



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



Identificación y clasificación de bacterias con potencial en biotecnología vegetal

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Gladys Estefanía Reinoso Caicedo

Tutor: Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza

AMBATO - ECUADOR

Diciembre - 2018

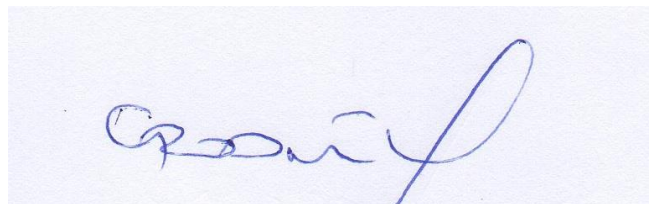
APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza

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, 21 de noviembre de 2018



Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza; Ph.D.

C.I. 1802166502

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Gladys Estefanía Reinoso Caicedo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniería Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Gladys Estefanía Reinoso Caicedo

C.I. 180461168-7

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Mg. Wilson Patricio Orozco Freire
C.I.: 1721363008



Mg. Walter Aurelio Simbaña Ayo
C.I.: 1709180853

Ambato, 05de diciembre de 2018.

DERECHOS DE AUTOR

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

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



Gladys Estefanía Reinoso Caicedo

C.I. 108461168-7

AUTORA

DEDICATORIA

Dicen que somos de las personas que nos abrigan el alma en los momentos difíciles, por eso este trabajo va dedicado en primer lugar a mis padres Gladys Caicedo y Roberto Reinoso. Por el apoyo incondicional otorgado a lo largo de toda mi vida, apoyo que me ha convertido en la persona que ahora soy y que me ha ayudado a conseguir todos los objetivos que me he propuesto.

También se lo dedico a mi hermana Jennifer por siempre haber sido mi mejor amiga y esa patadita que necesitaba para seguir adelante con el desarrollo del presente trabajo.

A mi familia que siempre ha estado junto a mí para darme fuerza y consejos. Desde los momentos más difíciles hasta los más felices de mi vida.

A mis amigos que a lo largo de la vida universitaria se convirtieron en otra familia.

Con quienes compartí momentos inolvidables.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme puesto siempre en el lugar correcto y rodearme de las personas indicadas. Porque a pesar de los obstáculos siempre hubo alguien junto a mí para apoyarme.

A mis padres y a mi hermana por tener para mí en todo momento una palabra de aliento y un abrazo que demostraba un amor incondicional. Por todas las malas noches que pasaron a mi lado mientras yo hacía mis tareas y, sobre todo por enseñarme que todo en esta vida es pasajero excepto la huella que dejas en las personas que conoces.

Al Doctor Carlos Rodríguez Meza por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación. Grupo donde además de los lazos de trabajo entre tesistas y tutor, se crearon lazos de amistad y porque no decirlo de familia. Familia en donde aprendí a trabajar en equipo y en la cual entendí que la formación en la universidad va más allá de lo académico. Gracias Doc por haberse convertido en mi amigo, por siempre tener un consejo para los momentos difíciles y por la formación integral durante el tiempo que duró este estudio.

A Gabriel Curipallo por estar siempre pendiente del desarrollo del presente proyecto y, lo más importante por haberse convertido en un amigo incondicional. Amigo siempre llevaré en mi mente y en mi corazón.

A Diana que a pesar de los malos entendidos siempre estuvo ahí para ayudarme, por haber sido mi compañera durante el desarrollo de la tesis y ahora ser una de mis mejores amigas

Finalmente quiero agradecer a la Universidad Técnica de Ambato en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por acogerme en sus aulas y por darme la oportunidad de conocer personas excepcionales.

ÍNDICE GENERAL

A. Páginas preliminares

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
CERTIFICA:.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xii

B. Contenido

CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1. Generalidades.....	1
1.1.2. Principales grupo de bacterias con utilidad biotecnología.....	3
1.1.3. Taxonomía microbiana.....	6
1.2. Objetivos.....	14
1.2.1. Objetivo general.....	14
1.2.2. Objetivos específicos.....	14
CAPÍTULO II.....	15
METODOLOGÍA.....	15
2.1. Selección de la muestra.....	15

2.2. Caracterización fenotípica	15
2.2.1. Caracterización macroscópica	15
2.2.2. Caracterización microscópica	16
2.2.3. Pruebas fisiológicas	17
2.3. Caracterización molecular	21
2.3.1. Extracción y purificación del ADN	21
2.3.2. Determinación de la concentración del ADN	22
2.3.3. Box PCR	23
2.3.5. Secuenciamiento del ADNr 16S	24
2.4. Análisis de datos	24
2.4.1. Datos fenotípicos	24
2.4.2. Datos moleculares	24
2.4.3. Alineamiento y análisis filogenético	25
2.5. Hipótesis	25
2.5.1. Hipótesis nula	25
2.5.2. Hipótesis alternativa	25
2.5.3. Señalamiento de las variables de las hipótesis	25
CAPÍTULO III	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1. Análisis de resultados	26
3.1.1. Caracterización fenotípica	26
3.1.2. Caracterización molecular	32
3.1.3. Análisis filogenético y descripción taxonómica	34
3.1.4. Discusión general del trabajo	41
3.2. Verificación de las hipótesis	44
3.2.1. Hipótesis nula (<i>H</i>0)	44
3.2.2. Hipótesis alternativa (<i>H</i>a)	44

CAPÍTULO IV	45
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	45
4.1. Conclusiones.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS	57
Anexo A. Soluciones	57
Anexo B. Posibles bacterias degradadoras de materia orgánica	59
Anexo C. Posibles bacterias fijadoras de nitrógeno (FN)	70
Anexo D. Posibles bacterias entomopatógenas (E).....	77
Anexo E. Concentración e integridad del ADN	85
Anexo F. British Standard Specification of Colours for Identification Coding and Special Purpose	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de bacterias estudiados. _____	15
Tabla 2. Clasificación de las bacterias en base al crecimiento según el rango de pH. _____	18
Tabla 3. Clasificación de las bacterias en base a crecimiento en un rango de temperatura. _____	19
Tabla 4. Clasificación de bacterias en base a su tolerancia a la salinidad del medio. _____	19
Tabla 5. Receta de cultivo para producción de enzimas extracelulares. _____	20
Tabla 6. Receta medio de cultivo fuente única de carbono y nitrógeno. _____	20
Tabla 7. Componentes de la mezcla para la reacción BOX PCR. _____	23
Tabla 8. Condiciones de BOX PCR. _____	24
Tabla 9. Características macroscópicas de los grupos de bacterias estudiados. _____	27
Tabla 10. Características microscópicas de las bacterias por grupos de estudio. _____	28
Tabla 11. Características fisiológicas de las bacterias por grupos de estudio _____	30
Tabla 12. Porcentaje de similaridad y número de nucleótidos diferentes entre posibles bacterias entomopatógenas y varias especies del género <i>Bacillus</i> _____	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Matriz básica de datos. Tomada de: Crisci & López Armengol, 1983.....	7
Figura 2. Matrices de similaridad entre OTU's. Tomada de: Crisci & López Armengol, 1983.....	8
Figura 3. Coeficientes de similitud usados en las técnicas numéricas. Tomada de: Crisci & López Armengol, 1983.....	8
Figura 4. Forma, elevación y borde de las colonias bacterianas.....	16
Figura 5. Forma celular de bacterias	17
Figura 6. Dendrograma de datos fenotípicos de las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica.....	31
Figura 7. Dendrograma de datos fenotípicos de las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno.....	31
Figura 8. Dendrograma de datos fenotípicos de las posibles bacterias entomopatógenas.....	32
Figura 9. Dendrograma de los datos moleculares de las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica.....	33
Figura 10. Dendrograma de los datos moleculares de las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno.....	33
Figura 11. Dendrograma de los datos moleculares de las posibles bacterias entomopatógenas.....	34
Figura 12. Árbol filogenético de las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica.....	37
Figura 13. Árbol filogenético de las posibles bacteria fijadoras de nitrógeno.....	39
Figura 14. Árbol filogenético de las posibles bacterias entomopatógenas.....	41

RESUMEN

En el presente trabajo se clasificaron cuarenta y cuatro bacterias, las cuales fueron separadas en 3 grupos de interés según sus posibles usos en procesos de biotecnología vegetal. En el estudio fenotípico realizado de las cepas se obtuvieron datos de sus características macroscópicas, microscópicas y fisiológicas. Mediante observación directa de la colonia, tinciones, pruebas de resistencia a diferentes condiciones del medio y pruebas de uso de diferentes fuentes de carbono. En el estudio molecular las características se obtuvieron mediante la reacción BOX PCR de todas las cepas. Tanto las características fenotípicas como moleculares se analizaron mediante el coeficiente de Simple Similaridad (SSM) y el algoritmo UPGMA. Los grupos especie formados en este análisis ayudaron a seleccionar las cepas que se identificaron mediante el secuenciamiento del gen ADNr 16S. Para obtener la especie a la que pertenecía cada cepa se realizó el análisis filogenético en el programa PHYDIT, mediante el coeficiente de Jukes-Cantor y el algoritmo Neighbour joining para la obtención del árbol filogenético. A partir del cual se obtuvo un total de 16 especies diferentes, donde las pertenecientes al género *Bacillus* fueron las dominantes con un total de 11 especies. También se obtuvieron dos especies de *Enterobacter* y tan sólo una especie de *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Lysinibacillus*. Cabe recalcar que estas especies se encuentran distribuidas en los 3 grupos de interés demostrando la diversidad existente en la colección de bacterias utilizadas en el estudio.

Palabras claves: Bacterias, estudio fenotípico, estudio molecular, 16S, filogenia.

ABSTRACT

Forty-four bacteria were classified, which were separated into 3 groups of interest according to their possible uses in plant biotechnology processes. In the phenotypic study of the strains, data were obtained from their macroscopic, microscopic and physiological characteristics. By direct observation of the colony, stains, tests of resistance to different conditions of the medium and tests of use of different sources of carbon. In the molecular study the characteristics were obtained by the BOX PCR reaction of all the strains. Both, phenotypic and molecular characteristics were analyzed using the coefficient of Simple similarity (SSM) and the UPGMA algorithm. The species groups formed in this analysis helped to select the strains that were identified by sequencing the 16s rDNA gene. To obtain the species that belonged each strain was carried out the phylogenetic analysis in the program PHYDIT, using the coefficient of Jukes-Cantor and Neighbour joining algorithm to obtain the phylogenetic tree. From which a total of 16 different species were obtained, where those belonging to the genus *Bacillus* were the dominant ones with a total of 11 species. Two species of *Enterobacter* were also obtained and only one species of *Rhizobium*, *Pseudomonas* and *Lysinibacillus*. It should be emphasized that these species are distributed in the 3 groups of interest demonstrating the diversity existing in the collection of bacteria used in this study.

Keywords: Bacteria, phenotypic study, molecular study, 16S, phylogeny

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Generalidades

El término Biotecnología apareció en el año 1919. Fue acuñado por el agrónomo Karl Ereky, quién lo definió como “la ciencia de los métodos que permiten la obtención de productos a partir de materia prima, mediante la intervención de organismos vivos” (Thomson, 2010). En la actualidad la biotecnología se considera la aplicación que combina la ciencia y la ingeniería en el uso de organismos vivos, con o sin modificaciones, para la obtención de productos de utilidad para los humanos. De todos los seres vivos, los organismos más utilizados en biotecnología son los microbios, principalmente bacterias, hongos y actinomicetes (Guzmán, 2016).

Las bacterias son células procariotes con un tamaño que oscila entre 1 - 10µm de longitud y 0.5 - 2 µm de ancho. Estos organismos no tienen núcleo verdadero ni organelos membranosos internos, como mitocondrias o retículo endoplasmático (Montoya, 2008). El principal polisacárido de la pared celular es el peptidoglicano, a diferencia de la pared celular de las arqueas, que no contienen esta molécula, o de los eucariotes, en los que la celulosa, glucanos y quitina son los polisacáridos más frecuentes en la pared (Logan, 2009).

Morfológicamente, pueden presentar forma cocoide o bacilar, no obstante también es posible encontrar espiroquetas y bacterias formadoras de hifas. La motilidad ocurre debido a la presencia de flagelos que permiten que células y esporas puedan desplazarse en medios líquidos (Rogers, 2011). La diversidad de estos microorganismos no es solamente en forma sino que también cuentan con un metabolismo muy variad. Esto los hace sumamente importantes en investigaciones para el mejoramiento de procesos y para la obtención de nuevos productos biotecnológicos (Oren, 2010).

Además, en los últimos cinco años, el aislamiento y estudio de microorganismos, en especial de las bacterias ha aumentado, permitiendo su utilización en procesos biotecnológicos asociados al área agro-alimentaria y de biorremediación (**Guamán-Burneo et al., 2015**). Debido a que su uso va desde procesos intermedios para la obtención de productos hasta su aplicación *in situ* para la solución de problemas específicos (**Rosenberg, 2013**). Por ejemplo la utilización de microorganismos en los procesos de biorremediación y control de plagas, los cuales requieren que estos sean introducidos en el medio ambiente en donde se desea que trabajen. Por otra parte, se puede utilizar sólo las sustancias producidas por las bacterias, que gracias a sus características pueden ser empleadas como antibióticos, biofertilizantes o biopolímeros (**Anné, Economou, & Bernaerts, 2016**).

La mayoría de principios activos con interés biotecnológico se generan a partir de un metabolismo secundario, que aparece cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés. Este metabolismo favorece la producción de carbohidratos, lípidos, proteínas o vitaminas con potencial biotecnológico (**Pinu et al., 2018**). Muchas veces el estrés celular se produce por la disminución de nutrientes en el medio o porque el cultivo ha alcanzado su fase de latencia (**Rosenberg, 2013**). Para obtener el compuesto deseado es necesario conocer con exactitud la curva de crecimiento del microorganismo y, la fase en la que se produce el metabolito. (**Guzmán, 2016**). Además de la curva de crecimiento un estudio fenotípico de bacterias ayuda a identificar características importantes en el proceso de obtención de un nuevo producto biotecnológico. Por ejemplo las condiciones de crecimiento como pH o salinidad y, los compuestos que pueden utilizar como fuente de energía (**Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2011**).

Desde otra perspectiva la identificación de microorganismos por medio de herramientas de biología molecular, ha hecho que el tiempo y trabajo de obtención de nuevos productos biotecnológicos no sea tan extenso (**Nagarajan, Loh, & Swarup, 2013**). La mayoría de taxónomos bacterianos opta por el secuenciamiento del gen del ARNr 16S para identificar la especie y así definir de una forma más simple el estudio de la posible utilidad para los metabolitos producidos por el microorganismo, acortando tiempos de investigación y de esa manera ahorrando dinero (**Simpson, 2005**). El avance hacia técnicas de secuenciamiento más eficientes y de bajo costo (**Nagarajan**

et al., 2013) ha permitido el secuenciamiento completo de genomas microbianos, desarrollando rápidamente el campo de la genómica con el objetivo de encontrar vías metabólicas completas para la síntesis de compuestos bioactivos de interés comercial **(Thompson et al., 2013)**.

En el presente trabajo se usarán herramientas de biología molecular como la base para la identificación de microorganismos a nivel de especie. Esta se realizará usando la herramienta de secuenciamiento del gen del ADNr 16S. Con el conocimiento de las especies se podrá establecer la diversidad existente dentro del grupo de bacterias estudiado. Además las herramientas de biología molecular podrían ayudar a disminuir el tiempo de estudio de las bacterias y así acortar el tiempo que lleva la obtención de un posible producto biotecnológico. Estudios como estos se deben realizar de una forma más continua en Ecuador por ser considerado una de las regiones más biodiversas del mundo, con el fin de eliminar en cierto porcentaje la dependencia biotecnología que Ecuador presenta con países de América del Norte o de la Unión Europea.

1.1.2. Principales grupo de bacterias con utilidad biotecnología

1.1.2.1. Control de enfermedades

El crecimiento desmedido de la población y el uso indiscriminado de medicamentos, como los antibióticos, en el control de enfermedades ha hecho que la mayoría de patógenos adquieran un mecanismo de resistencia **(Kaplan, 2004)**. Esta capacidad adquirida por ciertos microorganismos ha provocado que la biotecnología microbiana conjuntamente con la farmacología centren sus esfuerzos en la búsqueda de nuevos antibióticos, ya sea a partir de bacterias aisladas de suelos u obtenidas de tejidos vegetales **(Ambrose, Varghese, & Subhash J, 2013)**.

La capacidad de los microorganismos endófitos para generar en las plantas resistencia a los patógenos, mediante la producción de metabolitos secundarios, hace que sean candidatos idóneos para la producción de nuevos compuestos bioactivos con características antimicrobianas. El potencial biotecnológico de este tipo de microorganismos se demuestra con la obtención de antibióticos como las ecomicinas, que se obtienen de *Pseudomonas viridiflava*, bacteria aislada de la planta *Lactuca*

sativa (lechuga). La ecomicina es efectiva para inhibir el crecimiento de patógenos humanos como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. Mas, este antibiótico no es el único que se ha obtenido de microorganismo endófitos, así las pseudomicinas se obtienen de un endófito conocido como *Pseudomonas syringae*, aislada de *Nicotiana benthamiana*, con actividad antifúngica (**Ambrose et al., 2013**).

Los microorganismos endófitos no son la única fuente de nuevos compuestos bioactivos, las bacterias aisladas de suelos también tienen esta capacidad de producir metabolitos secundarios con efectos antimicrobianos. Por ejemplo los antibióticos que se obtienen a partir de cepas de *Bacillus*, con acción inhibitoria para patógenos de humanos, animales o plantas (**Amin, Rakhisi, & Zarei, 2015**). Así para el control de enfermedades en plantas el microorganismo más usado es *Bacillus subtilis*, que además de inhibir la infección fúngica induce resistencia ante los nemátodos que dañan la raíz (**Adam, Heuer, & Hallmann, 2014**).

1.1.2.2. Control de plagas

Las plagas son un problema común en la producción agrícola. Su control implica el uso de un gran número de compuestos químicos, los cuales afectan a la biodiversidad del medio ambiente (**Bourguet & Guillemaud, 2016**). Por esta razón el uso de compuestos biológicos hace que el control sea en muchos casos más efectivo, ya que los microorganismos se aíslan de hábitats con condiciones similares a las que se desarrollan los insectos (**Hidalgo, 2001**).

Los insectos que más daño causan en los cultivos son los escarabeidos en especial *Pgyllophaga* spp el cual ataca a las raíces de las gramíneas en la etapa larvaria y, a las flores u hojas en su etapa adulta. Para evitar la proliferación de este escarabajo se han encontrado varios géneros de bacterias patógenas como *Bacillus*, *Micrococcus* y *Serratia*. (**Hidalgo, 2001**). Sin embargo, el control de plagas no se hace de una forma focalizada para cada tipo de insecto, ya que existen bacterias usadas para el control de insectos en general, como *B. thuringiensis*. Un microorganismo que produce más de 200 tipos de toxinas en forma de inclusiones cristalinas en el citoplasma, que provocan una lisis celular en el intestino de los insectos (**Ibarra et al., 2006**). También se encuentra *Lysinibacillus sphaericus* que produce una toxina similar a la de *B.*

thuringiensis, no obstante se usa específicamente para el control de mosquitos (**Ruiu & Luca, 2015**).

1.1.2.3. Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes en la atmósfera, sin embargo, los animales, las plantas o los seres humanos no pueden tomarlo directamente del medio ambiente. Por esta razón el nitrógeno necesita pasar por un proceso de fijación, que se realiza en mayor parte por microorganismos de vida libre o que viven en simbiosis con las plantas. (**Flores, González, Aguilar, & Rodríguez, 2014**).

La fijación en simbiosis se realiza principalmente por dos grandes grupos de bacterias, *Rhizobium* que se asocia específicamente con plantas que pertenecen a la familia de las leguminosas y, *Frankia*. Esta última cuenta con un proceso de simbiosis menos selectivo lo que la hace idónea para varios tipos de cultivos (**Hirsch, 2002**). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la bacteria fijadora de nitrógeno en simbiosis más importante es *Rhizobium*. (**Sivasakthi, Usharani, & Saranraj, 2014**).

Desde otra perspectiva, existen bacterias de vida libre que realizan este proceso de fijación de nitrógeno y, aunque el rendimiento del proceso sea menor con relación a las bacterias simbióticas estos microorganismos son usados en muchos casos como biofertilizantes no específicos. En la industria agrícola el microorganismo más usado es *Azotobacter*, porque aumenta la concentración de nitrógeno en la rizosfera del suelo y estimula la producción de ácido indol-acético (IAA) en la planta (**Flores et al., 2014**).

1.1.2.4. Biorremediación

El aumento en la concentración de los contaminantes en el agua, aire y suelo, es un problema creciente a nivel global. Los métodos que se usan actualmente para el control de dicha contaminación no logran eliminar en su totalidad el compuesto dañino y, en muchos casos se obtienen residuos más peligrosos (**Whitacre, 2015**). La utilización de compuestos tóxicos por ciertos microorganismos hace que sean una opción viable para la eliminación de la mayoría de contaminantes, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) o los metales pesados (S.-H. Liu et al., 2017). Los HAP's son compuestos químicos de alto riesgo que se desprenden de procesos de

combustión incompleta o minería con características teratogénicas, carcinógenas y mutanógenas. El uso de *Arthobacter* antes de eliminar estos compuestos ayuda a degradarlos hasta en un 75% (S.-H. Liu et al., 2017).

