verlag, 2ª ed., vol. 1.

Gavilánez, T. y Rodríguez, C. 2013. Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en Biorremediación.

Genetics and Microbiology Research Group (Genmic). 2008. Microbiología Industrial. Curso de Microbiología clínica 2008-2009 (Grupo 1). Consultado en: www.unavarra.es/genmic/micind-2-4.htm. (09/01/2017). Página. 29

Gómez, J. 2003. Contaminación de suelos por compuestos orgánicos. Consultado en: <http://www.ugr.es/~fjmartin/INFORMES/Introduccion.pdf> (27/05/2016).

Gonzales, Y. 2010. Los Actinomicetos: Una Visión Como Promotores De Crecimiento Vegetal. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad De Ciencias. Bogotá, D.C. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8665/tesis618.pdf?sequence=1>. (16/08/2016).

Goodfellow, M.; Williams, S.T. 1983. Ecology of actinomycetes. Annual Review of Microbiology, 37, 189-216.

Howe-Grant, M., 1996. Petroleum. Encyclopedia of chemical technology 4th ed. Wiley Inerscience Publication. Páginas: 342-480

Ibañez, J. 2007. Aflatoxinas y Actinomicetos. Moleculas de alto riesgo para la salud del suelo, de las producciones vegetales y animales y del hombre. (Salvador González Carcedo. Curso de Bioquímica del Suelo. Sanidad del suelo, Salud del hombre. 2.). Disponible en: <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2007/06/16/67821>. (16/08/2017).

Jayasinghe, D. y Parkinson, D. 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied Soil Ecology*. Canadá. (38): 109-118.

La república. 2013. Explotación petrolera en el Yasuní. Disponible en: <https://www.larepublica.ec/blog/politica/2013/10/03/asamblea-aprobo-la-explotacion-petrolera-del-yasuni/> (17/01/2018).

Lopez, G y Estrada. A. 2008. Morfología y composición química de las partículas emitidas por los automotores a diésel en los grandes centros de población del país. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/calialre/mexicon/R-0013.pdf>. (18/04/2016)

López de Mesa, J.; Quintero, G.; Guevara, A.; Jaimes, D.; Cáceres, S.; Gutiérrez, M.; Miranda, J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, enero-junio, año/vol. 4, número 005. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia pp. 82-90

López, N.; Lozada, J. 2011. Uso De La Biorremediación Para El Saneamiento De Sustratos Contaminados Por Petróleo En El Oriente De Venezuela. *Eco Diseño Y Sostenibilidad*. Consultado En: [Http://Epublica.Saber.Ula.Ve/Index.Php/Ecodiseno/Article/View/4378/4155](http://Epublica.Saber.Ula.Ve/Index.Php/Ecodiseno/Article/View/4378/4155). (11/06/2013).

Martínez, A.; Pérez, M.; Pinto, E.; Gurrola, B.; Osorio, B. 2011. Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Rev. Int. Contam. Ambient* vol.27 no.3 México. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992011000300009 (04/07/2015).

Martínez, E. 2006. Petróleo, pueblos indígenas y biodiversidad. FLACSO. Disponible en: <http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/50538.pdf> Páginas: 189-204.

Martínez, V.; López, F. 2001. Efecto de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de un suelo arcilloso. *Terra* 19: 9-17.

Melero, J. 2012. Características del combustible diésel. Grupopedia. Disponible en:
<http://www.grupopedia.com/vida-y-estilo/autos/caracteristicas-del-combustible-diesel/> (14/06/2016)

Michener Ch. y Sokal R. Fenética o Taxonomía Numérica. [Sede Web]. Tiwanacu: Marimarus, 2011. Actualizado el 11 de junio del 2011; Citado 20 de Agosto 2014. Disponible en:
<http://marimarus.wordpress.com/2011/06/28/fenetica-o-taxonomia-numerica-concepto-fenetico-de-especie/> (25/04/2016).

Morgan, P.; Watkinson, R. 1989. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *Rev. Biotechnol.* 8(4) Páginas: 305-33. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2650885> (25/11/2016).

Parés, R.; Juárez, A. 1997. Bioquímica de los microorganismos. Disponible en:
[https://books.google.com.ec/books?id=eHK7eHXBk4C&pg=PA363&pg=PA363&dq=Par%C3%A9s+y+Ju%C3%A1rez+\(1997\)+actinomyces&source=bl&ots=e2HeMa0xDA&sig=KEBAI_iiPFh-1KiTvNlzm7373kU&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjz-qCwMfaAhUKuVMKHVyhAv0Q6AEIPzAC#v=onepage&q=Par%C3%A9s%20y%20Ju%C3%A1rez%20\(1997\)%20actinomyces&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=eHK7eHXBk4C&pg=PA363&pg=PA363&dq=Par%C3%A9s+y+Ju%C3%A1rez+(1997)+actinomyces&source=bl&ots=e2HeMa0xDA&sig=KEBAI_iiPFh-1KiTvNlzm7373kU&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjz-qCwMfaAhUKuVMKHVyhAv0Q6AEIPzAC#v=onepage&q=Par%C3%A9s%20y%20Ju%C3%A1rez%20(1997)%20actinomyces&f=false). (14/09/2016).

Pedro, M. 2007. Gasolina, composición y clasificación. Disponible en:
<http://grupoqo1.blogspot.com/2007/10/gasolinascomposicin-y-clasificacin.html>. (21/08/2017).

Penberthy, J. y Weston, R. 2000. Remediation of diesel and fuel oil hydrocarbons in high clay content soil. A field comparison of amendment performance conducted at the Mare Island Naval Shipyard, Proceedings of the National Defense Industrial Association, March 27-30, 2000; National Defense Industrial Association: Long Beach, California.

Ponce, D. 2014. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Universidad del Bio-Bio. Facultad de ingeniería departamento ingeniería civil y ambiental. Disponible en: <http://repopib.ubiobio.cl/jspui/bitstream/123456789/135/3/Ponce%20Contreras%2C%20Daniela.pdf>

Quadri, G. 1994. Instituto Nacional de Ecología. Quince años de políticas ambientales en México. Memoria testimonial. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=GTMw5a0D84MC&pg=PA55&lpg=PA55&dq=quadri+1994&source=bl&ots=iCVNOw-Dqv&sig=3ms8FQV72FFiBtxO2W6J3T0y2Oo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjg7_SLxa7ZAhXkUt8KHTQpDmcQ6AEleTAM#v=onepage&q=quadri%201994&f=false (8/01/2018).

Quinayas, M.; Quiñones, J. Moreno, A. 2014. Actinomicetos. Tecnología control Ambiental. Microbiología. SENA. Disponible en: https://es.slideshare.net/angelica0071/actinomicetos-39073002?cid=76294a9a-cc02-482f-9437-2a2015380df8&v=cf1&b=&from_search=17. (19/05/2016).

Ramonet, I. 2015. La incidencia geopolítica del petróleo. Disponible en: <http://deslinde.co/la-incidencia-geopolitica-del-petroleo/> (25/07/2016).

Regidor, D. 2010. Vivir entre sal: los microbios halófilos. Disponible en: <http://www.madrimascd.org/blogs/microbiologia/2010/05/02/130818>. (17/02/2018).

Rivera, M.; Ferrera, R.; Sánchez, P.; Volke, V.; Fernández, L.; Rodríguez, R. 2002. Descontaminación De Suelos Con Petróleo Crudo Mediante Microorganismos Autóctonos Y Pasto Alemán *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/28134249_Descontaminacion_de_suelos_con_petroleo_crudo_mediante_microorganismos_autoctonos_y_pasto_aleman. México. (01/03/2015).

Rodríguez, L.; Julia, V. s.f. efecto antagonico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofiticos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatogeno causante de (Damping Off) en plantas de tomate. UNMSM. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Salud/Rodriguez_LV/Introduc.PDF (05/02/2015).

Saval, B. 1995. Acciones para la remediación de suelos en México. Segundo Minisimposio Internacional sobre contaminantes del agua y suelo. Instituto de ingeniería. UNAM. México.