Desde otra perspectiva, es importante controlar también la emanación de metales pesados como el selenio (Se), que se desprende de procesos de combustión de carbón y se acumula en la atmósfera. Para controlar la emanación de este compuesto se usa *Pseudomonas* sp inmovilizada en una membrana ubicada en la chimenea de salida. Estas bacterias se encargan de eliminar el Se hasta en un 80% (Nancharaiah & Lens, 2015). También el Azufre (S) es un contaminante atmosférico grave, ya que en grandes cantidades provoca lluvia ácida. Se elimina de procesos de minería y de curtiembres, donde se utilizan bacterias del género *Desulfobacterium* *Desulfotomaculum* o *Desulfoviobrio* que transforman el azufre a sulfatos o sulfitos que se tratan y eliminan posteriormente (Pokorna & Jana, 2015).

1.1.3. Taxonomía microbiana

La taxonomía es una ciencia creada por los biólogos para distinguir a los diferentes organismos existentes en el planeta, desde organismos superiores hasta microorganismos. Se refiere a la clasificación y organización de estos basándose en la afinidad natural (Montoya, 1997).

La taxonomía microbiana se ha basado por mucho tiempo en los sistemas jerárquicos que utilizó Linneo para desarrollar su nomenclatura. Existen siete niveles jerárquicos para la taxonomía microbiana, en donde el nivel más alto es el reino y, los más bajos son género y especie (Caumette, Brochier-Armanet, & Normand, 2015). Según la nomenclatura descrita por Linneo el género debe escribirse con la primera letra en mayúscula, seguido por la especie escrita totalmente en minúscula y, ambas deben estar en letra *cursiva* (Kotyk, 1999).

Para llegar a esta descripción de género o especie de un microorganismo es necesario realizar un estudio de las características metabólicas, fenotípicas y moleculares que posee (Caumette et al., 2015). Sin embargo, las nuevas técnicas moleculares y el desarrollo de la genómica revolucionaron la taxonomía microbiana, disminuyendo el tiempo necesario para la identificación de microorganismos mediante el uso de

herramientas como el secuenciamiento completo del genoma y, el secuenciamiento del ADN_r 16S (Thompson et al., 2015).

1.1.3.1. Taxonomía fenética

La taxonomía fenética se encarga del estudio de las características morfológicas y fisiológicas de los microorganismos. Las pruebas más comunes en este tipo de estudio son sobre las condiciones de crecimiento como pH, salinidad, temperatura y uso de una fuente única de carbono o nitrógeno. En muchos casos también se estudian características como producción de catalasa o producción de compuestos con capacidad antimicrobiana (Austin, 2011). Los resultados de estas pruebas se analizan usando métodos numéricos aplicados a taxonomía (Sneath, 2001).

La taxonomía numérica fue desarrollada a finales de los años 50, con el fin de disminuir el problema del manejo de datos obtenidos en diferentes pruebas, especialmente en bacteriología, ya que se obtienen varias tablas de diferentes tipos de características (Sneath, 2001). Estas técnicas numéricas son un sistema útil para la clasificación de organismos, por ser un análisis rápido y sensible, aún con un grupo extenso de muestras (Vilaseca, Mas, & Hernandez, 2012).

Las muestras usadas en taxonomía numérica son conocidas como unidades taxonómicas operativas (OTU's). Para la clasificación de las OTU's se deben seguir cuatro pasos elementales, elegir las OTU's que se quieren estudiar, seleccionar los caracteres que las describen, construir una matriz básica de datos (Figura 1) y, obtener el coeficiente de similitud por cada par de OTU's. (Crisci & López Armengol, 1983).

M.B.D.		Caracteres					
		1	2	3	•	•	n
OTU	1	x_{11}	x_{21}	x_{31}	•	•	x_{n1}
	2	x_{12}	x_{22}	x_{32}	•	•	x_{n2}
	3	x_{13}	x_{23}	x_{33}	•	•	x_{n3}
	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•
t	x_{1t}	x_{2t}	x_{3t}	•	•	x_{nt}	

Figura 1 Matriz básica de datos. Tomada de: Crisci & López Armengol, 1983

Para crear una matriz de datos se deben seleccionar los mismos caracteres para todas las OTU's del estudio y, estos deben estar reportados en código binario. Además el número de caracteres a estudiarse debe ser de 50 o más para tener grupos taxonómicos representativos (Sneath, 2001).

El coeficiente de similitud se obtiene de la comparación de un carácter doble estado, presencia (1) / ausencia (0), entre dos OTU's. Con esta comparación se obtienen cuatro matrices, que se muestran en la Figura 2 (Crisci & López Armengol, 1983).

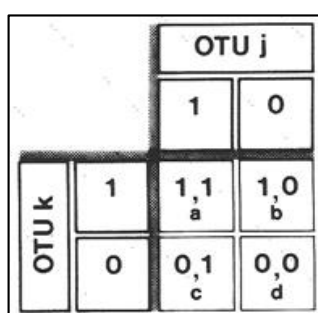


Figura 2. Matrices de similitud entre OTU's. Tomada de: Crisci & López Armengol, 1983

Para el análisis de las matrices de similitud se usan diferentes tipos de coeficientes, en taxonomía microbiana los más usados son los de asociación. Estos miden las coincidencias y diferencias en los caracteres estudiados de las OTU's (Crisci & López Armengol, 1983).

TIPO DE COEFICIENTE	NOMBRE	FORMULA	TIPO DE DATOS SOBRE LOS QUE SE APLICA	MAXIMA SIMILITUD	MINIMA SIMILITUD
DISTANCIA	Mean character difference	$\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_{ij} - X_{ik} $	Doble - estado	0	∞
	Manhattan distance	$\sum_{i=1}^n X_{ij} - X_{ik} $	Multiestados		
	Taxonomic distance	$\left[\sum_{i=1}^n (X_{ij} - X_{ik})^2 \right]^{1/2}$	Mixtos		
CORRELACION	Momento-producto de Pearson	$\frac{\sum_{i=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_j)(X_{ik} - \bar{X}_k)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_j)^2 \sum_{i=1}^n (X_{ik} - \bar{X}_k)^2}}$	Multiestados cuantitativos Mixtos (Con predominancia de multiestados cuantitativos)	1	-1
ASOCIACION	Simple matching	$\frac{a + d}{a + b + c + d}$	Doble - estado	1	0
	Jaccard	$\frac{a}{a + b + c}$			
	Rogers y Tanimoto	$\frac{a + d}{a + (2b) + (2c) + d}$			
	Dice	$\frac{2a}{2a + b + c}$			
	Sokal y Sneath	$\frac{2(a + d)}{2(a + d) + b + c}$			
	Hamann	$\frac{(a + d) - (b + c)}{a + b + c + d}$		1	-1

Figura 3. Coeficientes de similitud usados en las técnicas numéricas. Tomada de: Crisci & López Armengol, 1983

Los coeficientes de asociación más usados son el de Simple Similaridad (SMS) y el de Jaccard (CAJ). Las fórmulas de cada uno se encuentran en la Figura 3, cabe recalcar que Jaccard descarta la matriz d de similaridad, por ser la que contiene las características que no se presentan en el par de OTU's estudiadas (**Crisci & López Armengol, 1983**).

Los valores que se obtienen para la matriz de similaridad se deben reportar en forma de porcentaje. Esta forma de presentación de los datos ayuda a revelar la estructura taxonómica de la matriz, mediante un análisis de conglomerados que da como resultado un dendrograma, en donde, las ramas más cercanas forman un grupo taxonómico (**Sneath, 2001**).

1.1.3.2. Taxonomía molecular

La taxonomía molecular o genética consiste en la clasificación de los microorganismos a partir de las características de sus biomoléculas, en especial a partir de los ácidos nucleicos. Los estudios moleculares tienen una ventaja sobre la taxonomía fenética por ser más específicos y sensibles (**Thompson et al., 2015**). Adicionalmente los resultados que se obtienen en un análisis molecular, no se encuentran influenciados por los cambios en las condiciones de los cultivos (**Pukall, 2006**).

Dentro del análisis molecular se usan varios métodos, algunos sólo brindan información general sobre el genoma, como por ejemplo el contenido de guanina + citosina en el ADN. Por esta razón éste parámetro no es usado para la identificación de microorganismos, ya que es posible que dos individuos completamente diferentes, compartan el mismo porcentaje (**Thompson et al., 2013**). Realmente, el procedimiento que está revolucionando la taxonomía microbiana es el secuenciamiento de nucleótidos. Este otorga información sobre el ordenamiento de las bases en el genoma total del microorganismo o en una sección (**Thompson et al., 2013**). La sección del ADN más usada en taxonomía bacteriana es la del gen que codifica para el ARNr 16S (**Thompson et al., 2015**).

Aislamiento y Purificación de ADN bacteriano

El ADN es la biomolécula más importante de todos los organismos vivos, porque contiene todas las características que los definen (**Hinke, 2003**). Por esta razón su aislamiento y estudio en la actualidad son parte fundamental de la taxonomía, en especial en taxonomía microbiana (**Kämpfer & Glaeser, 2012**).

El aislamiento y purificación del ADN se realizan tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la molécula. Siendo la más importante su carga negativa, que le otorga una característica polar (**Hinke, 2003**). Uno de los métodos que más se usa en el área microbiológica es la extracción mediante el protocolo de fenol-cloroformo (**Velázquez, Aragón, & Romero, 2012**).

Sin embargo, actualmente se han identificado procedimientos más eficientes en cuanto a tiempo de extracción y a la calidad del ADN obtenido. Por ejemplo el método modificado del clásico fenol-cloroformo, que disminuye el tiempo de extracción de 6 horas a aproximadamente 50 minutos. Esto se consiguió cambiando pasos esenciales en el proceso por ejemplo usando fenol en la lisis celular, eliminando el paso de precipitación del ADN con alcohol absoluto y los lavados posteriores con alcohol al 70%. Sin estos pasos no es necesaria la espera de 4 horas para resuspender el ADN (**Cheng & Jiang, 2006**).

Para conocer la calidad del ADN extraído se realiza una electroforesis en gel de agarosa, esta técnica permite la separación de fragmentos de ADN y ARN según su tamaño (**Fierro, 2012**). Para la observación del ADN genómico se usa comúnmente un gel de agarosa al 1% (**Velázquez et al., 2012**) mientras que el producto PCR se observa generalmente en un gel de agarosa al 1.28% (**Schneider & de Bruijn, 1996**).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de fingerprinting

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica con alta especificidad y sensibilidad, que permite la amplificación de un segmento específico del ADN. Para que este proceso se dé se usan dos oligonucleótidos conocidos como primers, que reconocen la secuencia complementaria a la suya en el ADN. Estos se unen a la

muestra y son alargados cíclicamente por la enzima Taq Polimerasa, aislada del microorganismo *Thermus aquaticus* (**Pedrosa, 1999**).

Las secciones del ADN que brindan más información sobre la diversidad microbiana son los segmentos conocidos como polimorfismos, que se presentan como huellas digitales que de cada individuo. Estos segmentos se obtienen a través de una técnica conocida como fingerprinting (**Pukall, 2006**) y, los más usados son los que se explican a continuación.

REP

La Secuencia Palindrómica Repetitiva o REP fue detectada por primera vez en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* y, es la técnica más usada para la identificación de bacterias Gram negativas (**Pukall, 2006**). Para este proceso de amplificación se usan primers, que dan como resultado fragmentos que tienen una extensión de 35 a 38 nucleótidos. Con una región central variable de 5bp (**Stern, Ames, Smith, Robinson, & Higgins, 1984**).

ERIC

Las Secuencias Consenso Intergénicas Repetitivas Enterobacterianas o ERIC generan fragmentos de ADN diferenciables entre cada individuo. Es usada comúnmente para la caracterización molecular de bacterias Gram positivas (**Wei, Pan, Du, Chen, & Zhao, 2004**). Las secuencias obtenidas tienen una longitud de 126 bp y, contiene una repetición central altamente conservada. (**Pukall, 2006**).

BOX

Los Compuestos Repetitivos Intercalados o BOX se caracterizaron por primera vez en *Streptococcus pneumoniae*. Esta técnica de fingerprinting usa un primer compuesto por varias combinaciones de 3 subunidades boxA con un tamaño de 59 nucleótidos, boxB con 45 nucleótidos y boxC con 50 nucleótidos (**Ko euth, Versalovic, & Lupski, 1995**). Está localizado en las regiones intergénicas del ADN y las secuencias que amplifica son distintas a REP y ERIC. Esta técnica molecular es usada para la identificación de bacterias Gram negativas y Gram positivas (**Pukall, 2006**).

Análisis filogenético

Filogenia

La palabra filogenia viene del griego *phyton* que significa tribu y *génesis* que significa origen, es decir, que busca construir la historia evolutiva de una especie buscando un ancestro común. Para deducir la filogenia de una especie se comparan todas las características encontradas de un organismo, con las características de otro organismo ya conocido (**Campbell, Urry, & Reece, 2007a**).

La determinación de la filogenia de los organismos se puede realizar usando tres metodologías. La metodología fenética, que considera la similitud global de los caracteres fenotípicos como el mejor criterio de parentesco. La cladista o filética, que se basa en la propiedad de compartir caracteres heredados (genes). Y finalmente la metodología basada en la evolución, que reconstruye la filogenia de un organismo usando tanto los datos fenotípicos como los moleculares (**Aguirre, 1989**). En la actualidad el análisis filogénico de bacterias se basa en el secuenciamiento del ADNr 16S. Esta información es importante porque gracias a las regiones conservadas del gen se puede realizar la comparación del microorganismo estudiado con uno ya existente. (**Lloret & Martínez, 2005**).

PCR 16S

El PCR 16S se basa en la amplificación del gen *rrs* que codifica para el ARNr 16s, un polirribonucleótido formado por 1500 bp. La variabilidad de esta molécula permite diferenciar las especies de los microorganismos estudiados, a través del secuenciamiento del producto PCR (**Valenzuela-Gonzalez et al., 2015**).

Las técnicas de secuenciamiento han demostrado que el ARNr 16S cuenta con dos regiones, así las regiones conservadas permiten el diseño de primers para la técnica de PCR y las regiones hipervariables otorgan información sobre el microorganismo, para filogenia o taxonomía (**Valenzuela-Gonzalez et al., 2015**). Las ventajas de trabajar con este gen son varias, por ejemplo la abundancia de datos en bases de acceso público y la estabilidad del producto génico obtenido (**Caumette et al., 2015**).

Métodos de Inferencia Filogenética

Estos métodos permiten inferir las relaciones filogenéticas de los organismos, es decir, la distancia evolutiva y la relación con un ancestro común. (Peña, 2011). La mayoría de taxónomos bacterianos optan por el uso de los métodos de distancia, entre ellos el más usado es Neighbour-joining. Este algoritmo es computacionalmente rápido y los árboles que se obtienen son razonables, la longitud de las ramas del árbol determinan el parentesco evolutivo de las especies que se estudian (Yang, 2006).

En ocasiones junto con este método se utiliza el algoritmo desarrollado por *Jukes-Cantor*, que describe un solo sitio de alineación de secuencias de ADN. Adicionalmente es el más usado en los procesos de análisis moleculares de especies (Higgs, Attwood; 2009).

Árboles filogenéticos

Son una representación de las relaciones genealógicas entre especies, genes, poblaciones o individuos (Yang, 2006). El objetivo de los árboles filogenéticos es la identificación de un ancestro común para los microorganismos estudiados, se pueden realizar dos tipos de árboles. Sin embargo, los más comunes son los filogramas, en donde la longitud de la rama refleja el número de cambios que ha sufrido una secuencia de ADN en ese linaje (Campbell, Urry, & Reece, 2007b).

1.1.3.3. Taxonomía polifásica

El término de taxonomía polifásica fue introducido por Cowell en 1970. Es usado para referir a la taxonomía que abarca varios niveles de información desde la fenotípica y ecológica, hasta la molecular (Martínez, Infante, & Peteira, 2015). Las características moleculares van de la mano con las características fenotípicas y cabe recalcar que la taxonomía polifásica es la forma más obvia de obtener la máxima cantidad de información del genoma del microorganismo sin realizar un secuenciamiento completo (Gillis, Vandamme, De Vos, Swings, & Kersters, 2005).

Este tipo de taxonomía sigue reglas fundamentales, los valores de DDH (hibridación del ADN) deben ser de al menos el 70% de similitud, las secuencias del gen ARNr 16S debe tener al menos el 98% de la similitud, la diferencia máxima del intervalo G

+ C debe ser del 2% y, finalmente se deben diferenciar todas las características fenotípicas de los microorganismos a estudiarse (**Thompson et al., 2015**).

Desde otra perspectiva, en la actualidad algunos grupos de investigación consideran que el secuenciamiento del genoma es la forma más rápida de obtener información sobre una especie, sin realizar largas pruebas de laboratorio. Ya que con la información obtenida se identificarían genes específicos característicos de la especie y por ende se pueden identificar las características fenotípicas y metabólicas (**Thompson et al., 2015**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Identificar y clasificar bacterias útiles en biotecnología utilizando herramientas de taxonomía polifásica.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar la diversidad fenotípica de tres grupos de bacterias.
- Caracterizar e identificar molecularmente las bacterias.
- Establecer las relaciones filogenéticas de las bacterias identificadas

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Selección de la muestra

Se trabajó con tres grupos de bacterias con potencial biotecnológico. Los grupos y las bacterias de cada uno se muestran en el Tabla 1, las bacterias de la colección fueron aisladas de una muestra de suelo de jardín de la ciudad de Ambato.

Tabla 1. Grupos de bacterias estudiados.

<i>Grupo</i>	<i>Bacterias dentro del grupo (Desde – Hasta)</i>
Posibles degradadoras de materia orgánica (22 bacterias)	EG-001 EG-002 EG-003 EG-004 EG-005 EG-006 EG-007 EG-008 EG-009 EG-010 EG-011 EG-015 EG-016 EG-017 EG-018 EG-019 EG-020 EG-021 EG-022 EG-023 EG-024 EG-025
Posibles fijadoras de nitrógeno (12 bacterias)	EG-026 EG-027 EG-028 EG-029 EG-030 EG-031 EG-032 EG-033 EG-034 EG-035 EG-036 EG-037
Posibles entomopatógenas (10 bacterias)	EG-012 EG-013 EG-014 EG-015 EG-038 EG-039 EG-040 EG-041 EG-042 EG-043 EG-044

2.2. Caracterización fenotípica

2.2.1. Caracterización macroscópica

Se realizaron cultivos puros en estría compuesta en platos con agar nutritivo y, después de 24 horas se escogió una colonia individual de cada cepa. De estas colonias se observaron las características que se muestran en la Figura 4. El color de la colonia se anotó basándose en una tabla estándar de color (British Standard Specification of Colours for Identification Coding and Special Purposes, Anexo F).

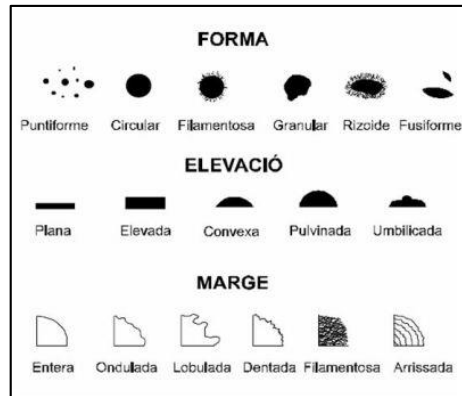


Figura 4. Forma, elevación y borde de las colonias bacterianas.

2.2.2. Caracterización microscópica

Se utilizó los cultivos puros de la caracterización macroscópica y se hizo dos tipos de frotis, uno con fijación en calor y otro simple. En el caso de ambos tipos de frotis se colocó una gota de agua destilada sobre un portaobjetos limpio, después con un asa de transferencia estéril se tomó una pequeña cantidad de biomasa y se mezcló con el agua destilada. Para el frotis con fijación en calor el portaobjetos se dejó reposar por aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente y se realizó la fijación con la ayuda del mechero. Mientras que para el frotis simple la muestra sólo se dejó secar a temperatura ambiente. Cabe recalcar que en ambos casos se esperó que el frotis esté completamente seco antes de empezar el proceso de tinción.

2.2.2.1. Tinción de Gram

La tinción de Gram, ayudó a la identificación de la forma celular (Figura 5) y el tipo de bacteria. Para ello, se usaron el frotis con fijación en calor que se tiñeron con cristal violeta por un minuto y luego fueron lavados con agua destilada. Seguido se cubrió las muestras con una solución de lugol por un minuto y se lavó nuevamente con agua destilada. Para desteñir las células se usó alcohol al 95% por 30 segundos y finalmente safranina por un minuto. Antes de observar en el microscopio con el lente de inmersión (100X) se dejó secar al ambiente. Las bacterias Gram negativas se observaron de color rojo mientras que, las Gram positivas tuvieron color azul-violeta.