Sneath, P. H. A.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E.; Holt, J. G. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 5. Actinobacteria Parte A y B. segunda edición. Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/bfm%3A978-0-387-68233-4%2F1.pdf>. (03/04/2015).

Sokal, R. y Sneath, P. 1963. Principles of numerical taxonomy San Francisco & London, Freeman and Cía.

Soler, A. 2012. Biodiversidad de actinomicetos aislados de plantas depuradoras de aguas residuales. Estudio de la capacidad de biodegradación de compuestos tóxicos. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/14982> (18/09/2015).

Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. Int J Syst Bacteriol 47, 479–491.

Stanier, R. 1996. Reverte. Microbiología. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=2u-6Q2XCMDgC&dq=NaCl+en+los+microorganismo&hl=es&source=gbp_navlinks_s. Páginas: 218-221.

Takefumi, H.; Motomasa, S.; Ryosuke, F.; Yasuko, J.; Takayuki, K.; Akira, T.; Kikuo, S.; Hiroshiro, S. 2005. Isolation of Novel Bacteria and Actinomycetes Using Soil-Extract Agar. Medium. Journal of Bioscience And Bioengineering Vol. 99, (5), 485–492. 2005. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/333066630/Isolation-of-Novel-Bacteria-and-Actinomycetes>. (06/08/2016).

Toro, D. 2004. La Biodiversidad Microbiana Del Suelo, Un Mundo Por Descubrir. Universidad de Caldas. Manizales, 2004-07-17. Rev. 2004-09-18. Disponible en: http://lunazul.ucaldas.edu.co/downloads/Lunazul19_5.pdf (08/04/2014).

UNPL, s/f. taxonomía numérica. Microbiología General. Facultad de Ciencias Exactas. Disponible en:

[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi4vqOm7tHaAhWomOAKHRRXA9YQFgg0MAE&url=https%3A%2F%2Fwww.biol.unlp.edu.ar%2Fmicrobiologiagraf%2Fanexosycuestionarios%2Fayc-10.doc&usq=AOvVaw3NKxFWVbB6mnLMgfxmQ58- \(05/04/2017\)](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi4vqOm7tHaAhWomOAKHRRXA9YQFgg0MAE&url=https%3A%2F%2Fwww.biol.unlp.edu.ar%2Fmicrobiologiagraf%2Fanexosycuestionarios%2Fayc-10.doc&usq=AOvVaw3NKxFWVbB6mnLMgfxmQ58- (05/04/2017))




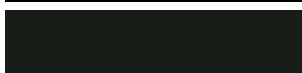
















Velasco, J., y T. Volke. 2003. El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica* 66. Páginas: 41-53.

Whyte, L. G., Hawari, J., Zhou, E., Innis, W. E., 1998. Biodegradation of variable- chain- length alkanes at low temperatures by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. Páginas: 2578- 2584.

Zaitlin, B.; Turkington, D.; Parkinson, G.; Clayton, G. 2004. Effects of Tillage and Inorganic Fertilizers on Culturable Soil Actinomycetes Communities and Inhibition of Fungi by Specific Actinomycetes. *Applied Soil Ecology*. 26: 53-62.

ANEXOS

A2. Matriz de colores RAL

RAL 1000		RAL 6006	
RAL 1001		RAL 6007	
RAL 1002		RAL 6008	
RAL 1003		RAL 6009	
RAL 1004		RAL 6010	
RAL 1005		RAL 6011	
RAL 1006		RAL 6012	
RAL 1007		RAL 6013	
RAL 1011		RAL 6014	
RAL 1012		RAL 6015	
RAL 1013		RAL 6016	
RAL 1014		RAL 6017	
RAL 1015		RAL 6018	
RAL 1016		RAL 6019	
RAL 1017		RAL 6020	
RAL 1018		RAL 6021	
RAL 1019		RAL 6022	
RAL 1020		RAL 6024	
RAL 1021		RAL 6025	
RAL 1023		RAL 6026	
RAL 1024		RAL 6027	
RAL 1027		RAL 6028	
RAL 1028		RAL 6029	

RAL 1032



RAL 1033



RAL 1034



RAL 2000



RAL 2001



RAL 2002



RAL 2003



RAL 2004



RAL 2008



RAL 2009



RAL 2010



RAL 2011



RAL 2012



RAL 3000



RAL 3001



RAL 3002



RAL 3003



RAL 3004



RAL 3005



RAL 3007



RAL 3009



RAL 3011



RAL 3012



RAL 3013



RAL 6032



RAL 7000



RAL 7001



RAL 7002



RAL 7003



RAL 7004



RAL 7005



RAL 7006



RAL 7008



RAL 7009



RAL 7010



RAL 7011



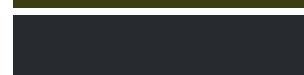
RAL 7012



RAL 7013



RAL 7015



RAL 7016



RAL 7021



RAL 7022



RAL 7023



RAL 7024



RAL 7026



RAL 7030



RAL 7031



RAL 7032



RAL 3014



RAL 3015



RAL 3016



RAL 3017



RAL 3018



RAL 3020



RAL 3022



RAL 3027



RAL 3031



RAL 4001



RAL 4002



RAL 4003



RAL 4004



RAL 4005



RAL 4006



RAL 4007



RAL 4008



RAL 4009



RAL 5000



RAL 5001



RAL 5002



RAL 5003



RAL 5004



RAL 5005



RAL 7033



RAL 7034



RAL 7035



RAL 7036



RAL 7037



RAL 7038



RAL 7039



RAL 7040



RAL 7042



RAL 7043



RAL 7044



RAL 7045



RAL 7046



RAL 7047



RAL 8000



RAL 8001



RAL 8002



RAL 8003



RAL 8004



RAL 8007



RAL 8008



RAL 8011




















RAL 8012



RAL 8014



RAL 5007		RAL 8015	
RAL 5008		RAL 8016	
RAL 5009		RAL 8017	
RAL 5010		RAL 8019	
RAL 5011		RAL 8022	
RAL 5012		RAL 8023	
RAL 5013		RAL 8024	
RAL 5014		RAL 8025	
RAL 5015		RAL 8028	
RAL 5017		RAL 9001	
RAL 5018		RAL 9002	
RAL 5019		RAL 9003	
RAL 5020		RAL 9004	
RAL 5021		RAL 9005	
RAL 5022		RAL 9006	
RAL 5024		RAL 9007	
RAL 6000		RAL 9010	
RAL 6001		RAL 9011	
RAL 6002		RAL 9016	
RAL 6003		RAL 9017	
RAL 6004		RAL 9018	
RAL 6005			

Fuente: (Copiba, 2009)

A3. Agrupación de colores RAL en grupos CM para caracterización macroscópica de

cepas

CODIGO CM	CODIGO RAL	CODIGO CM	CODIGO RAL	CODIGO CM	CODIGO RAL	CODIGO CM	CODIGO RAL	CODIGO CM	CODIGO RAL
CM001	1012	CM009	2002	CM014	5000	CM022	5020	CM007	2001
	1002		3017		5001		6004		3000
	1005		3018		5002		6014		3001
	1032		3020		CM015		7040		6020
CM002	1003	3011	7042	6028		3003			
	1017	3027	7005	CM025	7013	3004			
	1021	CM010	3022		7023	7016	CM011	4001	
	1023		3014	7030	7022	5005			
	1006	CM013	6005	7036	7033	5007			
	1007		6006	7037	CM027	7035	5009		
	8002		9004	7038		7047	5010		
	1004		9005	CM017	8007	9018	CM020	6011	
	CM003	1000	9011		6003	CM028		7032	6021
		CM004	1019	9017	8011		7044	7009	
1020	6007		8016	CM029	9007	7010			
1024	6008		8017		5015	7012			
1027	6009		6013	CM030	5012	7006			
7034	6012		CM018		4009	5024	7039		
7002	6022			8025	CM031	1001	CM021	6015	
6013	8019		8008	1013		7011			
8000	7021		CM019	6010	CM033	1014	7015		
8001	7024			6016	CM034	1015	5022		
8003	7026			6017	CM035	1016	7031		
CM005	1028			3007	6018	CM036	1018	CM008	3005
	1033		4007	6024	CM037	6019	3009		
	1034		5003	6025	CM038	6026	3013		
	CM006		8023	8022	6029	CM039	6027		3016
2000		5004	6032	CM040	7000	3031			
2003		5008	7003	CM041	3012	4002			
2004		5011	6000	CM042	3015	4004			
2008		5013	6001	CM043	4003	8004			
2011		7043	6002	CM044	4005	CM024	7001		
2009		8014	CM026	9003	CM045		4006	7004	
2010		8028		9010	CM046		4008	7045	
2012		CM050	8024	9016	CM047		9001	7047	
CM016		8012	CM012	5017	CM023	5018	CM048	9002	9006
	8015	5015		5021		CM049	1011		
	7008	5019							