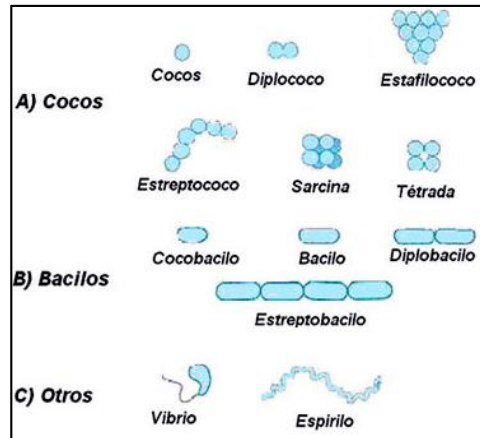


Figura 5. Forma celular de bacterias

2.2.2.2. Tinción de endosporas

La tinción de endosporas se realizó para identificar la presencia de estructuras de resistencia a condiciones extremas del medio. Para ello, se usó un frotis con fijación en calor y, posteriormente se pusieron las muestras al vapor con abundante verde malaquita durante diez minutos (evitando que el pigmento se seque). Pasado este tiempo se lavó la muestra con agua destilada y se tiñó con safranina por un minuto. Las muestras se secaron al ambiente y se observaron en el microscopio con el lente de inmersión (100X). Las endosporas se presentaron en un extremo de la célula teñidas de verde malaquita mientras que la célula estuvo teñida con safranina.

2.2.2.3. Tinción de cápsulas

En el proceso de tinción de cápsulas se usó un frotis simple y se colocó safranina por un minuto. Después la muestra se lavó con sulfato de cobre. Una vez seca se observó en el microscopio con el lente de inmersión. Las cápsulas se presentarán como una sombra transparente alrededor de la célula teñida con safranina.

2.2.3. Pruebas fisiológicas

Para realizar este ensayo se conservaron las bacterias en agua de llave estéril, en tubos de centrifugación de 1.5 mL. En el medio de cultivo se inocularon 5 μ L de cada suspensión de bacterias. El número de bacterias inoculadas por caja fue de 15 y este proceso se llevó a cabo con la ayuda de una plantilla. El tiempo de incubación para cada una de las pruebas fue de 3 - 5 días.

2.2.3.1. Condiciones de pH

Se realizó estas pruebas para la identificación de bacterias en base a las características descritas en la Tabla 2. Se prepararon botellas de agar nutritivo con diferentes valores de pH, para ello se utilizó un buffer tampón para cada pH requerido desde 3.5 hasta 9.5 (Tabla A1, Anexo A). Las cajas se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento (28°C) y se evaluó el crecimiento microbiano en código binario, si la bacteria presentó crecimiento en el medio se asignó 1, por el contrario, cuando no hubo crecimiento se asignó el valor de 0.

Tabla 2. Clasificación de las bacterias en base al crecimiento según el rango de pH.

<i>Clasificación</i>	<i>Rango de pH</i>				
	<i>4.5</i>	<i>5.5</i>	<i>6.5</i>	<i>7.5</i>	<i>8.5</i>
Acidófila	+	+	-	-	-
Neutrotolerante	+	+	+	-	-
Neutrotolerante	+	+	+	+	-
Neutrófilo	-	+	+	+	-
Neutrófilo	-	-	+	+	-
Neutrófilo	-	-	+	-	-
Alcalitolerante	-	+	+	+	+
Alcalitolerante	-	-	+	+	+
Alcalófilo	-	-	-	+	+

Fuente: (Garzón, 2013)

2.2.3.2. Condiciones de temperatura

Se preparó agar nutritivo y las cajas se incubaron a temperaturas de 4°C, 28°C, 37°C y 55°C. Se evaluó el crecimiento bacteriano en código binario, donde 1 es positivo (la bacteria creció en el medio) y 0 es negativo (la bacteria no creció en el medio). Las bacterias se clasificaron en base a la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de las bacterias en base a crecimiento en un rango de temperatura.

<i>Clasificación</i>	<i>Rango de temperatura (°C)</i>			
	<i>4</i>	<i>28</i>	<i>37</i>	<i>55</i>
Mesófilo extremo	+	+	+	+
Mesófilo	+	+	+	-
Psicrótrofo	+	+	-	-
Psicrófilo	+	-	-	-

Fuente: (Garzón, 2013)

2.2.3.3. Salinidad

Para realizar las pruebas de salinidad se preparó agar nutritivo con concentraciones distintas, para esto se pesaron los gramos de sal necesarios para obtener una concentración en el medio de 1, 2, 5, 10 y 15 por ciento (w/v). Las cajas usadas en la prueba se incubaron a temperatura óptima y pasado el tiempo de incubación se evaluó el crecimiento microbiano en código binario, si la bacteria presentó crecimiento en el medio se asignó 1, por el contrario, cuando no hubo crecimiento se asignó el valor de 0. Las bacterias se clasificaron según la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de bacterias en base a su tolerancia a la salinidad del medio.

<i>Clasificación</i>	<i>Concentración de salinidad (% p/v)</i>			
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>10</i>
Halófilo débil	+	+	-	-
Halófilo	+	+	+	-
Halófilo extremo	+	+	+	+

Fuente: (Garzón, 2013)

2.2.3.4. Producción de enzimas extracelulares

Para la prueba de producción de enzimas extracelulares se utilizó agar nutritivo suplementado con celulosa, almidón y quitina (Tabla 5). Terminado el tiempo de incubación se evaluó colocando 3 ml de lugol en el medio de cultivo. Para la prueba positiva se observó la formación de halos alrededor de las colonias que estaban produciendo enzimas que degradan el suplemento del medio. Se evaluó esta prueba en código binario, donde 1 denota la presencia del halo y 0 la ausencia.

Tabla 5. Receta de cultivo para producción de enzimas extracelulares.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
Fuente de Carbono	1 g
Agar Nutriente	23 g
Agua	1000 ml

2.2.3.5. Fuente única de carbono y nitrógeno

Para esta prueba se usaron 13 aminoácidos: treonina, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, tirosina, aspargina, valina, lisina, leucina, alanina, histidina, arginina, cisteína (Tabla 6). Estos aminoácidos sirvieron como fuente de carbono y nitrógeno para el microorganismo. En la prueba se evaluó el crecimiento microbiano en código binario, si la bacteria presentó crecimiento en el medio se asignó 1, por el contrario, cuando no hubo crecimiento se asignó el valor de 0.

Tabla 6. Receta medio de cultivo fuente única de carbono y nitrógeno.

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad</i>
Fuente de Nitrógeno y/o Carbono	1 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
Sales Traza	1 ml
Agar	15 g
Agua	1000 ml

El control para las pruebas fenotípicas se inoculó en agar nutritivo con un pH neutro y se incubó a 28 °C por 3 días.

2.3. Caracterización molecular

2.3.1. Extracción y purificación del ADN

2.3.1.1. Bacterias Gram negativas

Se repicaron las cepas en cajas mono-Petri realizando estría compuesta y se dejaron crecer por 4 días a una temperatura de 28°C. Pasado este tiempo se tomó la biomasa existente con la ayuda de un asa de transferencia y se colocó en un tubo de centrifugación que contenía 0.05 g de perlas de vidrio y 450 µL de buffer de extracción (Tabla A2, Anexo A). Esta mezcla se dejó en congelamiento por 24 horas.

Terminado el tiempo de congelamiento se agitó en un vortex por 5 minutos a máxima velocidad, se consiguió una mezcla entre el buffer de extracción y la biomasa. Para separar esta suspensión se centrifugó por 20 minutos a 13.300 g, del sobrenadante obtenido se transfirieron 200 µL a un nuevo tubo de centrifugación. A este sobrenadante se añadieron 200 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó hasta conseguir una solución homogénea. Esta se centrifugó por 15 minutos a máxima velocidad, se obtuvieron dos fases, una acuosa y una fenólica. Se tomaron 150 µL de la fase acuosa y se transfirieron a un nuevo tubo de centrifugación.

Se añadieron 300 µL de etanol absoluto frío y, se centrifugó por 20 minutos (velocidad máxima) para precipitar el ADN. Terminada la centrifugación se descartó todo el sobrenadante del tubo cuidadosamente para evitar que el ADN presente salga. En el tubo de centrifugación ya vacío se colocaron 500 µL de etanol al 70% y se centrifugaron por 15 minutos, se descartó nuevamente el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 2 veces. Después de los dos lavados los tubos se dejaron abiertos boca abajo sobre una toalla de papel por 4 horas para que el etanol se evapore por completo. Pasado este tiempo se resuspendió el ADN en 40 µL de buffer TE 1X (Tabla A3, Anexo A).

2.3.1.2. Bacterias Gram positivas

Se repicaron las cepas en cajas mono-Petri realizando estría compuesta y se dejaron crecer a 28°C por 3 días. Pasado este tiempo se colocó 750 µL de buffer de extracción (Tabla A2, Anexo A) sobre el medio de cultivo y se raspó la biomasa existente con la ayuda de un asa de transferencia. Se tomó 500 µL de la suspensión y se transfirieron a

un tubo de centrifugación conjuntamente con 0.05 g de perlas de vidrio. Esta mezcla se dejó en congelamiento por 24 horas.

Pasado el tiempo de congelamiento se incubó los tubos a 60°C por 10 minutos y posteriormente se refrigeraron a 4°C por media hora. Los tubos ya refrigerados se agitaron con la ayuda de un vortex por 8 minutos a máxima velocidad, este movimiento formó una mezcla homogénea la cual se transfirió a un nuevo tubo de centrifugación. A la mezcla se añadió el equivalente al 6% (v/v) de SDS, es decir, 30 µL y se incubó a 37°C por 15min.

Terminado el tiempo de incubación se centrifugó por 20min a velocidad máxima, del sobrenadante obtenido se transfirieron 200 µL a un nuevo tubo de centrifugación. A este sobrenadante se añadieron 200 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó hasta conseguir una solución homogénea. Esta se centrifugó por 15 minutos a máxima velocidad, se obtuvieron dos fases, una acuosa y una fenólica. Se tomaron 150 µL de la fase acuosa y se transfirieron a un nuevo tubo de centrifugación.

Se añadieron 300 µL de etanol absoluto frío y, se centrifugó por 20 minutos (velocidad máxima) para precipitar el ADN. Terminada la centrifugación se descartó todo el sobrenadante del tubo cuidadosamente para evitar que el ADN presente salga. En el tubo de centrifugación ya vacío se colocó 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó por 15 minutos, se descartó nuevamente el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 2 veces. Después de los dos lavados los tubos se dejaron abiertos boca abajo sobre una toalla de papel por 4 horas para que el etanol se evapore por completo. Pasado este tiempo se resuspendió el ADN en 25 µL de buffer TE 1X (Tabla A3, Anexo A).

2.3.2. Determinación de la concentración del ADN

La concentración de ADN se determinó usando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Nanodrop 2000). Para la medición se escogió en el programa el protocolo para medición de ácidos nucleicos. El equipo se calibró con 1.5 µL de agua destilada ultrapura y con 1.5 µL de buffer TE 1X. Para determinar la concentración de las muestras de ADN se colocó 1.5 µL en el equipo, el resultado se mostró en ng/µL de ADN.

Para saber la integridad del ADN se realizó un gel de agarosa (1% p/v) en buffer TBE 0.5X (Tabla A4, Anexo A) y se tiñó con 1 μ L de SYBRsafe 10000X por cada 10 ml de agarosa líquida. El gel de agarosa se corrió por un tiempo de 35min a 100 voltios y 200 mA. Posteriormente se observó con luz ultravioleta en el equipo ChemiDocMMP Imaging System (BioRad) mediante el software ImageLab. El ADN con una alta integridad se mostró como una sola banda compacta mientras que el ADN degradado se observó como un barrido en el gel, las imágenes se tomaron con la apertura menor de la cámara y se guardaron en formato TIF.

2.3.3. Box PCR

Para la amplificación de las secuencias conservadas BOX se realizó una reacción final de 22 μ L con los componentes que se muestran en la Tabla 7. Se hizo un master mix con todos los componentes (excepto el ADN) y se repartió en tubos individuales 21 μ L.

Tabla 7. Componentes de la mezcla para la reacción BOX PCR.

<i>Componentes</i>	<i>Volumen (μL)</i>
Platinum TM Multiplex PCR Master Mix (Invitrogen)	20
Primer BOX A ₁ R ₁ (20 μ M; (5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG ³)	1
ADN	1

Una vez listas las muestras se colocaron en el termociclador Multigene (Labnet) con las condiciones que se muestran en la Tabla 8. Finalizada la reacción PCR se preparó un gel de agarosa al 1.28% (p/v) que se tiñó con 1 μ L de SYBRsafe 10000X por cada 10 ml de agarosa líquida. Se colocaron 20 μ L de cada producto PCR en el gel, además se usó un marcador molecular de 1Kb para la estandarización de las bandas. La electroforesis se realizó por 4 horas a 75 voltios. La revelación del gel se hizo con luz ultravioleta en el transiluminador ChemiDocTMMP Imaging System (BioRad) y las fotos se guardaron en formato TIF para su posterior análisis.

Tabla 8. Condiciones de BOX PCR.

<i>Etapa</i>		<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Tiempo</i>	<i>Ciclos</i>
Activación de la Taq		94	2'	1
Desnaturalización		94	45''	35
Amplificación	Alineamiento	50	1'15''	35
	Extensión	72	8'	35
Extensión Final		72	10'	1
Hold		4	∞	

2.3.5. Secuenciamiento del ADNr 16S

Se realizó la extracción de ADN de las cepas seleccionadas en el análisis de los datos moleculares y fenotípicos. El procedimiento a seguirse fue el mismo que se describe con anterioridad, con la diferencia que el ADN se resuspendió en agua y se envió mediante la empresa DHL a los Estados Unidos para su secuenciamiento en MACROGEN.

2.4. Análisis de datos

2.4.1. Datos fenotípicos

Los resultados obtenidos de la caracterización macroscópica, microscópica y de las pruebas fisiológicas se analizaron en base a los tres grupos de bacterias estudiados (Tabla 1). Estos resultados se organizaron en tres matrices con código binario. Las matrices se analizaron mediante taxonomía numérica en el programa NTSys, usando los algoritmos de Simple Similaridad.

2.4.2. Datos moleculares

Las fotografías de los geles que se obtuvieron del BOX PCR, se analizaron en base a los grupos de bacterias que se muestran en la Tabla 1. Para este análisis se usó el programa GelJ de Java y el coeficiente Different Band (SSM).

2.4.3. Alineamiento y análisis filogenético

Las secuencias recibidas de la empresa MACROGEN se ensamblaron usando el programa PHYDIT. Una vez obtenida la secuencia del gen ADNr 16S de cada microorganismo se realizó un blast en la página web del National Center of Biotechnology Information (NCBI) mediante la herramienta BLAST-N, para encontrar la especie a la que posiblemente pertenece. Identificadas las especies de los microorganismos se hizo un análisis filogenético en el mismo programa, usando el modelo Neighbour joining y el algoritmo de Jukes-Cantor para la obtención del árbol filogenético.

2.5. Hipótesis

2.5.1. Hipótesis nula

No existe diversidad molecular y fenotípica dentro de los tres grupos de bacterias estudiados.

2.5.2. Hipótesis alternativa

Existen por lo menos dos especies diferentes dentro de los grupos de bacterias estudiados.

2.5.3. Señalamiento de las variables de las hipótesis

- Características fenotípicas las bacterias.
- Aislamiento del ADN genómico bacteriano
- Características moleculares de las bacterias.
- Secuenciamiento del gen ADNr 16S para la identificación de especies bacterianas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de resultados

3.1.1. Caracterización fenotípica

3.1.1.1. Caracterización macroscópica

Las características macroscópicas de los tres grupos bacterianos estudiados muestran en la tabla 9. Dentro de cada una de las colecciones se obtuvieron grupos de color. Así, para las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica se formaron 5 grupos, en donde, 12 de las 22 cepas corresponden al grupo formado por el color White mientras que, el grupo 384 Ligth Straw tiene un solo miembro (Tabla B1, Anexo B).

Respecto a las posibles fijadoras de nitrógeno se formaron 2 grupos de color con un número de miembros similar, 352 Pale cream con 5 miembros y White con 4. Dentro de los resultados obtenidos cabe recalcar que 3 de las 12 cepas bacterianas presentaron la característica de color definida como translúcida, obteniendo así un total de 3 grupos color (Tabla C1, Anexo C).

Por último, después del análisis, las posibles bacterias entomopatógenas formaron 3 grupos completamente homogéneos, cada uno con 3 miembros. Estos grupos corresponden a los colores 365 Vellum, 352 Pale cream y White. Una de las cepas estudiadas no pertenece a ninguno de los grupos anteriores al haber presentado color 367 Manilla (Tabla D1, Anexo D).

Tabla 9. Características macroscópicas de los grupos de bacterias estudiados.

Prueba	Grupo de Bacterias		
	Grupo 1 Posibles degradadoras de materia orgánica (22 bacterias)	Grupo 2 Posibles fijadoras de nitrógeno (10 bacterias)	Grupo 3 Posibles entomopatógenas (12 bacterias)
Forma de la colonia			
Rizoide	2	0	0
Circular	5	12	4
Irregular	14	0	6
Filamentosa	1	0	0
Elevación			
Plana	15	0	9
Convexa	1	11	0
Umbonada	6	1	1
Margen			
Filamentoso	3	0	1
Entero	6	12	3
Lobado	5	0	1
Ondulado	8	0	5
Color			
White	12	4	3
365 Vellum	5	0	3
367 Manilla	2	0	1
384 Ligth Straw	1	0	0
389 Camouflage beige	2	0	0
Translúcido	0	3	0
352 Pale cream	0	5	3
Pigmento difusible			
Presencia	2	0	0

3.1.1.2. Características microscópicas

Las características microscópicas de los 3 grupos de bacterias estudiados se muestran en la Tabla 10. Los resultados obtenidos permitieron identificar que tanto el grupo de posibles bacterias degradadoras de materia orgánica como el de bacterias entomopatógenas se encuentran formados completamente por microorganismos de forma bacilar del tipo Gram positivos. Además, de esta característica se observaron endosporas, presentes en todas las cepas bacterianas que forman los grupos antes mencionados (Tabla B2, Anexo B; Tabla C2, Anexo C).

Estos resultados coinciden con las características reportadas para especies representativas ya descritas. Por ejemplo, la cepa más estudiada actualmente en el proceso de degradación de materia orgánica es *Bacillus subtilis*, la cual es una bacteria bacilar, de tipo Gram positiva y que tiene la capacidad de formar endosporas (**Rinland & Gómez, 2015**). Mientras que, la cepa entomopatógena más representativa es *B. thuringensis*, la cual al igual que, *B. subtilis* es una bacteria Gram positiva con forma bacilar y que puede formar endosporas si el medio ambiente se vuelve hostil (**Ruiu & Luca, 2015**).

Tabla 10. Características microscópicas de las bacterias por grupos de estudio.

Prueba	Grupos de Bacterias		
	Grupo 1 Posibles degradadoras de materia orgánica (22 bacterias)	Grupo 2 Posibles fijadoras de nitrógeno (10 bacterias)	Grupo 3 Posibles entomopatógena s (12 bacterias)
Forma Celular			
Bacilos	22	12	10
Característica Gram			
Positivo	22	0	10
Negativo	0	12	0
Estructuras de Resistencia			
Cápsulas	0	0	0
Endosporas	22	0	10

Por otro lado, el grupo de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno presentó únicamente bacterias del tipo Gram negativo todas de forma bacilar. Estas bacterias dieron resultados negativos para la prueba de estructuras de resistencia a las condiciones del medio, ya que no se observaron ni endosporas ni cápsulas en ninguna de las cepas (Tabla D2, Anexo D). Estas características coinciden con las reportadas para las especies de bacterias fijadoras de nitrógeno como *Pseudomonas* o *Rhizobium*, ya que ambos géneros se reportan como bacilos Gram negativos que no forman endosporas o cápsulas (**Gourion, Berrabah, Ratet, & Stacey, 2015; Shabayev, 2010**).

3.1.1.3. Pruebas fisiológicas

Los datos obtenidos de las pruebas fisiológicas realizadas a las cepas bacterianas se reportan en la Tabla 13, estos se encuentran separados por grupos de interés. En cuanto, a las condiciones de temperatura y pH en el crecimiento se encontró que las bacterias de los 3 grupos en su mayoría mesófilas y alcalotolerantes. Sin embargo, en el grupo de estudio dos se encontraron 3 microorganismos acidófilos y 2 psicrótrofos que sobresalen del resto.

La característica de halofilia generó resultados similares para las bacterias del Grupo 1 y 3, encontrando que la mayoría son halófilas y halófilas extremas, con sólo un microorganismo halófilo débil en el grupo de posibles bacterias degradadoras de materia orgánica. Por el contrario las cepas de las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno son halófilas débiles en su totalidad.

En cuanto a la producción de enzimas extracelulares se encontró que la quitina es el único sustrato que fue degradado por lo menos por un microorganismo de cada grupo de interés. Así, las fuentes como el almidón y la celulosa fueron degradadas por el 68% de las bacterias que forman el grupo 1. Por el contrario, en el grupo de posibles bacterias entomopatógenas se encontró que el 70% de cepas hidrolizaron la celulosa del medio pero solamente el 30% hidrolizó el almidón. Por otro lado, el grupo de interés 2 no presentó enzimas extracelulares que puedan reducir la celulosa y el almidón.

El uso de un aminoácido como fuente única de carbono y nitrógeno se determinó que la histidina, alanina y arginina fueron metabolizados por la mayoría de microorganismos de los 3 grupos. También se identificó que la treonina, fenilalanina, asparagina y valina son usados por todas las bacterias que forman el grupo 1 y 3. Todo lo contrario sucedió con las cepas de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno, donde no se encontró un aminoácido que todas puedan utilizar como fuente de carbono y nitrógeno.

Los resultados obtenidos en las pruebas fisiológicas de temperatura, pH y salinidad se encuentran reportadas en la Tabla B3 (Anexo B), Tabla C3 (Anexo C) y Tabla D3 (Anexo D). De la misma manera, los resultados del ensayo de producción de enzimas

extracelulares y fuente única de carbono y nitrógeno se reportan en las Tablas B4 (Anexo B), C4 (Anexo C) y D4 (Anexo D).

Tabla 11. Características fisiológicas de las bacterias por grupos de estudio

Prueba	Grupos de Bacterias		
	Grupo 1 Posibles degradadoras de materia orgánica (22 bacterias)	Grupo 2 Posibles fijadoras de nitrógeno (12 bacterias)	Grupo 3 Posibles entomopatógenas (10 bacterias)
pH			
Acidófila	0	3	0
Neutrotolerante	0	3	0
Neutrófilo	1	0	0
Alcalitolerante	21	6	10
Alcalófilo	0	0	0
Temperatura			
Mesófilo extremo	0	0	3
Mesófilo	22	10	7
Psicrótrofo	0	2	0
Psicrófilo	0	0	0
Salinidad			
Halófilo débil	1	12	0
Halófilo	11	0	8
Halófilo Extremo	10	0	2
Producción de enzimas extracelulares			
	%	%	%
Celulosa	68.18	0	70
Almidón	68.18	0	30
Quitina	68.18	8.3	30
Fuente única de nitrógeno y carbono			
	%	%	%
Treonina	100	50	100
A. Aspártico	40	50	60
A. Glutámico	36.4	58.3	70
Fenilalanina	100	50	100
Tirosina	100	25	80
Asparagina	100	83	100
Valina	100	25	100
Lisina	81.8	25	90
Leucina	86.4	25	100
Alanina	95.4	75	40
Histidina	90.9	91.7	90
Arginina	80.4	75	90
Cisteína	59.1	8.3	90

3.1.1.4. Taxonomía fenotípica

Para el grupo de posibles bacterias degradadoras de materia orgánica se formaron 18 los grupos especie tomando como base una similaridad del 95%. De los cuales cuatro presentan más de un solo miembro y, los 14 restantes son cepas individuales (Figura 6).

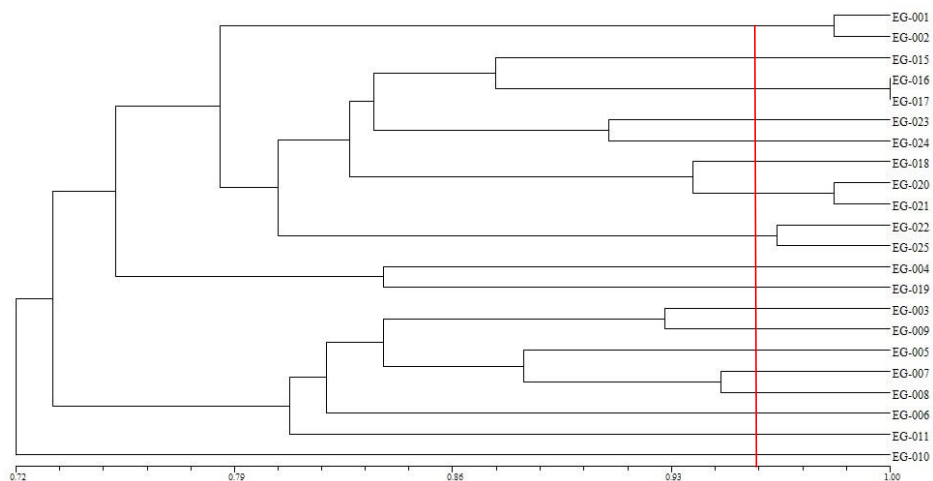


Figura 6. Dendrograma de datos fenotípicos de las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica

Por otro lado, en el dendrograma obtenido de los resultados fenotípicos para las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno se hicieron los grupos especie a partir de una similaridad del 87% y se obtuvo un total de 4, cada uno formado por 3 miembros (Figura 7).

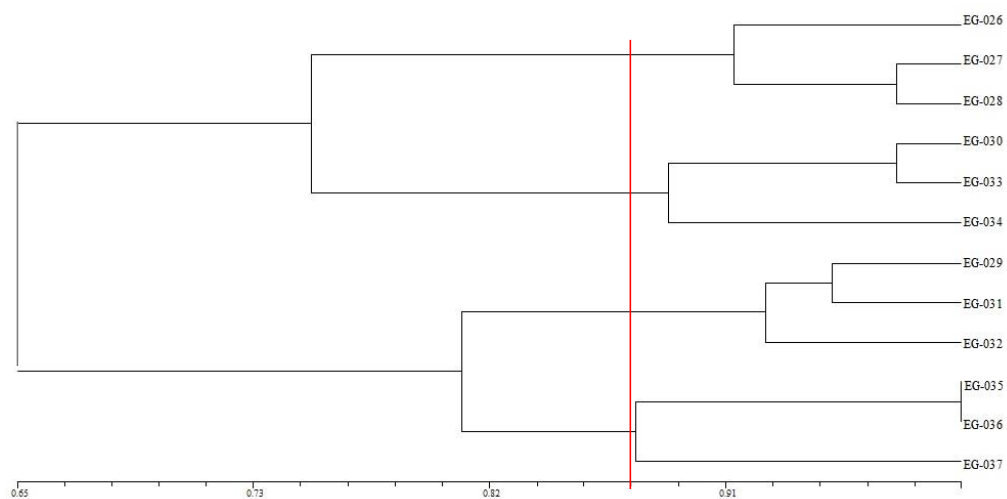


Figura 7. Dendrograma de datos fenotípicos de las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno

Por último, la figura 8 muestra los resultados de la caracterización fenotípica de las bacterias entomopatógenas, con un corte realizado al 86% se formaron un total de siete grupos especie. Donde solamente dos de estos presentan más de un miembro, estos grupos contienen bacterias que tienen un 100% de similaridad. Por el contrario, los cinco grupos restantes son cepas individuales.

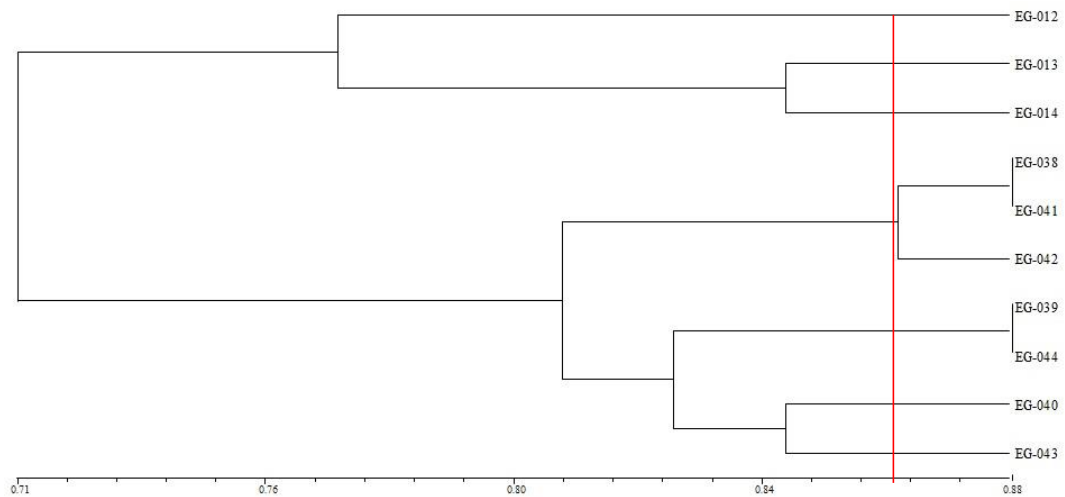


Figura 8. Dendrograma de datos fenotípicos de las posibles bacterias entomopatógenas

3.1.2. Caracterización molecular

Con los procesos usados de extracción de ADN de bacterias Gram positivas y Gram negativas se obtuvieron concentraciones suficientes (Anexo E) para realizar la reacción de BOX PCR. Este se realizó con todas las cepas estudiadas y, en todas se presentaron un número de bandas de 5 a 15. Lo que permitió su análisis posterior en el programa GelJ de una forma más fácil.

3.1.2.1. Taxonomía molecular

En la figura 9 se muestra el dendrograma obtenido del cálculo de similaridad de las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica. En el cual se identifican 14 grupos especie con un coeficiente del 72%, de estos 8 son grupos con dos miembros y el resto son cepas individuales.

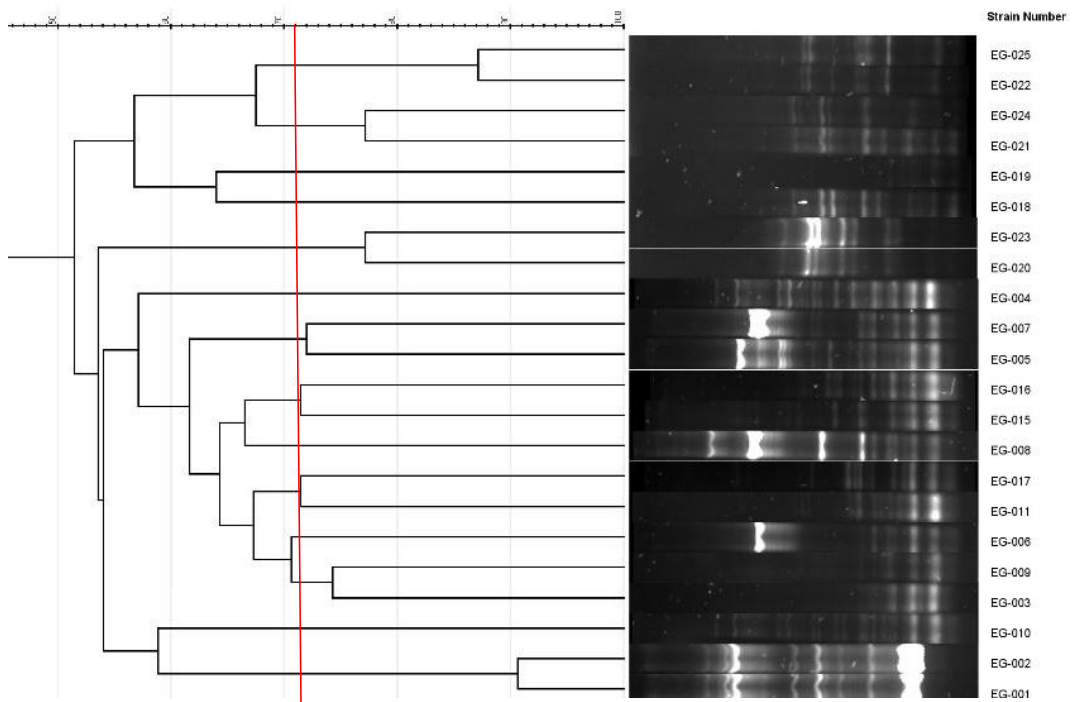


Figura 9. Dendrograma de los datos moleculares de las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica

De la misma manera, la formación de grupos especie para las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno se hizo basándose en una similitud del 62%. Obteniendo un total de 6 grupos homogéneos, todos con 2 miembros (Figura 10).

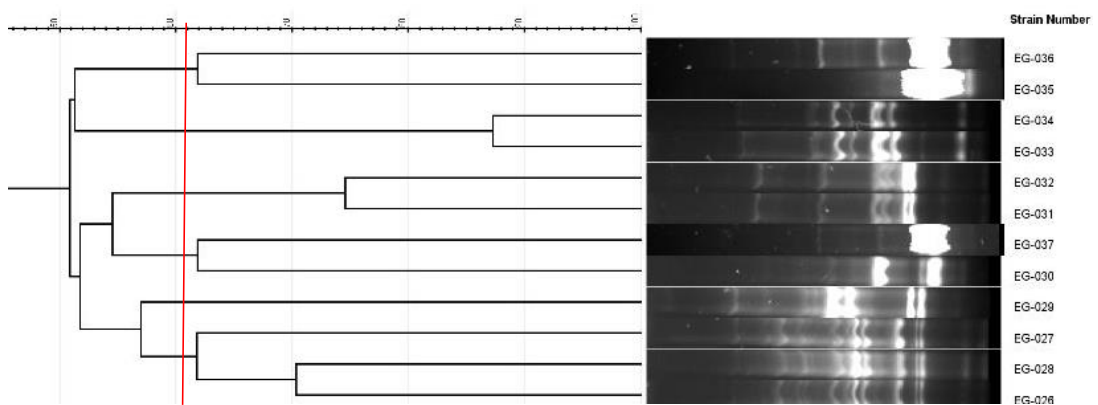


Figura 10. Dendrograma de los datos moleculares de las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno

Por otro lado, la figura 11 muestra el dendrograma obtenido de los resultados de las posibles bacterias entomopatógenas. En el cual para la formación de grupos especie se tomó una similitud del 65%. Se obtuvieron 8 grupos de los cuales 6 son cepas individuales y los restantes tienen dos miembros.

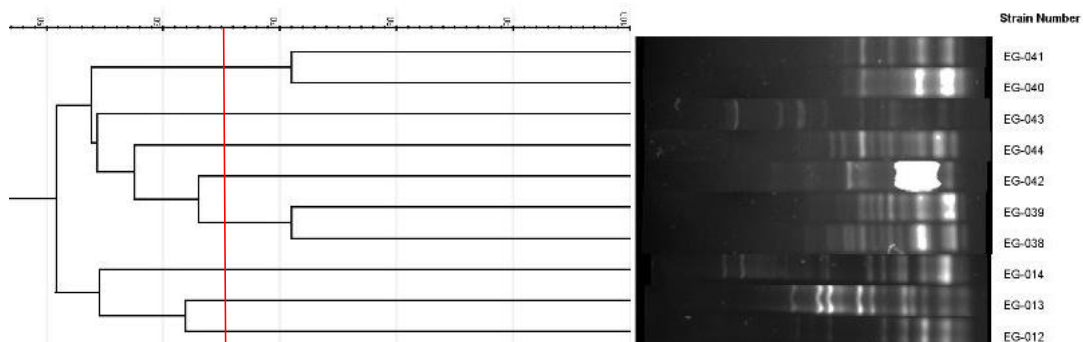


Figura 11. Dendrograma de los datos moleculares de las posibles bacterias entomopatógenas

3.1.3. Análisis filogenético y descripción taxonómica

El secuenciamiento del gen ADNr 16S, permitió la identificación género-especie de las cepas tomadas como representantes de cada grupo de interés. El porcentaje de similitud y el número de nucleótidos diferentes entre las cepas estudiadas y las especies ya descritas se muestran en las Tablas B5 (Anexo B), C5 (Anexo C) y D5 (Anexo D). Mientras que las secuencias de cada cepa, la identificación y el número de nucleótidos obtenidos del secuenciamiento se muestran en las Tablas B6 (Anexo B), C6 (Anexo C) y D6 (Anexo D).

Para las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica se obtuvieron ocho especies diferentes, siete pertenecientes al género *Bacillus* y una al género *Lysinibacillus* (Figura 12).

De las especies pertenecientes al género *Bacillus* se identificaron 3 cepas de *B. stratosphericus* correspondientes a EG-003, EG-005 y EG-007. Estas presentan un porcentaje de similitud de 99.93% con *B. stratosphericus*. La cual fue descrita en el 2006, como un microorganismo Gram positivo con forma bacilar, que tiene colonias irregulares. También se describe que son bacterias mesófilas y alcalotolerantes (Shivaji et al., 2006).

De la misma manera, se identificó como *B. haynesii* a las cepas EG-020, EG-021 y EG-023 con un porcentaje de similitud de 99.73%. Estas son bacterias Gram positivas con forma bacilar, con un rango de crecimiento desde un pH 4.5 hasta 9.5. Igualmente se encontró que la temperatura de crecimiento va desde los 4°C hasta los

37°C. Las mismas que concuerdan con la descripción de *B. haynesii*, realizada por primera vez en el año 2017 siendo considerada una especie nueva (**Dunlap et al., 2017**).

Por otro lado, las cepas EG-015, EG-016 y EG-019 se identificaron como *B. halotolerans* al presentar una similaridad de 99.93%. La cual se definió como tal en el año 2017 después de un análisis de los sinónimos ya existentes como *B. axarquiensis*, *B. malacitensis* y *Brevibacterium halotolerans* (**Tindall, 2017**). Las características presentadas para *B. halotolerans* la definen como una bacteria Gram positiva de forma bacilar, con la capacidad de soportar altas concentraciones de sal en el medio (**Zhang et al., 2018**).

Adicionalmente, se encontraron dos cepas de *B. subtilis* corespondientes a EG-022 y EG-025. Fueron clasificadas como tal porque presentaron un porcentaje de similaridad de 99.86 con *B. subtilis*. Especie descubierta en el año 1958 por Spizizen, quien la describe como un bacilo Gram positivo que forma endosporas y, con alta capacidad de producción de enzimas y proteínas extracelulares (**Cui et al., 2018**).

La bacteria EG-004 por otro lado, fue identificada como *B. simplex* al presentar un 99.79% de similaridad. Ambos microorganismos tienen características de bacilos Gram positivos y formadores de endosporas. Además, se define a *B. simplex* como una bacteria mesófila ya que solamente crece en temperaturas menores a 45°C, también presenta la capacidad de crecer en un medio con pH máximo de 9 y mínimo de 5, lo que la hace una cepa alcalitolerante (**Heyrman et al., 2005**).

Una cepa de *B. albus* también se identificó dentro de la colección, con un porcentaje de 99.92% de similaridad esta corresponde a EG-009. Para la cual en la caracterización fenotípica se encontró que es una bacteria bacilar Gram positiva con características mesofílicas, alcalitolerantes y halófilas. La nueva descripción de *B. albus* realizada en el 2017 concuerda con los datos obtenidos ya que se reporta crecimiento en un pH mínimo de 5 y máximo de 9, respecto a la temperatura la bacteria no se desarrolla a más de 45°C y, de igual forma soporta una concentración del 9% de sal en el medio (**Y. Liu et al., 2017**).

Además, se encontró una cepa de *B. licheniformis* correspondiente a EG-010 con una similaridad del 99.79%. *B. licheniformis* fue descrita en el año 1898 por Weigmann y en 1901 por Chester. Es una bacteria bacilar Gram positiva con capacidad de formar endosporas. En cuanto a las condiciones de crecimiento presenta características mesofílicas con una temperatura máxima de desarrollo de 45°C y, capacidad halófila con tolerancia a la salinidad en rangos superiores al 6% (**Manachini, Fortina, Levati, & Parini, 1998**).

Por último, se identificó a EG-008 con una similaridad de 99.30% como *Lysinibacillus pakistanensis*. Esta fue descrita como especie en el año 2014 y muestra características celulares Gram positivas de forma bacilar. Las condiciones de crecimiento que tiene la definen con mesófila con una temperatura máxima de desarrollo de 45°C, alcalitolerante por la habilidad de crecer en rangos de pH desde 5 hasta 9 y, halófila ya que puede sobrevivir en un medio con hasta un 6% de concentración de **sal** (**Ahmed et al., 2014**).

Los datos que se obtuvieron de la caracterización fenotípica de los microorganismos pertenecientes a la colección de posibles bacterias degradadoras de materia orgánica concuerdan por completo con la descripción taxonómica de cada una de las especies obtenidas.

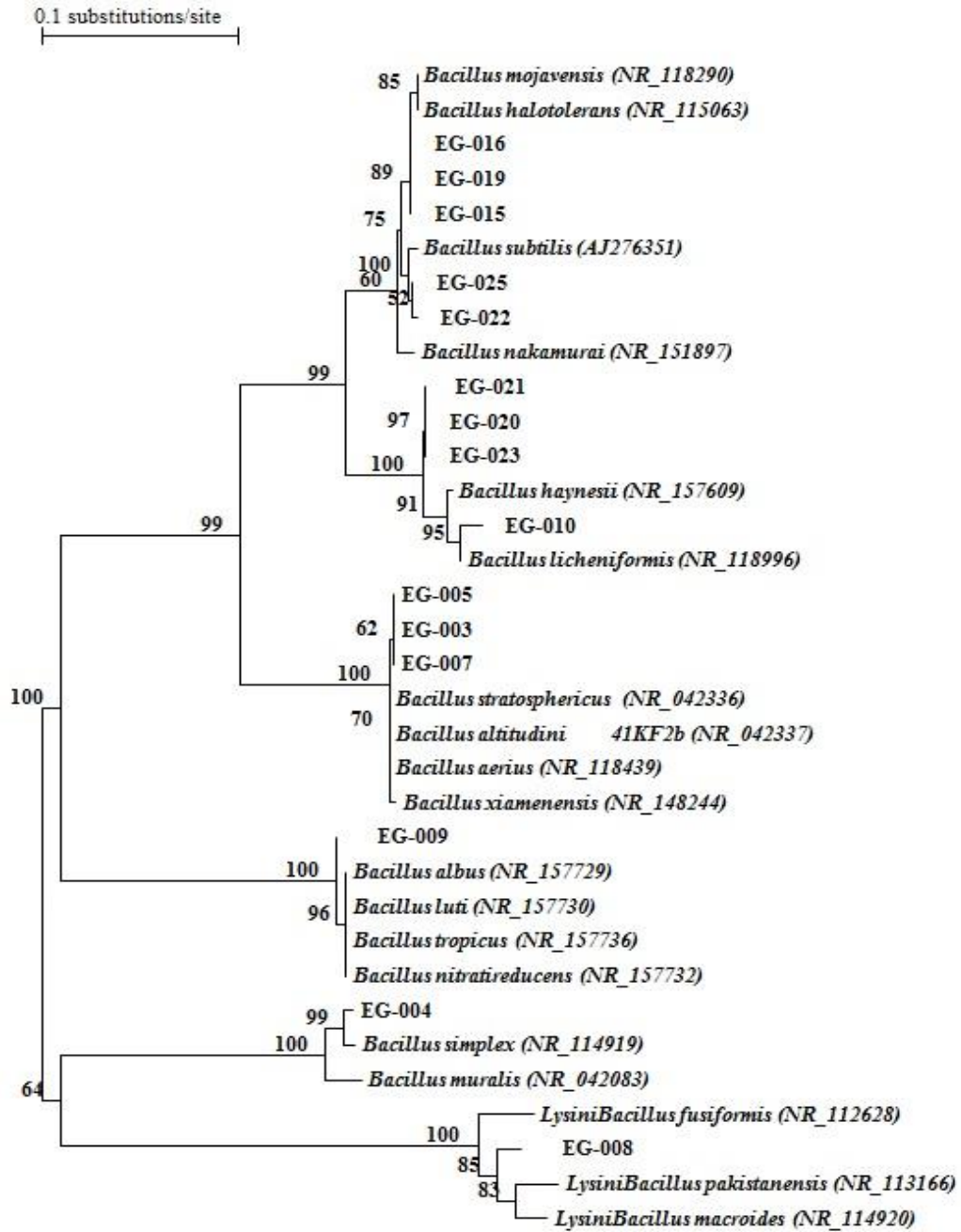


Figura 12. Árbol filogenético de las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica

La Figura 13 muestra el árbol filogenético obtenido para el el grupo de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno, en donde de identificaron 4 especies distintas. Dos del género *Enterobacter*, una de *Rhizobium* y una de *Pseudomonas*.

La primera cepa de *Enterobacter* corresponde a EG-029, la cual con una similaridad de 99.72% fue identificada como *E. asburiae*. Especie descrita en el año 1986 como un bacilo Gram negativo. Las condiciones de crecimiento la definen como mesófila y

alcalitolerante, soportando rangos de temperatura de 4°C hasta 37°C. Además, se reporta su rango de tolerancia al pH, con valores desde 5 hasta 9 (**Brenner, McWhorter, Kai, Steigerwalt, & Farmer, 1986; Hoffmann et al., 2005**).

La bacteria EG-032 se identificó como *E. tabaci* al tener una similaridad de 99.78% con esta. *E. tabaci* fue descrita en el año 2015 como una bacteria Gram negativa con forma bacilar que tiene colonias con margen circular y superficie convexa. También se describe como mesófila con un rango de crecimiento entre los 4 y 37 grados centígrados, y alcalitolerante por desarrollarse en valores de pH desde 4 hasta 9 (**Duan et al., 2015**).

La bacteria EG-033 presentó una similaridad de 99.93% con la especie *Rhizobium radiobacter*. Descrita como un bacilo gram negativo que no forma endosporas y, con características de halofilia mínimas ya que crece a una concentración de sal máxima del 2%. Sin embargo, a pesar de ser reportada como un microorganismo del género *Rhizobium* esta no tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (**Kuykendall, Kerr, Young, Martínez-Romero, & Sawada, 2001**).

Por otro lado, se identificaron las bacterias EG-035 y EG-037 como *Pseudomonas brassicaearum*, al presentar una similaridad de 99.66%. Esta especie fue descrita en el año 2000 por Achouak como un bacilo Gram negativo con la capacidad de producir compuestos antimicrobianos. De igual manera se encuentra en el suelo específicamente en la rizosfera, su temperatura óptima de crecimiento es 28°C y su tolerancia al pH va desde valores de 4 hasta 9 (**Ivanova et al., 2009**).

Las características fenotípicas que se obtuvieron para las cepas EG en el estudio realizado coinciden con los resultados reportados para cada una de las especies identificadas y descritas para el grupo 2 de interés.

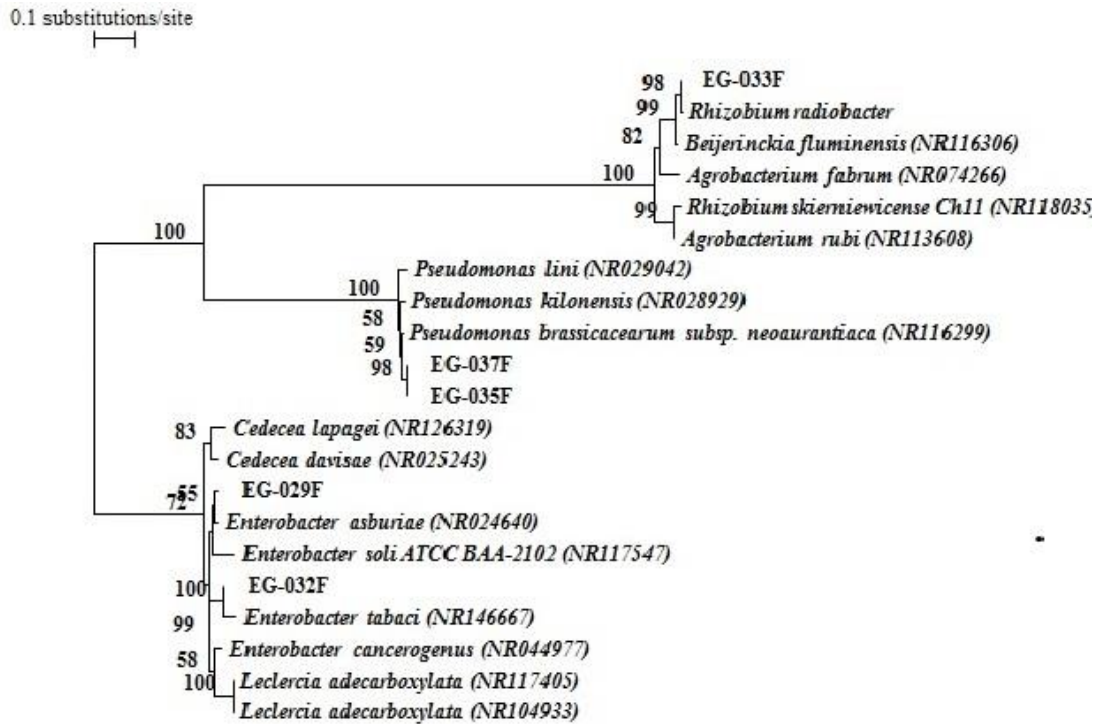


Figura 13. Árbol filogenético de las posibles bacteria fijadoras de nitrógeno

Para el último grupo de interés de posibles bacterias entomopatógenas se encontraron seis especies diferentes, todas pertenecientes al género *Bacillus* (Figura 14). De las especies obtenidas hay dos que coinciden con las reportadas para las bacterias del grupo 1, estas son *B. albus* que corresponde a las cepas EG-043 y EG-044 y, *B. haynesii* que coincide con EG-013. Con porcentajes de similaridad de 99.93% y 99.73% correspondientemente para cada especie.

Por otro lado, se identificó a EG-014 como *B. mycoides* con un porcentaje de similaridad de 100%. Esta especie fue descrita como bacilo Gram positivo con la capacidad de formar endosporas y, con un rango de crecimiento de 15°C a 40°C con una temperatura óptima de desarrollo a 28°C. También se describe la capacidad de este microorganismo para soportar la salinidad del medio ya que se reporta crecimiento en una concentración de hasta el 9% (Y. Liu, Lai, & Shao, 2018).

Además, se encontró una cepa de *B. velezensis* correspondiente a EG-042, estas presentaron entre sí un porcentaje de similaridad de 99.80%. *B. velezensis* fue descrita en el 2005 como un microorganismo Gram positivo con endosporas elípticas, que forma colonias blancas en el medio de cultivo. Las condiciones de crecimiento la

describen como halófila extrema por soportar concentraciones mayores al 9%. De igual modo se define como mesófila y alcalitolerante, con una temperatura óptima de crecimiento de 28°C y un pH óptimo de 7 (**Ruiz-García, Béjar, Martínez-Checa, Llamas, & Quesada, 2005**).

Por otra parte, con una similaridad del 100% se identificó a EG-038 como *B. cereus*. Esta especie se encuentra de forma natural en el suelo y, se caracterizó como un microorganismo Gram positivo que produce endosporas cuando el medio se vuelve hostil. También se define como una bacteria mesófila, halófila y alcalitolerante (**Majed, Faille, Kallassy, & Gohar, 2016**).

Por último, la cepa EG-041 se identificó inicialmente como *B. paranthracis* por tener un porcentaje de similaridad de 99.73. Sin embargo, en el análisis del árbol filogenético (Figura 14) se observa que EG-041 tiene mayor cercanía evolutiva con la especie *B. thuringensis* y presentan una similaridad de 99.59% entre sí. *B. thuringensis* fue descrita en el año 1915 por Berliner como un microorganismo Gram positivo con forma bacilar y características mesofílicas y halófilas (**Şahin, Gomis-Cebolla, Güneş, & Ferré, 2018**). También se describen las endotoxinas que produce esta especie, conocidas como toxinas Cry porque se forman cristales dentro de la bacteria (**Palma et al., 2014**).

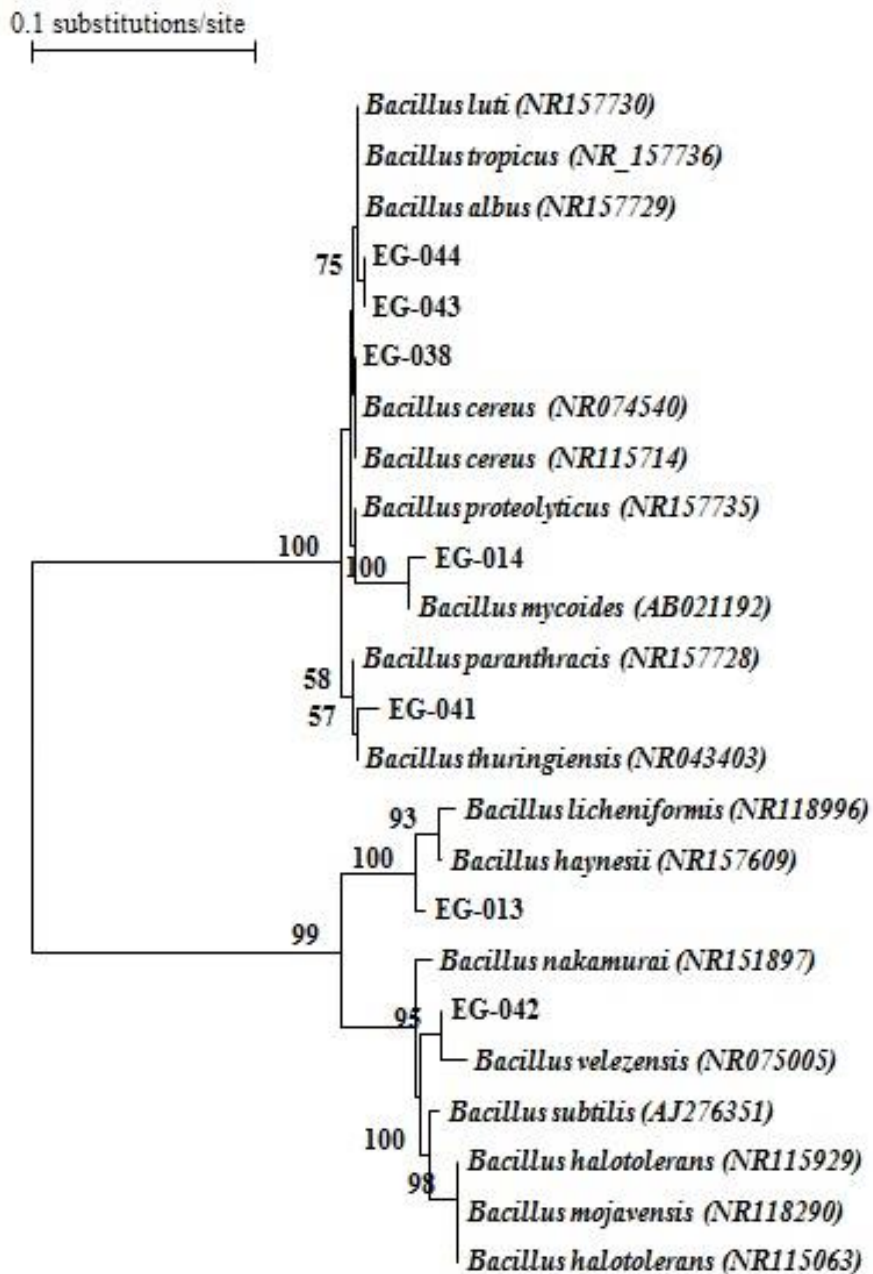


Figura 14. Árbol filogenético de las posibles bacterias entomopatógenas

3.1.4. Discusión general del trabajo

El presente trabajo se enfocó en la identificación de especies de tres grupos de interés, como también en la determinación de características fenotípicas y moleculares de cada una de las cepas de estudiadas.

Para el grupo de posibles bacterias degradadoras de materia orgánica el estudio fenotípico mostró una capacidad elevada para degradar compuestos con alto contenido de celulosa, almidón o quitina, lo que concuerda con lo reportado por **Rinland &**

Gómez (2015), donde se utilizaron bacterias autóctonas para degradar desechos de plantas compuestos principalmente por celulosa y almidón. También coincide con los reportes obtenidos sobre la producción de amilasas por especies como *B. subtilis*, de la cual se tienen dos cepas en la colección (**Cui et al., 2018**).

Además, se identificó la capacidad de utilizar aminoácidos como asparagina, treonina y valina como única fuente de carbono, datos que coinciden con la descripción de las ocho especies obtenidas del análisis filogenético. El uso de los aminoácidos antes mencionados se da en un promedio del 70%, con relación al contenido total del medio en donde se encuentran los microorganismos. De igual manera se encontraron cepas halófilas y halófilas extremas dentro del grupo de interés, resultados que concuerdan con la descripción de las especies bacterianas reportadas, donde la mayoría presenta crecimiento en un rango de 1% hasta 9% de concentración de sal (**Cui et al., 2018; Dunlap et al., 2017; G.-H. Liu et al., 2016; Y. Liu et al., 2017; Shivaji et al., 2006; Tindall, 2017**).

Para el grupo de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno se encontró que no producen enzimas extracelulares con la capacidad de hidrolizar compuestos como la celulosa, el almidón o la quitina. Estos resultados concuerdan con los reportados para las especies *E. asburiae*, *E. tabaci*, *R. radiobacter* y *P. brassicacearum*. Adicionalmente, se identificó que estas especies pueden usar los aminoácidos histidina, alanina y asparagina como única fuente de carbono. Los cuales en el estudio fenotípico fueron utilizados por aproximadamente el 75% de los microorganismos de la colección. La capacidad de tolerar la salinidad del medio también se reportó como nula, ya que solamente sobreviven en medios que tienen una concentración de sal de máximo 2%, mientras que la clasificación de las bacterias estudiadas las definió como halófilas débiles (**Duan et al., 2015; Hoffmann et al., 2005; Ivanova et al., 2009; Kuykendall et al., 2001**).

Finalmente para las posibles bacterias entomopatógenas se encontró que en su mayoría son mesófilas extremas, alcalitolerantes y halófilas extremas. Estas características concuerdan con los datos de las especies identificadas en el análisis filogenético. Por otro lado, se determinó que a los aminoácidos treonina, leucina y valina como fuentes de carbono y nitrógeno que pueden usar tanto las cepas estudiadas como las especies

del género *Bacillus* que se obtuvieron. De las especies identificadas la que presentan una mayor capacidad de degradar compuestos como la celulosa, el almidón o la quitina es la correspondiente a *B. haynesii*, estos datos concuerdan con los resultados de las pruebas fisiológicas de la cepa EG-013. (Y. Liu et al., 2017, 2018; Majed et al., 2016; Ruiz-García et al., 2005; Şahin et al., 2018).

A modo general, en el análisis filogenético las de las cepas identificadas se encontraron un total de 16 especies diferentes, distribuidas en los tres grupos de interés estudiados. De estas solamente los microorganismos pertenecientes a posibles bacterias degradadoras de materia orgánica presentaron características relacionadas al uso biotecnológico que se pretendía. En el caso de las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno no se obtuvo ninguna especie que realice este proceso en simbiosis o en vida libre en el suelo. Y finalmente, para el grupo de posibles bacterias entomopatógenas se encontró solamente una cepa perteneciente a *B. thuringensis* y, el resto de cepas son especies que no tienen la capacidad de producir toxinas que afecten a los insectos.

La identificación de sólo una cepa de interés en el grupo 3 y de ninguna cepa de interés en el grupo 2, muestra que las técnicas usadas para el aislamiento y la selección de bacterias para la formación de cada una de las colecciones no es el ideal. Esto denota que se necesita de pruebas más específicas para la identificación fenotípica de microorganismos que tengan la capacidad de producir toxinas y fijar nitrógeno atmosférico.

No obstante, pesar de estos resultados sobresale la diversidad que se obtuvo en cada grupo, donde el mínimo de especies fue de 4 con tan sólo el 30% de las bacterias totales identificadas molecularmente. Esta diversidad también se ve reflejada en los grupos especie obtenidos en el análisis fenotípico y molecular de cada uno de los grupos de interés.

La caracterización de las bacterias mediante taxonomía polifásica permitió obtener información de varios niveles, desde su morfología hasta su especie pasando por sus características fisiológicas. Por esta razón el uso de esta técnica para el estudio de bacterias es tan importante, ya que si el secuenciamiento del genoma completo no se puede realizar, la información obtenida es suficiente para identificar características

básicas sobre presencia de genes de interés. Por ejemplo expresión de metabolitos secundarios o habilidad de transformar compuestos como el nitrógeno molecular (Gillis, Vandamme, De Vos, Swings, & Kersters, 2001).

Con este análisis de los datos obtenidos se demuestra la robustez del estudio realizado, principalmente en la concordancia que tienen las características descritas para las especies identificadas con los datos que se obtuvieron en la parte experimental para las cepas EG. A pesar de ello, la distribución de las bacterias en los grupos especie tanto fenotípicos como moleculares dejan ciertos vacíos en cuanto a la verdadera diversidad existente en la colección. Ya que aún con un promedio de 4 especies diferentes en cada colección se obtuvieron grupos especie que no se identificaron. Por lo que se debería secuenciar todas las cepas EG, o aumentar el número de pruebas fenotípicas a un mínimo de 100 conjuntamente con el uso de un número superior de primers para la caracterización molecular. De esta manera los grupos especie obtenidos serían más definidos.

3.2. Verificación de las hipótesis

3.2.1. Hipótesis nula (H_0)

No existe diversidad molecular y fenotípica dentro de los tres grupos de bacterias estudiados

3.2.2. Hipótesis alternativa (H_a)

Existen por lo menos dos especies diferentes dentro de los grupos de bacterias estudiados

Después del análisis de los resultados fenotípicos, moleculares y la obtención de 17 especies distintas en un total de 44 bacterias en el análisis filogenético se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa H_a . Afirmando que existen por lo menos dos especies diferentes dentro de cada grupo de bacterias estudiado.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se identificó y clasificó bacterias con potencial en biotecnología utilizando herramientas de taxonomía polifásica. Los resultados obtenidos mostraron un total de 16 especies diferentes distribuidas en los 3 grupos de interés. Donde, el género prevaeciente es *Bacillus* con un total de 11 especies, seguido de *Enterobacter* con dos y finalmente *Lysinibacillus*, *Rhizobium* y *Pseudomonas* con una especie reportada.
- Se determinó la diversidad fenotípica de la colección bacteriana. En donde se encontró que la mayoría de cepas con las que se trabajaron son mesófilas, alcalitolerantes y halófilas. También se identificaron cepas con la capacidad de degradar sustratos de alto peso molecular como la celulosa y el almidón pertenecientes a los grupos de interés uno y dos. Por otra parte, también se determinó que es necesario usar una metodología de aislamiento más específica para bacterias fijadoras de nitrógeno y entomopatógenas.
- Se caracterizó e identificó molecularmente las bacterias. Lo que permitió determinar diversidad molecular existente dentro de cada colección estudiada, con un promedio de 6 grupos especie formados principalmente por cepas individuales. También se identificó las bacterias usando el gen ADNr 16S, mediante el cual se obtuvieron 8 especies diferentes para las bacterias del grupo 1, con siete del género *Bacillus* y una del género *Lysinibacillus*. De la misma manera, en el grupo de interés 2 se identificó un total de 4 especies diferentes dos del género *Enterobacter* y las otras dos del género *Pseudomonas* y *Rhizobium* respectivamente. Por último para el grupo de interés 3 se obtuvieron 6 especies todas del género *Bacillus*.

- Se establecieron las relaciones filogenéticas de las bacterias identificadas. Mediante las cuales se encontró que las especies predominantes en la colección de posibles bacterias degradadoras de materia orgánica son *B. haynesii*, *B. halotolerans* y *B. stratosphericus* con 3 cepas cada una. Por otro lado, en la colección dos la especie dominante, fue *P. brassicacearum* con dos bacterias. Y finalmente para el grupo de posibles bacterias entomopatógenas la especie con mayor número de representantes fue *B. albus* con 2 microorganismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, M., Heuer, H., & Hallmann, J. (2014). Bacterial Antagonists of Fungal Pathogens Also Control Root-Knot Nematodes by Induced Systemic Resistance of Tomato Plants. *PLoS ONE*, 9(2), e90402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090402>
- Aguirre, E. (1989). Clasificación y Filogenia. In *Paleontología* (pp. 48–59). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=SkK0BCD7THsC&oi=fnd&pg=PA47&dq=determinación+del+parentesco+evolutivo&ots=a39J-DUQdu&sig=toYEs-lwdAKU-cJM6hEXD0ANZCw#v=onepage&q=determinación del parentesco evolutivo&f=true>
- Ahmed, I., Sin, Y., Paek, J., Ehsan, M., Hayat, R., Iqbal, M., & Chang, Y. H. (2014). Description of *Lysinibacillus pakistanensis*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY*, 16, 447–450. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/258925109_Description_of_Lysinibacillus_pakistanensis
- Ambrose, C., Varghese, C., & Subhash J, B. (2013). Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacognosy Reviews*, 7(13), 11–16. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.112833>
- Amin, M., Rakhisi, Z., & Zarei, A. (2015). Isolation and Identification of *Bacillus* Species From Soil and Evaluation of Their Antibacterial Properties. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 2(1). <https://doi.org/10.17795/ajcmi-23233>
- Anné, J., Economou, A., & Bernaerts, K. (2016). Protein Secretion in Gram-Positive Bacteria: From Multiple Pathways to Biotechnology (pp. 267–308). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/82_2016_49
- Austin, B. (2011). Taxonomy of bacterial fish pathogens. *VETERINARY RESEARCH*, 42–20. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-20>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608.

<https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2011.03.012>

- Bourguet, D., & Guillemaud, T. (2016). The Hidden and External Costs of Pesticide Use (pp. 35–120). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26777-7_2
- Brenner, D. J., McWhorter, A. C., Kai, A., Steigerwalt, A. G., & Farmer, J. J. (1986). *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(6), 1114–1120. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3711302>
- Campbell, N. A., Urry, L., & Reece, J. B. (2007a). *Biología*. Médica Panamericana.
- Campbell, N. A., Urry, L., & Reece, J. B. (2007b). Filogenia y Árboles Filogenéticos. In *Biología* (pp. 497–504). Médica Panamericana.
- Caumette, P., Brochier-Armanet, C., & Normand, P. (2015). Taxonomy and Phylogeny of Prokaryotes. In *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications* (pp. 145–190). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2_6
- Cheng, H.-R., & Jiang, N. (2006). Extremely Rapid Extraction of DNA from Bacteria and Yeasts. *Biotechnology Letters*, 28(1), 55–59. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4688-z>
- Crisci, J. V., & López Armengol, M. F. (1983). *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/50326234>
- Cui, W., Han, L., Suo, F., Liu, Z., Zhou, L., & Zhou, Z. (2018). Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(10), 145. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2531-7>
- Duan, Y.-Q., Zhou, X.-K., Di-Yan, L., Li, Q.-Q., Dang, L.-Z., Zhang, Y.-G., ... Li, W.-J. (2015). *Enterobacter tabaci* sp. nov., a novel member of the genus *Enterobacter* isolated from a tobacco stem. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(5), 1161–1169. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0569-1>
- Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Perry, E. B., Connor, N., Cohan, F. M., & Rooney, A.

- P. (2017). *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2720–2725. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002007>
- Fierro, F. (2012). Electroforesis de ADN. Retrieved from <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/710/electroforesis.pdf>
- Flores, A., González, V., Aguilar, C., & Rodríguez, R. (2014). Biofertilizantes Microbianos. *Biofertilizantes Microbianos*, 97–108. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Carolina_Flores3/publication/274638111_Azotobacter_una_bacteria_con_potencial_como_biofertilizante_eco-amigable/links/55cfd73408ae118c85c00ce5/Azotobacter-una-bacteria-con-potencial-como-biofertilizante-eco-amigable.pdf
- Garzón, O. D. C. (2013). Determinación de la Biodiversidad Bacteriana en Ecosistemas Glaciares de la Antártida. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3179>
- Gillis, M., Vandamme, P., De Vos, P., Swings, J., & Kersters, K. (2001). Polyphasic Taxonomy. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 43–48). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_7
- Gillis, M., Vandamme, P., De Vos, P., Swings, J., & Kersters, K. (2005). Polyphasic Taxonomy. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 43–48). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-28021-9_7
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., & Stacey, G. (2015). Rhizobium–legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in Plant Science*, 20(3), 186–194. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2014.11.008>
- Guamán-Burneo, M. C., Dussán, K. J., Cadete, R. M., Cheab, M. A. M., Portero, P., Carvajal-Barriga, E. J., ... Rosa, C. A. (2015). Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* f.a., sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(4), 919–931. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0546-8>
- Guzmán, M. (2016). Biotecnología para todos. *Investiga TEC*, 8–9. Retrieved from http://revistas.tec.ac.cr/index.php/investiga_tec/article/viewFile/2498/2287
- Heyrman, J., Logan, N. A., Rodríguez-Díaz, M., Scheldeman, P., Lebbe, L., Swings, J., ... Vos, P. De. (2005). Study of mural painting isolates, leading to the transfer of “*Bacillus maroccanus*” and “*Bacillus carotarum*” to *Bacillus simplex*, emended

- description of *Bacillus simplex*, re-examination of the strains previously attributed to “*Bacillus macroides*” and descr. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 55(1), 119–131. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63221-0>
- Hidalgo, E. (2001). Uso de microorganismos para el control de *Phyllophaga* spp. *Manejo Integrado de Plagas*, 60. Retrieved from <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6888/A1753e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hinke, N. (2003). ADN. *Ciencias 71 Julio*, 30–31. Retrieved from <http://revistas.unam.mx/index.php/cns/article/viewFile/11906/11228>
- Hirsch, P. (2002). Sprent, J.I. Nodulation in legumes. *Annals of Botany*, 89(6), 797-a-798. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf128>
- Hoffmann, H., Stindl, S., Ludwig, W., Stumpf, A., Mehlen, A., Heesemann, J., ... Roggenkamp, A. (2005). Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(3), 196–205. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2004.12.010>
- Ibarra, J. E., Cristina Del Rincón Castro, M., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., ... Bravo, A. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 113–120. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062k.pdf>
- Ivanova, E. P., Christen, R., Bizet, C., Clermont, D., Motreff, L., Bouchier, C., ... Kiprianova, E. A. (2009). *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* subsp. nov., orange-pigmented bacteria isolated from soil and the rhizosphere of agricultural plants. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 59(10), 2476–2481. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.009654-0>
- Kämpfer, P., & Glaeser, S. P. (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era - the polyphasic approach revisited. *Environmental Microbiology*, 14(2), 291–317. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02615.x>
- Kaplan, S. L. (2004). *New Antibiotics and Bacterial Resistance* (pp. 5–8). Springer,

- Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8993-2_2
- Koeuth, T., Versalovic, J., & Lupski, J. R. (1995). Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research*, 5(4), 408–418. <https://doi.org/10.1101/GR.5.4.408>
- Kotyk, A. (1999). Taxonomy. In *Quantities, Symbols, Units, and Abbreviations in the Life Sciences* (pp. 73–76). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-206-7_11
- Kuykendall, L. D., Kerr, A., Young, J. M., Martínez-Romero, E., & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*,. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-89>
- Liu, G.-H., Liu, B., Wang, J.-P., Che, J.-M., Chen, Q.-Q., & Chen, Z. (2016). Draft Genome Sequence of *Bacillus simplex* DSM 1321 for Setting Up Phylogenomics in Genomic Taxonomy of the *Bacillus*-Like Bacteria. *Genome Announcements*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00574-16>
- Liu, S.-H., Zeng, G.-M., Niu, Q.-Y., Liu, Y., Zhou, L., Jiang, L.-H., ... Cheng, M. (2017). Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. *Bioresource Technology*, 224, 25–33. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.11.095>
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., & Shao, Z. (2017). Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2499–2508. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821>
- Liu, Y., Lai, Q., & Shao, Z. (2018). Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 106–112. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002466>
- Lloret, L., & Martínez, E. (2005). Evolución y Filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47, 43–60. Retrieved from

- http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1_2f.pdf
- Logan, N. A. (2009). *Bacterial Systematic*. *Bacterial Systematic*. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/detail.action?docID=454422&query=archaea>
- Majed, R., Faille, C., Kallassy, M., & Gohar, M. (2016). Bacillus cereus Biofilms-Same, Only Different. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1054. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01054>
- Manachini, P. L., Fortina, M. G., Levati, L., & Parini, C. (1998). Contribution to Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacillus licheniformis and Description of new Genomovars. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(4), 520–529. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80064-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80064-7)
- Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. (2015). Taxonomía Polifásica y Variabilidad en el Género Trichoderma Polyphasic Taxonomy and Variability in the Genus Trichoderma. *Rev. Protección Veg. Número Especial (Diciembre)*, 30, 11–22. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30s1/rpv004s15.pdf>
- Montoya, H. (1997, December 1). TAXONOMÍA: CLASIFICACIÓN DE LOS SERES VIVOS. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*, 8(2). Retrieved from <http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/odont/article/view/326478>
- Montoya, H. (2008). Características microscópicas de los microorganismos. In *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Editorial Universidad de Antioquia. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?id=5RjS6B0X5RgC&pg=PA23&dq=tamaño+de+las+bacterias&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiStOHswJ3dAhVRzlkKHRPZDpoQ6AEIJTAA#v=onepage&q=tamaño de las bacterias&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=5RjS6B0X5RgC&pg=PA23&dq=tamaño+de+las+bacterias&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiStOHswJ3dAhVRzlkKHRPZDpoQ6AEIJTAA#v=onepage&q=tamaño+de+las+bacterias&f=false)
- Nagarajan, K., Loh, K.-C., & Swarup, S. (2013). Bioinformatics and molecular biology for the quantification of closely related bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6489–6502. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4943-5>
- Nancharaiyah, Y. V., & Lens, P. N. L. (2015). Ecology and biotechnology of selenium-respiring bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 79(1), 61–80. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00037-14>
- Oren, A. (2010). Microbial Metabolism: Importance for Environmental

- Biotechnology. In *Environmental Biotechnology* (pp. 193–255). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-140-0_5
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P., Palma, L., ... Caballero, P. (2014). Bacillus thuringiensis Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>
- Pedrosa, A. (1999). Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 3(2), 0–0. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011
- Peña, C. (2011). Métodos de Inferencia Filogenética. *Rev. Peru. Biol.*, 18(182), 265–267. Retrieved from http://alimentoseducaciononline.uta.edu.ec/pluginfile.php/31856/mod_resource/content/0/Arboles Filogeneticos.pdf
- Pinu, F. R., Granucci, N., Daniell, J., Han, T.-L., Carneiro, S., Rocha, I., ... Villas-Boas, S. G. (2018). Metabolite secretion in microorganisms: the theory of metabolic overflow put to the test. *Metabolomics*, 14(4), 43. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1339-7>
- Pokorna, D., & Jana, Z. (2015). Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1246–1259. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.02.007>
- Pukall, R. (2006). DNA Fingerprinting Techniques Applied to the Identification, Taxonomy and Community Analysis of Prokaryotes. In *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes* (pp. 51–82). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-31292-5_3
- Rinland, M. E., & Gómez, M. A. (2015). Isolation and characterization of onion degrading bacteria from onion waste produced in South Buenos Aires province, Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 487–497. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1803-8>
- Rogers, K. (2011). *Bacteria and viruses*. Britannica Educational Pub. in association with Rosen Educational Services.
- Rosenberg, E. (2013). Biotechnology and Applied Microbiology. In *The Prokaryotes* (pp. 315–328). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

https://doi.org/10.1007/978-3-642-30194-0_13

- Ruiu, L., & Luca. (2015). Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management. *Insects*, 6(2), 352–367. <https://doi.org/10.3390/insects6020352>
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1), 191–195. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63310-0>
- Şahin, B., Gomis-Cebolla, J., Güneş, H., & Ferré, J. (2018). Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates by their insecticidal activity and their production of Cry and Vip3 proteins. *PLOS ONE*, 13(11), e0206813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206813>
- Schlegel, H. (1996). TAXONOMÍA Y CRECIMIENTO BACTERIANO. In *Microbiología General* (2nd ed., pp. 55–64). Retrieved from <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/unidad-3-taxonomia-y-crecimiento-bacteriano.pdf>
- Schneider, M., & de Bruijn, F. J. (1996). Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(2), 163–174. <https://doi.org/10.1007/BF00364681>
- Shabayev, V. P. (2010). Effect of the introduction of the nitrogen-fixing bacteria *Pseudomonas putida* 23 on the nitrogen balance in soil. *Eurasian Soil Science*, 43(4), 436–441. <https://doi.org/10.1134/S1064229310040095>
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M., ... Bhargava, P. M. (2006). *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 56(7), 1465–1473. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64029-0>
- Simpson, R. (2005). The Economic Value of Genetic Diversity for Crop Improvement: Theory and Application. In *Agricultural Biodiversity and Biotechnology in Economic Development* (pp. 63–78). New York: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/0-387-25409-9_4

- Sivasakthi, S., Usharani, G., & Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 9(16), 1265–1277. <https://doi.org/10.5897/ajar2013.7914>
- Sneath, P. H. A. (2001). Numerical Taxonomy. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 39–42). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_6
- Stern, M. J., Ames, G. F., Smith, N. H., Robinson, E. C., & Higgins, C. F. (1984). Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, 37(3), 1015–1026. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6378385>
- Thompson, C. C., Amaral, G. R., Campeão, M., Edwards, R. A., Polz, M. F., Dutilh, B. E., ... Thompson, F. L. (2015). Microbial taxonomy in the post-genomic era: Rebuilding from scratch? Short history of microbial taxonomy. *Arch Microbiol*, 197, 359–370. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1071-2>
- Thompson, C. C., Chimetto, L., Edwards, R. A., Swings, J., Stackebrandt, E., & Thompson, F. L. (2013). Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics*, 14. Retrieved from <https://search.proquest.com/docview/1473989799/F03FD3AB774A4E91PQ/13?accountid=36765>
- Thomson, G. H. (2010). Biotecnología. *Revista Científica*, 20(3), 225–226. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300001
- Tindall, B. J. (2017). The consequences of *Bacillus axarquiensis* Ruiz-García et al. 2005, *Bacillus malacitensis* Ruiz-García et al. 2005 and *Brevibacterium halotolerans* Delaporte and Sasson 1967 (Approved Lists 1980) being treated as heterotypic synonyms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(1), 175–176. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001589>
- Valenzuela-Gonzalez, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., Vargas-Albores, F., Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., ... Vargas-Albores, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- Velázquez, P., Aragón, C., & Romero, A. (2012). Extracción y purificación de ADN.

- Retrieved from
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>
- Vilaseca, M. M., Mas, J., & Hernandez, J. M. (2012). IDENTIFICACION TAXONOMICA DE LAS BACTERIAS PROPIAS DE LOS FANGOS ACTIVADOS EN UNA DEPURADORA PILOTO DE AGUA RESIDUAL TEXTIL. (4. Retrieved from
<http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/6288/Article05.pdf?sequence=1>
- Wei, G., Pan, L., Du, H., Chen, J., & Zhao, L. (2004). ERIC-PCR Fingerprinting-Based Community DNA Hybridization to Pinpoint Genome-Specific Fragments as Molecular Markers to Identify and Track Populations Common to Healthy Human Guts. *Journal of Microbiological Methods*, 59(1), 91–108.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.06.007>
- Whitacre, D. M. (2015). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. (D. M. Whitacre, Ed.) (Vol. 234). Cham: Springer International Publishing.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-10638-0>
- Zhang, Z., Yin, L., Li, X., Zhang, C., Liu, C., & Wu, Z. (2018). The complete genome sequence of *Bacillus halotolerans* ZB201702 isolated from a drought- and salt-stressed rhizosphere soil. *Microbial Pathogenesis*, 123, 246–249.
<https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.07.019>

ANEXOS

ANEXO A. SOLUCIONES

Tabla A 1. Sistema de búfers (100 ml)

<i>pH</i>	<i>V. Ácido cítrico 0.1M (ml)</i>	<i>V. Fosfato de Sodio 0.2M (ml)</i>
3.5	69.75	30.25
4.5	54.57	45.43
5.5	43.13	56.87
6.5	29.04	70.96
7.5	7.62	92.38
	<i>V. Glicina 50 (ml) + Hidróxido de sodio 0.2M (ml)</i>	<i>V. Agua</i>
8.5	54	46
9.5	72.4	27.6

Tabla A 2. Búfer de extracción de ADN

<i>Soluciones</i>	<i>Volumen (ml)</i>
Glucosa 50 mM	100
Tris HCl 25 mM (pH 8)	100
EDTA 10 mM (pH 8)	100

Esterilizar por separado las soluciones a 121°C por 20 min. Hacer un stock de glucosa 0.5M, uno de Tris HCL 0.1M y uno de EDTA 0.05M. Mezclar los volúmenes adecuados para obtener 100 ml de búfer de extracción

Tabla A 3. Búfer TE 1X

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración</i>
Tris HCl (pH 8)	10 mM
EDTA (pH 8)	1 mM

Tabla A 4. Búfer TBE 10X

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad</i>
Tris Base	107.78
Ácido Bórico	7.44
EDTA-Na	55

ANEXO B. POSIBLES BACTERIAS DEGRADADORAS DE MATERIA ORGÁNICA

Tabla B 1. Características macroscópicas de las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica

<i>Código</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Margen</i>	<i>Color</i>	<i>Pig. Difusible Presencia (+) Ausencia (-)</i>	<i>Color</i>
<i>EG-001</i>	Rizoide	Plana	Filamentoso	White		
<i>EG-002</i>	Rizoide	Plana	Filamentoso	White		
<i>EG-003</i>	Circular	Plana	Entero	365 Vellum		
<i>EG-004</i>	Circular	Convexa	Entero	367 Manilla		
<i>EG-005</i>	Irregular	Plana	Entero	365 Vellum		
<i>EG-006</i>	Irregular	Plana	Lobado	367 Manilla		
<i>EG-007</i>	Irregular	Plana	Ondulado	White		
<i>EG-008</i>	Irregular	Plana	Ondulado	White		
<i>EG-009</i>	Circular	Plana	Entero	White		
<i>EG-010</i>	Filamentosa	Plana	Filamentoso	White		
<i>EG-011</i>	Circular	Plana	Entero	384 Ligth Straw		
<i>EG-015</i>	Irregular	Plana	Lobado	White		
<i>EG-016</i>	Irregular	Plana	Ondulado	White		
<i>EG-017</i>	Irregular	Plana	Ondulado	White		
<i>EG-018</i>	Irregular	Umbonada	Lobado	White		
<i>EG-019</i>	Circular	Umbonada	Entero	365 Verllum		
<i>EG-020</i>	Irregular	Umbonada	Lobado	White		
<i>EG-021</i>	Irregular	Umbonada	Lobado	White		
<i>EG-022</i>	Irregular	Plana	Ondulado	384Camouflage beige	+	384Camouflage beige
<i>EG-023</i>	Irregular	Umbonada	Ondulado	365 Vellum		
<i>EG-024</i>	Irregular	Umbonada	Ondulado	365 Vellum		
<i>EG-025</i>	Irregular	Plana	Ondulado	384Camouflage beige	+	384Camouflage beige

Tabla B 2. Características microscópicas de las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica

<i>Código</i>	<i>Forma</i>	<i>Tinción Gram</i> <i>Positivo (+)</i> <i>Negativo (-)</i>	<i>Cápsulas</i> <i>Presencia (+)</i> <i>Ausencia (-)</i>	<i>Endosporas</i> <i>Presencia (+)</i> <i>Ausencia (-)</i>
EG-001	Bacilar	+	-	+
EG-002	Bacilar	+	-	+
EG-003	Bacilar	+	-	+
EG-004	Bacilar	+	-	+
EG-005	Bacilar	+	-	+
EG-006	Bacilar	+	-	+
EG-007	Bacilar	+	-	+
EG-008	Bacilar	+	-	+
EG-009	Bacilar	+	-	+
EG-010	Bacilar	+	-	+
EG-011	Bacilar	+	-	+
EG-015	Bacilar	+	-	+
EG-016	Bacilar	+	-	+
EG-017	Bacilar	+	-	+
EG-018	Bacilar	+	-	+
EG-019	Bacilar	+	-	+
EG-020	Bacilar	+	-	+
EG-021	Bacilar	+	-	+
EG-022	Bacilar	+	-	+
EG-023	Bacilar	+	-	+
EG-024	Bacilar	+	-	+
EG-025	Bacilar	+	-	+

Tabla B 3. Clasificación de las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica en función al pH, salinidad y temperatura

<i>Código Tesis</i>	<i>Característica</i>		
	<i>Salinidad</i>	<i>Temperatura</i>	<i>pH</i>
EG-001	Halófilo débil	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-002	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-003	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-004	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-005	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-006	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-007	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-008	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-009	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-010	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-011	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-015	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-016	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-017	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-018	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-019	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-020	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-021	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-022	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-023	Halófilo Extremo	Mesófilo	Neutrófilo
EG-024	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-025	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante

Tabla B 5. Secuencias del gen ADNr 16S de las posibles bacterias degradadoras de materia orgánica

Código	Secuencia del gen ADNr 16S (5' - 3')	Identificación	Número de nucleótidos
EG-003	<p>AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCCGATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCA TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCAAGAGTAACGTCTGCACCTTGACG GTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT GAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTCCG CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGAGTACGGTCCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAG CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCCGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCTTATGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGCTGCAACTCGACTGCGTGAA GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATG GAGCCAGCCCGCAAAGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTA</p>	<p><i>Bacillus stratosphericus</i></p>	<p>1499</p>
EG-004	<p>CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATCGATGGGAGCTTGCTCCCTGAGATTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTATAAGACTG GGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTTCTTTCTCGCATGAGAGAAGATGGAAGACGGTTTACGCTGTACTTATAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG GTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGAC GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGAAGAAGGCCTTCGGGTGCTAAAGTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCAGAGTAACGTGTTGACGCTACCTAACCAGAAAG CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCA ACCGTGGAGGGTCAATTGAAAACCTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTG GTCTGTAACGTGACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAG CTAACGCATTAAGCACTCCGCCGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACCGCAAGAACCTT ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCTTCCGGGGACAGAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA CGAGCCAAACCTTATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTA CACACGTGCTACAATGGATGGTACAAGGGCTGCAAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCCATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGCAAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTA GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTGTACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTATGAGCCAGCCGCTA AGGTGGGACAGATGATTGGGGTG</p>	<p><i>B. simplex</i></p>	<p>1477</p>

EG-005	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACT GGGATAACTCCGGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAAGACGGTTTTCCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCCATTAGCTAGTTGGTG AGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAACAAGTGAAGAGTAACCTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTC AACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT GGTCTGTAACGTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCA GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGGAAGAAC TTACCAGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA CGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA CACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTA GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCC AAAGTGGGGCAGATGATTGGGGTGA</p>	<p><i>B. stratosphericus</i> 1478</p>
EG-007	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACT GGGATAACTCCGGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAAGACGGTTTTCCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCCATTAGCTAGTTGGTG AGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAACAAGTGAAGAGTAACCTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTC AACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT GGTCTGTAACGTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCA GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACCGGAAGAAC TTACCAGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA CGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA CACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTA GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCC AAAGTGGGGCAGATGATTGGGGTGA</p>	<p><i>B. stratosphericus</i> 1478</p>
EG-008	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTTATAGT TTGGGATAACTCCGGGAAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTGTTCCACCTCATGTTGGAACTGAAAGACGGTTTTCCGGCTGTGCTATAAGATGGGCCCCGGCGCATTAGCTAGTTGGT GAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATG GGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCGCGTGAAGTGAAGAAAGTTTTCCGATCGTAAAACCTGTTGTAAGGGGAAGAAACAAGTACAGTAGTAACCTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGA AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCAGGC TCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAAGAGGAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT CTGGTCTGTAACGTGACCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTCGTAGTCCACCGGTAACAGTATGAGTGTAAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTG CAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACCGGAAGAA CCTTACCAGTCTTGACATCCCCTTGACCACTGATAGATATAGTTTCCCTTCGGGGGCAACCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG CTACACACGTGCTACAATGGACGATACAAAACGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCCTACATGAAGCCGGAATCG CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCC CGAAAGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTC</p>	<p><i>Lysinibacillus pakistanensis</i> 1485</p>

EG-009	<p>AGAGTTTGTATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA ACCTGCCATAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCTCGC ATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGTAGTGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAATACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGA CGGTACTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTTAGGGCGTAAAGCGCGCCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGAT GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACAGT GGCGAAGGGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTC CGCCCTTATGTGCTGAAGTTAACGATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGA AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTT GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTANTTGCATCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCGGGTACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCC CCTTATGACGTGGGTACA</p>	<i>B. albus</i>	1229
EG-010	<p>TAATACATGCAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGTTCCTTAGTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGGCTAA TACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCCTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGCGACGATG CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG TGAGTGTAAAGGTTTTCCGATCGTAAACTCTGTGTTAGGGAAGAACAAGTACCCTTGAATAGGGCGGCACCTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTTAGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAACTG GGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCG AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTATGTCTGCAGCAAAACGCTAAGCACTCCGCTG GGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA ACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCCGGGGCAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGC CAGCATTCAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGTTGACAACCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAATGGGCAGAAACA AAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAATCTGTTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCCGGGATCAGCATGCCCGCG TGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGTAACCTTTTGAGGCCAGCCGCCAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGA A</p>	<i>B. licheniformis</i>	1453
EG-015	<p>GTCAGGACGAAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGTCTCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTG GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCCTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGA GGTAACGGCTCACCAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA CGAAAGTCTGACGGAGCAACCGCGCTGAGTGTGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTGTTAGGGAAGAACAAGTACCCTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACTAACCAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGAATTTAGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCT CAACCGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC TGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGGCTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTATGTCTGC AGCTAACGCTAATAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAAC CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCGCCCTTCGGGGGCGAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTGGGTTAAGTCCC ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGTTGACAACCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCT ACACACGTGTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAATCTGTTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCT AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGTAACCTTTATGAGGCCAGCCCG GAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGA</p>	<i>B. halotolerans</i>	1478

EG-016	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAACCGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTTGGGGCTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTTTGACATCCTTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGACAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCAGGTTAAGCCAATCCACAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGA</p>	<i>B. halotolerans</i> 1479
EG-019	<p>TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAACCGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTTGGGGCTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTTTGACATCCTTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGACAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCAGGTTAAGCCAATCCACAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGA</p>	<i>B. halotolerans</i> 1477
EG-20	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAACCGGGCTAATACCGGATGCTTGAATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAAGGTGGCTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTTGGGGCTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTTTGACATCCTTGACAACCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGGACAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGTACAATGGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCAGGTTAAGCCAATCCACAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCA</p>	<i>B. haynesii</i> 1483

EG-021	<p>CTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA</p> <p>GGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA</p> <p>CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTGCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAA</p> <p>AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT</p> <p>CAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC</p> <p>TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTGTAGTCTGC</p> <p>AGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACA</p> <p>CTTACCAGGTCTTGACATCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGGCAGAGTGCAGAGTGGTGCATGGTTGTCGTACAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA</p> <p>ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT</p> <p>ACACAGTGTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCT</p> <p>AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCAGGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCCGGTGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCC</p> <p>AAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGA</p>	<i>B. haynesii</i>	1478
EG-022	<p>CAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGG</p> <p>ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGTTAGTTGGTGAAGT</p> <p>AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA</p> <p>AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTACCGTTGCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGC</p> <p>CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAAC</p> <p>CGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT</p> <p>CTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTGTAGTCTGCAGCT</p> <p>AACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA</p> <p>CCAGGTCTTGACATCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGTGCAGAGTGGTGCATGGTTGTCGTACAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA</p> <p>GCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC</p> <p>ACGTGTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCAAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTA</p> <p>ATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCAGGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCCGGTGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGA</p> <p>GGTGGGACAGATGATTGGGGTGA</p>	<i>B. subtilis</i>	1476
EG-023	<p>CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCTGTAAG</p> <p>ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAAGGTGGCTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG</p> <p>GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA</p> <p>TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTGCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAAC</p> <p>AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC</p> <p>GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC</p> <p>TCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTGTAGTGC</p> <p>TGCAGCAAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAG</p> <p>AACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGGCAGAGTGCAGAGTGGTGCATGGTTGTCGTACAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC</p> <p>GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG</p> <p>GCTACACAGTGTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATC</p> <p>GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCAGGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCCGGTGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCC</p> <p>CCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGA</p>	<i>B. haynesii</i>	1482

EG-025

CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG
ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGTTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAAACCTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT
CTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCT
GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
CTACACAGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCG
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCT

B. subtilis

1439

Tabla B 6. Porcentaje de similitud y número de nucleótidos diferentes entre posibles bacterias degradadoras de materia orgánica y varias especies del género *Bacillus* y *Lysinibacillus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1	---	41/1453	42/1453	41/1453	41/1453	98/1453	97/1453	88/1455	88/1455	88/1455	6/1455	24/1454	25/1454	5/1455	5/1407	116/1451	116/1430	114/1452	42/1453	97/1452	42/1453	42/1453	111/1451	67/1189	28/1450	4/1455	4/1455	4/1455	20/1454	20/145	2/1455	20/1454	2/1413	
2	97.1	---	1/1454	0/1454	0/1454	85/1454	86/1454	86/1453	86/1453	86/1453	39/1453	53/1452	53/1452	42/1453	41/1405	112/1452	112/1431	109/1453	1/1454	84/1453	1/1454	1/1454	108/1453	64/1187	54/1448	41/1453	41/1453	41/1453	50/1452	50/145	43/1453	50/1452	40/1411	
3	97.1	99.93	---	1/1454	1/1454	86/1454	87/1454	87/1453	87/1453	40/1453	54/1452	54/1452	43/1453	42/1405	113/1452	113/1431	110/1453	2/1454	85/1453	2/1454	2/1454	109/1452	65/1187	55/1448	42/1453	42/1453	42/1453	51/1452	51/145	44/1453	51/1452	41/1411		
4	97.1	100.00	99.93	---	0/1454	85/1454	86/1454	86/1453	86/1453	86/1453	39/1453	53/1452	53/1452	42/1453	41/1405	112/1452	112/1431	109/1453	1/1454	84/1453	1/1454	1/1454	108/1452	64/1187	54/1448	41/1453	41/1453	41/1453	50/1452	50/145	43/1453	50/1452	40/1411	
5	97.1	100.00	99.93	100.00	---	85/1454	86/1454	86/1453	86/1453	86/1453	39/1453	53/1452	53/1452	42/1453	41/1405	112/1452	112/1431	109/1453	1/1454	84/1453	1/1454	1/1454	108/1452	64/1187	54/1448	41/1453	41/1453	41/1453	50/1452	50/145	43/1453	50/1452	40/1411	
6	93.2	94.15	94.09	94.15	94.15	---	10/1456	78/1453	78/1453	78/1453	98/1453	91/1452	91/1452	93/1453	92/1405	98/1452	102/1431	100/1453	86/1454	3/1455	86/1454	86/1454	99/1452	63/1187	93/1448	94/1453	94/1453	94/1453	91/1452	91/145	98/1453	91/1452	95/1411	
7	93.3	94.09	94.02	94.09	94.09	99.31	---	80/1453	80/1453	80/1453	80/1453	97/1453	94/1452	94/1452	92/1453	91/1405	98/1452	102/1431	102/1453	87/1454	9/1455	87/1454	87/1454	101/1452	63/1187	97/1448	93/1453	93/1453	93/1453	92/1452	92/145	97/1453	92/1452	94/1411
8	93.9	94.08	94.01	94.08	94.08	94.63	94.49	---	0/1457	0/1457	0/1457	87/1455	88/1454	90/1454	90/1455	89/1407	110/1453	107/1432	103/1454	87/1453	81/1452	87/1453	107/1453	1/1191	91/1450	89/1455	89/1455	89/1455	86/1454	86/145	89/1455	86/1454	87/1413	
9	93.9	94.08	94.01	94.08	94.08	94.63	94.49	100.00	---	0/1457	0/1457	87/1455	88/1454	90/1454	90/1455	89/1407	110/1453	107/1432	103/1454	87/1453	81/1452	87/1453	107/1453	1/1191	91/1450	89/1455	89/1455	89/1455	86/1454	86/145	89/1455	86/1454	87/1413	
10	93.9	94.08	94.01	94.08	94.08	94.63	94.49	100.00	100.00	---	0/1457	87/1455	88/1454	90/1454	90/1455	89/1407	110/1453	107/1432	103/1454	87/1453	81/1452	87/1453	107/1453	1/1191	91/1450	89/1455	89/1455	89/1455	86/1454	86/145	89/1455	86/1454	87/1413	
11	93.9	94.08	94.01	94.08	94.08	94.63	94.49	100.00	100.00	100.00	---	87/1455	88/1454	90/1454	90/1455	89/1407	110/1453	107/1432	103/1454	87/1453	81/1452	87/1453	107/1453	1/1191	91/1450	89/1455	89/1455	89/1455	86/1454	86/145	89/1455	86/1454	87/1413	
12	99.5	97.32	97.25	97.32	97.32	93.26	93.32	94.02	94.02	94.02	---	---	25/1454	25/1454	25/1406	114/1451	119/1430	114/1430	114/1452	40/1453	40/1453	40/1453	114/1451	66/1189	26/1450	4/1455	4/1455	22/1454	22/145	6/1455	22/1454	4/1413		
13	98.3	96.35	96.28	96.35	96.35	93.73	93.53	93.95	93.95	93.95	93.95	98.21	---	3/1455	25/1454	25/1406	114/1451	114/1430	114/1452	54/1452	90/1451	54/1452	54/1452	111/1451	65/1189	6/1451	24/1454	24/1454	4/1455	4/1455	24/1454	4/1455	23/1412	
14	98.2	96.35	96.28	96.35	96.35	93.73	93.53	93.81	93.81	93.81	93.81	98.28	99.79	---	26/1454	26/1406	114/1451	114/1430	114/1452	54/1452	90/1451	54/1452	54/1452	111/1451	67/1189	3/1451	25/1454	25/1454	25/1454	7/1455	7/1455	25/1454	7/1455	24/1412
15	99.6	97.11	97.04	97.11	97.11	93.60	93.67	93.81	93.81	93.81	93.81	99.66	98.28	98.21	---	0/1407	114/1451	114/1430	116/1452	43/1453	92/1452	43/1453	43/1453	111/1451	69/1189	29/1450	1/1455	1/1455	1/1455	21/1454	21/145	5/1455	21/1454	3/1413
16	99.6	97.08	97.01	97.08	97.08	93.45	93.52	93.67	93.67	93.67	93.67	99.64	98.22	98.15	100.00	---	113/1403	114/1404	115/1404	41/1405	91/1404	41/1405	41/1405	110/1404	69/1176	29/1406	1/1407	1/1407	1/1407	21/1406	21/140	5/1407	21/1406	3/1400
17	92.0	92.29	92.22	92.29	92.29	93.25	93.25	92.43	92.43	92.43	92.43	91.80	92.14	92.14	91.95	---	10/1434	18/1456	113/1452	101/1451	113/1452	113/1452	12/1455	93/1188	117/1447	115/1451	115/1451	115/1451	112/1451	112/1451	117/1451	112/1451	115/1409	
18	91.8	92.17	92.10	92.17	92.17	92.87	92.87	92.53	92.53	92.53	92.53	91.68	92.03	92.03	92.03	91.88	99.30	---	18/1435	112/1431	105/1430	112/1431	112/1431	10/1435	91/1189	117/1426	115/1430	115/1430	115/1430	112/1430	112/14	117/1430	112/1430	116/1410
19	92.1	92.50	92.43	92.50	92.50	93.12	92.98	92.92	92.92	92.92	92.92	91.94	92.15	92.15	92.01	91.81	98.76	98.75	---	110/1453	103/1452	110/1453	110/1453	14/1456	86/1189	117/1448	115/1452	115/1452	115/1452	112/1452	112/14	115/1452	112/1452	113/1410
20	97.1	99.93	99.86	99.93	99.93	94.09	94.02	94.01	94.01	94.01	94.01	97.25	96.28	96.28	97.04	97.08	92.22	92.17	92.43	---	85/1453	0/1454	0/1454	109/1452	64/1187	55/1448	42/1453	42/1453	42/1453	51/1452	51/145	44/1453	51/1452	40/1411
21	93.3	94.22	94.15	94.22	94.22	99.79	99.38	94.42	94.42	94.42	94.42	93.32	93.80	93.80	93.66	93.52	93.04	92.66	92.91	94.15	---	85/1453	85/1453	102/1451	63/1187	92/1447	93/1452	93/1452	93/1452	90/1451	90/145	97/1452	90/1451	93/1410
22	97.1	99.93	99.86	99.93	99.93	94.09	94.02	94.01	94.01	94.01	94.01	97.25	96.28	96.28	97.04	97.08	92.22	92.17	92.43	100.00	94.15	---	0/1454	109/1452	64/1187	55/1448	42/1453	42/1453	42/1453	51/1452	51/145	44/1453	51/1452	40/1411
23	97.1	99.93	99.86	99.93	99.93	94.09	94.02	94.01	94.01	94.01	94.01	97.25	96.28	96.28	97.04	97.08	92.22	92.17	92.43	100.00	94.15	100.00	---	109/1452	64/1187	55/1448	42/1453	42/1453	42/1453	51/1452	51/145	44/1453	51/1452	40/1411
24	92.3	92.57	92.49	92.56	92.56	93.18	93.04	92.64	92.64	92.64	92.14	92.35	92.35	92.35	92.17	99.18	99.30	99.04	92.49	92.97	92.49	92.49	---	90/1189	114/1447	110/1451	110/1451	110/1451	110/1451	109/1451	109/14	112/1451	109/1451	110/1410
25	94.3	94.61	94.52	94.61	94.61	94.69	94.69	99.92	99.92	99.92	99.92	94.45	94.53	94.37	94.20	94.13	92.17	92.35	92.77	94.61	94.69	94.61	94.61	92.43	---	68/1185	68/1189	68/1189	68/1189	63/1189	63/118	68/1189	63/1189	68/1189
26	98.0	96.27	96.20	96.27	96.27	93.58	93.30	93.72	93.72	93.72	93.72	98.21	99.59	99.79	98.00	97.94	91.91	91.80	91.92	96.20	93.64	96.20	96.20	92.12	94.26	---	28/1450	28/1450	28/1450	10/1451	10/145	28/1450	10/1451	27/1408
27	99.7	97.18	97.11	97.18	97.18	93.53	93.60	93.88	93.88	93.88	93.88	99.73	98.35	98.28	99.93	99.93	92.07	91.96	92.08	97.11	93.60	97.11	97.11	92.42	94.28	98.07	---	0/1455	0/1455	20/1454	20/145	4/1455	20/1454	2/1413
28	99.7	97.18	97.11	97.18	97.18	93.53	93.60	93.88	93.88	93.88	93.88	99.73	98.35	98.28	99.93	99.93	92.07	91.96	92.08	97.11	93.60	97.11	97.11	92.42	94.28	98.07	100.00	---	0/1455	20/1454	20/145	4/1455	20/1454	2/1413
29	99.7	97.18	97.11	97.18	97.18	93.53	93.60	93.88	93.88	93.88	93.88	99.73	98.35	98.28	99.93	99.93	92.07	91.96	92.08	97.11	93.60	97.11	97.11	92.42	94.28	98.07	100.00	---	20/1454	20/145				

ANEXO C. POSIBLES BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

Tabla C 1. Características macroscópicas de las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno

<i>Código</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Margen</i>	<i>Color</i>
<i>EG-026</i>	Circular	Convexa	Entero	Translúcida
<i>EG-027</i>	Circular	Convexa	Entero	Translúcida
<i>EG-028</i>	Circular	Convexa	Entero	Translúcida
<i>EG-029</i>	Circular	Convexa	Entero	352 Pale cream
<i>EG-030</i>	Circular	Convexa	Entero	White
<i>EG-031</i>	Circular	Convexa	Entero	352 Pale cream
<i>EG-032</i>	Circular	Convexa	Entero	White
<i>EG-033</i>	Circular	Convexa	Entero	White
<i>EG-034</i>	Circular	Umbonada	Entero	White
<i>EG-035</i>	Circular	Convexa	Entero	352 Pale cream
<i>EG-036</i>	Circular	Convexa	Entero	352 Pale cream
<i>EG-037</i>	Circular	Convexa	Entero	352 Pale cream

Tabla C 2. Características microscópicas de las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno

<i>Código</i>	<i>Forma</i>	<i>Tinción Gram</i> <i>Positivo (+)</i> <i>Negativo (-)</i>	<i>Cápsulas</i> <i>Presencia (+)</i> <i>Ausencia (-)</i>	<i>Endosporas</i> <i>Presencia (+)</i> <i>Ausencia (-)</i>
EG-026	Bacilar	-	-	-
EG-027	Bacilar	-	-	-
EG-028	Bacilar	-	-	-
EG-029	Bacilar	-	-	-
EG-030	Bacilar	-	-	-
EG-031	Bacilar	-	-	-
EG-032	Bacilar	-	-	-
EG-033	Bacilar	-	-	-
EG-034	Bacilar	-	-	-
EG-035	Bacilar	-	-	-
EG-036	Bacilar	-	-	-
EG-037	Bacilar	-	-	-

Tabla C 3. Clasificación de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno al pH, salinidad y temperatura

<i>Código Tesis</i>	<i>Característica</i>		
	<i>Salinidad</i>	<i>Temperatura</i>	<i>pH</i>
EG-026	Halófilo débil	Psicrótrofo	Acidófila
EG-027	Halófilo débil	Psicrótrofo	Acidófila
EG-028	Halófilo débil	Mesófilo	Acidófila
EG-029	Halófilo débil	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-030	Halófilo débil	Mesófilo	Neutrotolerante
EG-031	Halófilo débil	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-032	Halófilo débil	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-033	Halófilo débil	Mesófilo	Neutrotolerante
EG-034	Halófilo débil	Mesófilo	Neutrotolerante
EG-035	Halófilo débil	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-036	Halófilo débil	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-037	Halófilo débil	Mesófilo	Alcalitolerante

Tabla C4. Matriz de taxonomía numérica de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno

Código	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS							CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS			PRUEBAS FISIOLÓGICAS																																				
	FORMA			ELEVACIÓN	MARGEN		Color Cobria		Forma de la Célula	Tinción Gram	Tinciones Extras	Salinidad(%)					Enzimas Extracelulares			pH							Fuente Única de Carbono y Nitrógeno										Temperatura										
	Circular	Convexa	Umbonada	Entero	White	White (Tr.)	352	Pale cream	Bacilar	Positivo	Endosporas	Cápsulas	0,005	0,05	0,5	1	2	Celulosa	Almidón	Quitina	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	Treonina	A. Aspártico	A. Glutámico	Fenilalanina	Tirosina	Asparagina	Valina	Lisina	Leucina	Alanina	Histidina	Arginina	Cisteína	4°C	37°C					
EG-026	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0			
EG-027	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
EG-028	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
EG-029	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1			
EG-030	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
EG-031	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1		
EG-032	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1		
EG-033	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
EG-034	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
EG-035	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
EG-036	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
EG-037	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	

Tabla C 5. Secuencias del gen ADNr 16 S de las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno

Código	Secuencia del gen ADNr 16S (5' - 3')	Identificación	Número de nucleótidos
EG-029	<p>GCTCAGATTGAACGCTGGCGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACG GGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGA GGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTTGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG GGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTT AATAACCTCGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTA ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAA CTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAG GCGGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACG ATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACA TCCAGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGTCTGTTGTGAAATGTT GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTTGTTGCCAGCGTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGG AGGAAGTGGGGATGACGTC AAGTCAATGAGTCCCTTACGATGGCCCTTACGATGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACC TCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGATGTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATC GTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTA GCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTGATGACTGGGGTGA</p>	<p><i>Enterobacter asburiae</i></p>	<p>1469</p>
EG-032	<p>CGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC GCAAGACCAAAGAGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTTGGGTAACGGCTCACCTAG GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAA GGCGTTGAGGTTAATAACCTCAGCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAG GGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGCGGCTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA ACTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAAT ACCGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC CACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGTAACCGGTTAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACG GCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACCGCAAGAACCTT ACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTCAGCTCG TGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGC CAGTGATAAACTGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCAATGTCATGTCCTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATA AAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGATGTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG GAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTG CAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTGATGACTGGGGTGA</p>	<p><i>E. tabaci</i></p>	<p>1394</p>

EG-033

CTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCCCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAA
CATAACCTTTCTGCGGAATAGCTCCGGGAAACTGGAATTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGATTTATCGGGGAAGGATTGGC
CCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGAC
TGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAGTG
ATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAAGGGGTGAAATCCC
AGAGCTCAACTCTGGAACCTGCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTA
GATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTCCGGCAGTATACTGTTCCGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCC
GCCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAACACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTGGAAGCA
ACGCGCAGAACCTTACCAGCTCTTGACATTCGGGGTTTGGGCAGTGGAGACATTTGCTTCAGTTAGGCTGGCCCCAGAACAGGTGCTG
CATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGG
CACTTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAG
TGCTACAATGGTGGTACAGTGGGCAGCGAGACAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACT
CGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGTAGTGCGCTAACCCGAAGGAGGCAGCTAACCCAGGTAGGGTCCGCGACTGGGGTGA

Agrobacterium tumefaciens

1413

EG-035

CTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGCACCTTTGAGAGCGGGACGGGTGA
GTAAAGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGCTACGGGAGAAAAGCAGGGG
ACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGAGTAATGGCTACCAAGGGCAGCATCCGTAACCTGG
TCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGACAATGGGCGA
AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGTCTTCGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACG
TTAGTGTGTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAACTGTGCG
AGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACC
ACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCA
ACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACCGCATTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACTCA
AATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAAT
GAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCATAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTATGGTGGGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAA
GGTGGGATGACGTCAAGTCAATGCGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGA
GGTGGAGCTAATCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAAT
CAGAATGTCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATTGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAA
CCTTCGGGGGACGGTTACCACGGTGTGATTACTGACTGGGGTGAAGTCGTAA

*Pseudomonas
brassicacearum*

1473

EC-037

TCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGCACCTTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAG
TAAAGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCTTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGGCAGGATCCGTAACCTGGT
CTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAA
AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGT
TAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGGTAATACAGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAA
TTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGTGCA
GCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCA
CCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAA
CTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACTCAA
ATGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAATG
AACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGCTTAGTTACCAGCACGTCATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACGGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAG
GTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATC
AGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGACAGAAAGTAGCTAGCTAACC
TTCGGGGGACGGTTACCACGGTGTGATTGACTGGGGTGA

P. brassicearum

1464

Tabla C 6. Porcentaje de similitud y número de nucleótidos diferentes entre posibles bacterias fijadoras de nitrógeno y varias especies del género *Enterobacter*, *Leclercia*, *Agrobacterium* y *Pseudomonas*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	---	25/1469	20/1385	297/1396	203/1463	204/1461	202/1452	297/1408	300/1408	300/1402	300/1394	24/1461	21/1422	26/1456	32/1470	30/1466	21/1469	3/1394	298/1407	206/1462	206/1461
2	98.30	---	26/1385	295/1396	209/1461	210/1459	208/1450	295/1408	298/1408	296/1402	298/1394	0/1461	22/1422	14/1456	33/1469	27/1466	18/1469	12/1394	296/1407	211/1460	211/1459
3	98.56	98.12	---	282/1344	188/1383	189/1382	187/1383	281/1344	278/1344	281/1344	282/1336	25/1383	19/1349	23/1381	10/1385	20/1383	20/1385	17/1385	282/1344	191/1383	191/1383
4	78.72	78.87	79.02	---	290/1395	288/1394	287/1395	5/1402	22/1402	24/1402	22/1394	294/1394	287/1360	292/1390	300/1396	301/1394	299/1396	287/1351	1/1402	291/1395	291/1395
5	86.12	85.69	86.41	79.21	---	12/1464	6/1455	290/1407	289/1407	280/1401	282/1393	208/1453	197/1414	204/1448	206/1462	203/1458	202/1461	193/1392	291/1406	8/1465	8/1464
6	86.04	85.61	86.32	79.34	99.18	---	9/1453	288/1406	287/1406	280/1400	282/1392	209/1451	197/1412	204/1446	207/1460	204/1456	202/1459	195/1391	289/1405	10/1463	10/1462
7	86.09	85.66	86.48	79.43	99.59	99.38	---	285/1396	284/1396	277/1396	279/1388	207/1448	197/1414	204/1443	204/1451	203/1447	201/1450	192/1392	286/1396	5/1455	5/1455
8	78.91	79.05	79.09	99.64	79.39	79.52	79.58	---	17/1414	27/1408	25/1400	294/1400	285/1361	293/1396	301/1408	301/1406	299/1408	286/1351	4/1413	291/1406	291/1405
9	78.69	78.84	79.32	98.43	79.46	79.59	79.66	98.80	---	28/1408	24/1400	297/1400	288/1361	296/1396	298/1408	300/1406	302/1408	289/1351	21/1413	290/1406	290/1405
10	78.60	78.89	79.09	98.29	80.01	80.00	80.16	98.08	98.01	---	4/1400	295/1400	284/1361	293/1396	299/1402	302/1400	300/1402	288/1351	23/1408	281/1401	281/1401
11	78.48	78.62	78.89	98.42	79.76	79.74	79.90	98.21	98.29	99.71	---	297/1392	286/1361	295/1388	301/1394	304/1392	302/1394	289/1343	21/1400	283/1393	283/1393
12	98.36	100.00	98.19	78.91	85.68	85.60	85.70	79.00	78.79	78.93	78.66	---	21/1420	13/1454	31/1461	26/1458	17/1461	11/1392	295/1400	210/1453	210/1453
13	98.52	98.45	98.59	78.90	86.07	86.05	86.07	79.06	78.84	79.13	78.99	98.52	---	7/1415	18/1422	15/1419	4/1422	6/1358	286/1361	199/1414	199/1414
14	98.21	99.04	98.33	78.99	85.91	85.89	85.86	79.01	78.80	79.01	78.75	99.11	99.51	---	19/1456	21/1453	11/1456	10/1389	293/1396	206/1448	206/1448
15	97.82	97.75	99.28	78.51	85.91	85.82	85.94	78.62	78.84	78.67	78.41	97.88	98.73	98.70	---	29/1466	21/1469	17/1394	302/1407	209/1461	209/1460
16	97.95	98.16	98.55	78.41	86.08	85.99	85.97	78.59	78.66	78.43	78.16	98.22	98.94	98.55	98.02	---	14/1466	14/1391	302/1405	206/1457	206/1456
17	98.57	98.77	98.56	78.58	86.17	86.15	86.14	78.76	78.55	78.60	78.34	98.84	99.72	99.24	98.57	99.05	---	6/1394	300/1407	205/1460	205/1459
18	99.78	99.14	98.77	78.76	86.14	85.98	86.21	78.83	78.61	78.68	78.48	99.21	99.56	99.28	98.78	98.99	99.57	---	287/1351	196/1392	196/1392
19	78.82	78.96	79.02	99.93	79.30	79.43	79.51	99.72	98.51	98.37	98.50	78.93	78.99	79.01	78.54	78.51	78.68	78.76	---	292/1406	292/1405
20	85.91	85.55	86.19	79.14	99.45	99.32	99.66	79.30	79.37	79.94	79.68	85.55	85.93	85.77	85.69	85.86	85.96	85.92	79.23	---	0/1464
21	85.90	85.54	86.19	79.14	99.45	99.32	99.66	79.29	79.36	79.94	79.68	85.55	85.93	85.77	85.68	85.85	85.95	85.92	79.22	100.00	---

Leyenda: 1.- *Enterobacter tabaci* (NR146667), 2.- *Leclercia adecarboxylata* (NR104933), 3.- *Cedecea davisae* (NR025243), 4.- *Agrobacterium tumefaciens* (NR041396), 5.- *Pseudomonas kilonensis* (NR028929), 6.- *P. lini* (NR029042), 7.- *P. brassicaearum* sus.p *neaurantiaca* (NR116299), 8.- *Beijerinckia fluminensis* (NR116306), 9.- *A. fabrum* (NR074266), 10.- *A. rubi* (NR113608), 11.- *Rhizobium skirniawicense* (NR118035), 12.- *L. adecarboxylata* (NR117405), 13.- *E. asburiae* (NR024640), 14.- *E. cancerogenus* (NR044977), 15.- *C. lapagel* (NR126319), 16.- *E. Soli* ATCC BAA-2012 (NR117547), 17.-EG-029, 18.-EG-032, 19.- EG-033, 20.- EG-035, 21.- EG-037

ANEXO D. POSIBLES BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS

Tabla D 1. Características macroscópicas de las posibles bacterias entomopatógenas

<i>Código</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Margen</i>	<i>Color</i>
<i>EG-012</i>	Circular	Plana	Entero	367 Manilla
<i>EG-013</i>	Irregular	Umbonada	Lobado	White
<i>EG-014</i>	Irregular	Plana	Ondulado	365 Vellum
<i>EG-038</i>	Circular	Plana	Ondulado	White
<i>EG-039</i>	Irregular	Plana	Entero	352 Pale cream
<i>EG-040</i>	Circular	Plana	Entero	352 Pale cream
<i>EG-041</i>	Circular	Plana	Ondulado	365 Vellum
<i>EG-042</i>	Irregular	Plana	Filamentoso	White
<i>EG-043</i>	Irregular	Plana	Ondulado	366 Vellum
<i>EG-044</i>	Irregular	Plana	Ondulado	352 Pale cream

Tabla D 2. Características microscópicas de las posibles bacterias entomopatógenas

<i>Código</i>	<i>Forma</i>	<i>Tinción Gram</i> <i>Positivo (+)</i> <i>Negativo (-)</i>	<i>Cápsulas</i> <i>Presencia (+)</i> <i>Ausencia (-)</i>	<i>Endosporas</i> <i>Presencia (+)</i> <i>Ausencia (-)</i>
EG-012	Bacilar	+	-	+
EG-013	Bacilar	+	-	+
EG-014	Bacilar	+	-	+
EG-038	Bacilar	+	-	+
EG-039	Bacilar	+	-	+
EG-040	Bacilar	+	-	+
EG-041	Bacilar	+	-	+
EG-042	Bacilar	+	-	+
EG-043	Bacilar	+	-	+
EG-044	Bacilar	+	-	+

Tabla D 3. Clasificación de las posibles bacterias entomopatógenas en función al pH, salinidad y temperatura

<i>Código Tesis</i>	<i>Característica</i>		
	<i>Salinidad</i>	<i>Temperatura</i>	<i>pH</i>
EG-012	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-013	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-014	Halófilo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-038	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-039	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-040	Halófilo Extremo	Mesófilo extremo	Alcalitolerante
EG-041	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-042	Halófilo Extremo	Mesófilo	Alcalitolerante
EG-043	Halófilo Extremo	Mesófilo extremo	Alcalitolerante
EG-044	Halófilo Extremo	Mesófilo extremo	Alcalitolerante

Tabla D 5. Secuencias del gen ADNr 16S de las posibles bacterias entomopatógenas

Código	Secuencia del gen ADNr 16S (5'-3')	Identificación	Número de nucleótidos
EG-013	<p>TCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGA GTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAA TTATAAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCCTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACC GTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAAT GGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTA AACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGACGAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAG ACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTC TTGACATCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGA GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAA CCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAGTACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGC GAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTC GGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGA</p>	<i>Bacillus haynesii</i>	1477
EG-014	<p>CTGCTCAGGATGACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGAC GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATA GTTCGAAATTGAAAGGCGCTTCGGCTGCTACTTATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCG ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA GTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGG TCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACC AGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCC GCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACC AGGCTTGACATCTCTGAAAACCTTAGAGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGCAGAGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT ACAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAGTACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAGA GCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCG CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCG AAGTCGGTGGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCCGCTAAGGTGGGACAGATGAT</p>	<i>B. micoides</i>	1475

TABLA D5 (Continuación)

EG-038	<p>CTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGG TGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTT CGAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC CGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT GCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTAATACGTAGGTGGC AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAG TGCGGAAGGCGACTTTCCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAACCGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCGCCCTTATAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAG GTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGTATCTTGTGTCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC AAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAGAGCT GCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTA GTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCGGAAG TCGGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTG</p>	<i>B. cereus</i> (NR 074540)	1479
EG-041	<p>CTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGG TGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATTTTGAACCTGCATGGTT CGAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC CGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT GCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTAATACGTAGGTGGC AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAG TGCGGAAGGCGACTTTCCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAACCGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCGCCCTTATAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAG GTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGTATCTTGTGTCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC AAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAGAGCT GCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTA GTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCGGAAG TCGGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTG</p>	<i>B. paranthracis</i>	1474

TABLA D5 (Continuación)

EG-042	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGGACGGGT GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTGTGTTGAACCGCATGGTTC AGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGA TGCCTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTGTTAGGGAAGAACAAGTGC CGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT TGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG GCGAAGCGGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAA GACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAGCGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGT CTTGACATCCTCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTG AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAA ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACAGAACAAGGGCAG CGAAACCGGAGGTTAAGCCAATCCACAATCTGTTCTCGGATCGCAGTGTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAAATCGCTAG TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGAAGT CGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGT</p>	<i>B. velezensis</i>	1482
EG-043	<p>GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGG GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGT TCGAAATGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCTGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAAC GATCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGGTTTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT GCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAGTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC ATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAG TGGCGAAGGCGACTTTCGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCC GTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAG GTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACGGTACAAAAGAGCT GCAAGACCGGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTCTCAGTTCCGATTTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTA GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGAAG TCGGTGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGA</p>	<i>B. albus</i>	1481

TABLA D5 (Continuación)

EG-044	<p>GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGG GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGT TCGAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAAC GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT GCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGC AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC ATTGAAAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAG TGGCGAAGGCGACTTTCGGTCTGTA AACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAG GTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC AAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGCTACAATGGACGGTACAAAAGAGCT GCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTA GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGAAG TCGGTGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTC</p>	<i>B. albus</i>	1485
--------	---	-----------------	------

Tabla 12. Porcentaje de similitud y número de nucleótidos diferentes entre posibles bacterias entomopatógenas y varias especies del género *Bacillus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	---	95/1462	89/1464	89/1464	89/1464	6/1464	24/1463	25/1463	5/1464	5/1464	5/1407	7/1464	93/1463	94/1463	93/1463	92/1463	88/1464	20/1463	96/1463	93/1463	90/1463	4/1464	89/1464	89/1464
2	93.50	---	9/1464	9/1464	9/1464	92/1462	95/1461	95/1461	95/1462	95/1462	94/1407	96/1462	11/1463	10/1463	11/1463	13/1463	11/1464	93/1461	0/1463	11/1463	11/1463	95/1462	10/1464	10/1464
3	93.92	99.39	---	0/1466	0/1466	88/1464	89/1463	91/1463	91/1464	91/1464	89/1407	92/1464	4/1465	5/1465	4/1465	8/1465	4/1466	87/1463	9/1465	4/1465	8/1465	89/1464	1/1466	1/1466
4	93.92	99.39	100.00	---	0/1466	88/1464	89/1463	91/1463	91/1464	91/1464	89/1407	92/1464	4/1465	5/1465	4/1465	8/1465	4/1466	87/1463	9/1465	4/1465	8/1465	89/1464	1/1466	1/1466
5	93.92	99.39	100.00	100.00	---	88/1464	89/1463	91/1463	91/1464	91/1464	89/1407	92/1464	4/1465	5/1465	4/1465	8/1465	4/1466	87/1463	9/1465	4/1465	8/1465	89/1464	1/1466	1/1466
6	99.59	93.71	93.99	93.99	93.99	---	26/1463	25/1463	5/1464	5/1464	5/1407	9/1464	92/1463	93/1463	92/1463	91/1463	87/1464	22/1463	93/1463	92/1463	89/1463	6/1464	88/1464	88/1464
7	98.36	93.50	93.92	93.92	93.92	98.22	---	3/1464	25/1463	25/1463	25/1406	31/1463	93/1462	94/1462	93/1462	92/1462	88/1463	4/1464	96/1462	93/1462	90/1462	28/1463	89/1463	89/1463
8	98.29	93.50	93.78	93.78	93.78	98.29	99.80	---	26/1463	26/1463	26/1406	30/1463	95/1462	96/1462	95/1462	94/1462	90/1463	7/1464	96/1462	95/1462	92/1462	29/1463	91/1463	91/1463
9	99.66	93.50	93.78	93.78	93.78	99.66	98.29	98.22	---	0/1464	0/1407	12/1464	95/1463	96/1463	95/1463	94/1463	90/1464	21/1463	96/1463	95/1463	92/1463	9/1464	91/1464	91/1464
10	99.66	93.50	93.78	93.78	93.78	99.66	98.29	98.22	100.00	---	0/1407	12/1464	95/1463	96/1463	95/1463	94/1463	90/1464	21/1463	96/1463	95/1463	92/1463	9/1464	91/1464	91/1464
11	99.64	93.32	93.67	93.67	93.67	99.64	98.22	98.15	100.00	100.00	---	12/1407	93/1407	94/1407	93/1407	92/1407	88/1407	21/1406	94/1407	93/1407	89/1407	9/1407	89/1407	89/1407
12	99.52	93.43	93.72	93.72	93.72	99.39	97.88	97.95	99.18	99.18	99.15	---	96/1463	97/1463	96/1463	95/1463	91/1464	27/1463	97/1463	96/1463	93/1463	3/1464	92/1464	92/1464
13	93.64	99.25	99.73	99.73	99.73	93.71	93.64	93.50	93.51	93.51	93.39	93.44	---	1/1466	0/1466	4/1466	6/1465	91/1462	11/1464	0/1466	10/1464	93/1463	5/1465	5/1465
14	93.57	99.32	99.66	99.66	99.66	93.64	93.57	93.43	93.44	93.44	93.32	93.37	99.93	---	1/1466	3/1466	7/1465	92/1462	10/1464	1/1466	9/1464	94/1463	6/1465	6/1465
15	93.64	99.25	99.73	99.73	99.73	93.71	93.64	93.50	93.51	93.51	93.39	93.44	100.00	99.93	---	4/1466	6/1465	91/1462	11/1464	0/1466	10/1464	93/1463	5/1465	5/1465
16	93.71	99.11	99.45	99.45	99.45	93.78	93.71	93.57	93.57	93.57	93.46	93.51	99.73	99.80	99.73	---	4/1465	90/1462	13/1464	4/1466	6/1464	92/1463	9/1465	9/1465
17	93.99	99.25	99.73	99.73	99.73	94.06	93.98	93.85	93.85