A4. Resumen de la caracterización macroscópica de las colonias

COLONIA	TIPO	TOTAL
FORMA	CIRCULAR	44
	FILAMENTOSA	1
	IRREGULAR	44
	RIZOIDE	4
ELEVACION	ACUMINADA	17
	CONVEXA	6
	PAPILADA	23
	PLANA	4
	UMBILICADA	43
PIGMENTO DIFUSIBLE		19
ESPORULACION		81

A5. Datos físico-químicos Petróleo de las unidades de bombeo de Testing Bloque 56 de Petroamazonas, recolectado en la empresa SERTECPET, Provincia de Sucumbíos,

Cantón Lago Agrio.

Densidad	% de Agua	API
0.92-0.87 g/cm ³	20%	Mediano 22-29.9

B. Medios de Cultivo y Soluciones

B1. Medio GYM

Glucosa	4.00gr
Extracto de Levadura	10.00gr
Extracto de Malta	10.00gr
CaCO ₃	2.00gr
Agar	15.00gr
Agua	1000.00ml

B2. Medio SCA

Almidón soluble	10.00gr
K ₂ HPO ₄	2.00gr
KNO ₃	2.00gr
NaCl	2.00gr
Caseína	0.30gr
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.05gr
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0.02gr
CaCO ₃	0.01gr
Agar	15.00gr
Agua	1000.00ml

B3. Medio Bushnell-Haas

MgSO ₄	0.200gr
CaCl ₂	0.020gr
Na ₂ HPO ₄	1.000gr
NaH ₂ PO ₄	1.000gr
NH ₃ NO ₃	1.000gr
FeCl	0.050gr
Agar	20.00gr
Agua	1000.00ml

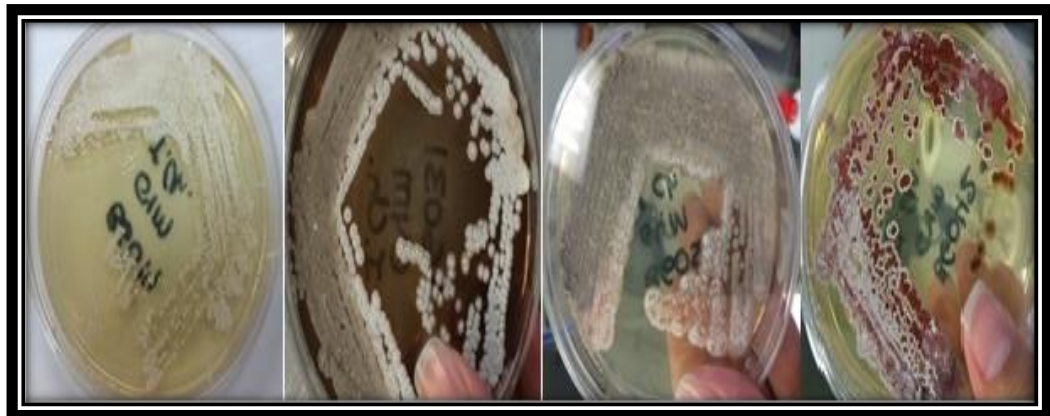
B4. Receta Buffers

pH	Solución	Volumen (ml)	Solución	Volumen (ml)
4,51	Ac. Cítrico 0,1M	2,0	Na ₂ HPO ₄ 0,2M	9,0
9,75	Ac. Bórico 0,2M	5,15	NaOH 0,2M	9,75
7,1	Ac. Cítrico 0,1M	2,64	Na ₂ HPO ₄ 0,2M	12,35

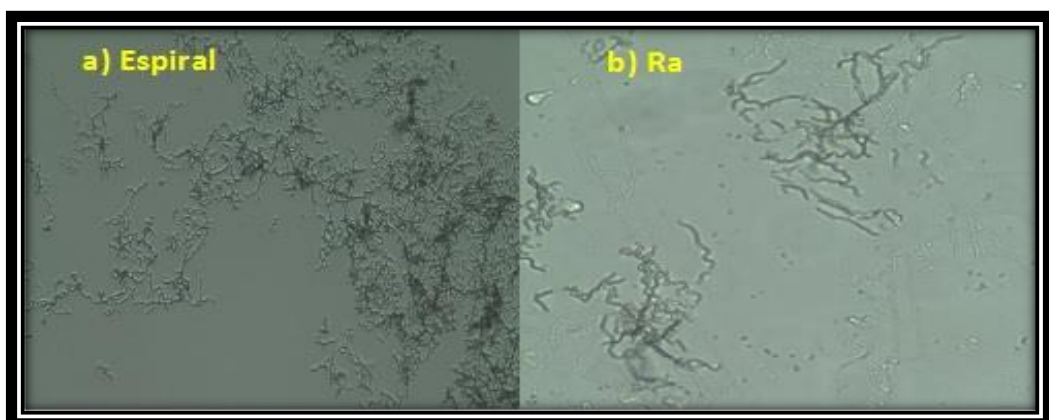
C. Fotografías



C1. Activación de cepas en estría simple



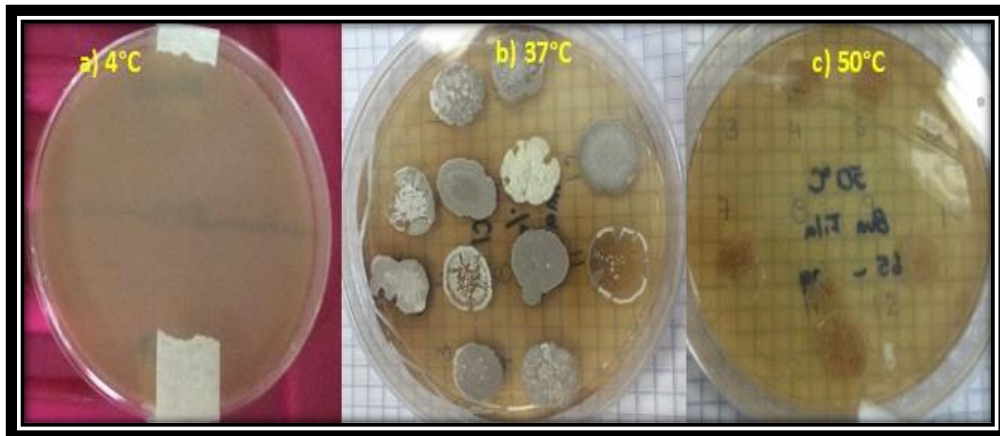
C2. Purificación de cepas en estría compuesta



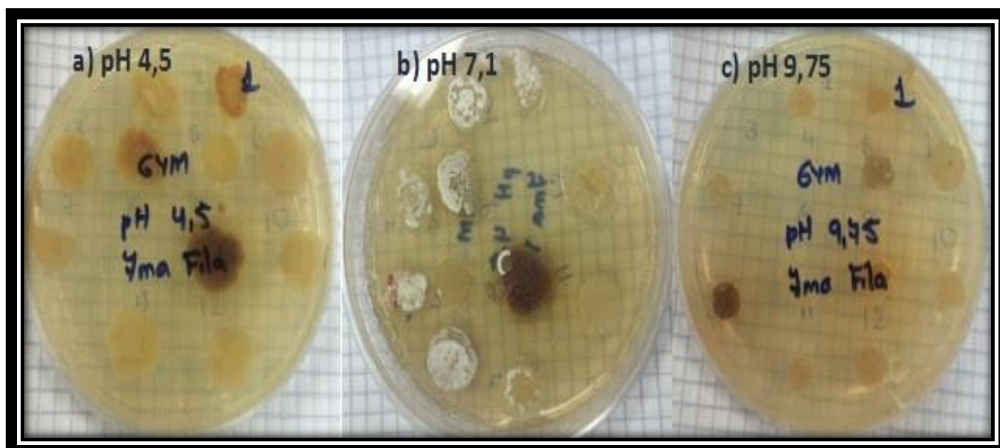
C3. Morfología de la cadena de esporas



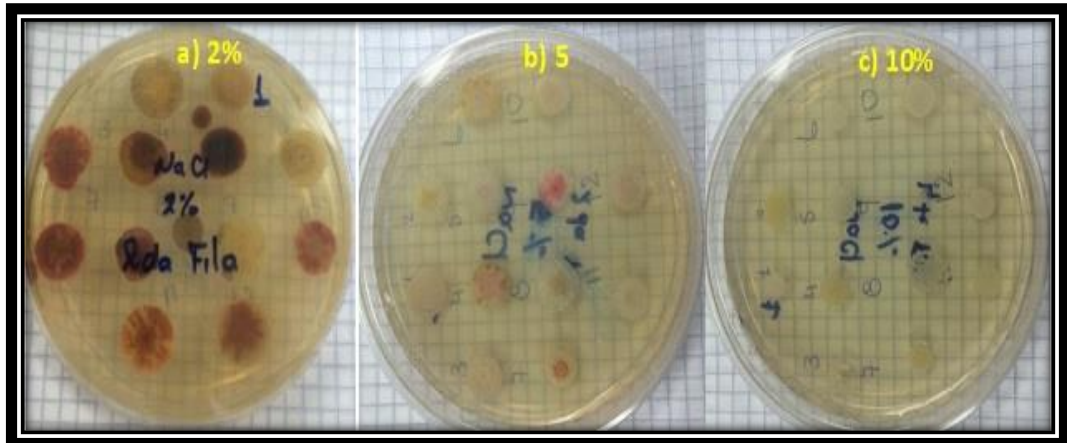
C4. Pigmento difusible



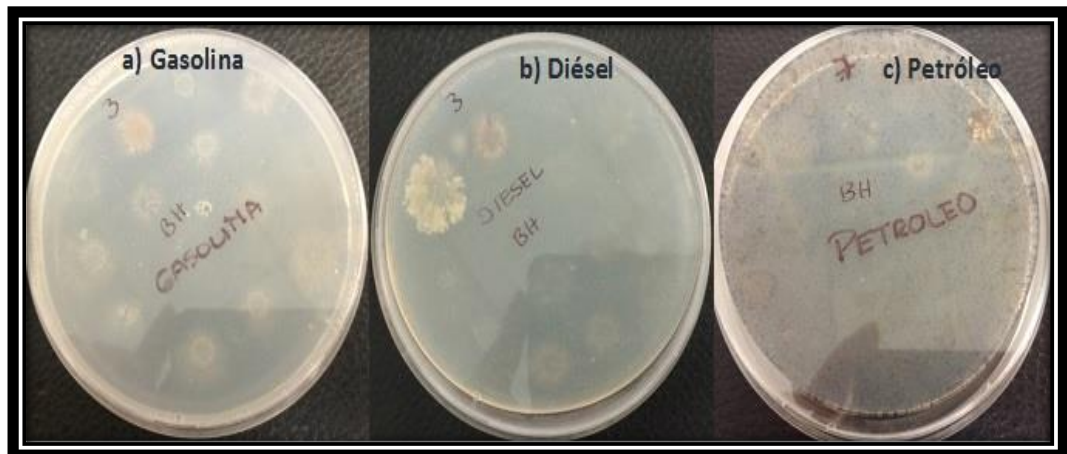
C5. Crecimiento de las cepas en diferentes temperaturas



C6. Crecimiento de las cepas a diferentes pH



C7. Crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de NaCl



C8. Crecimiento de las cepas con diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono.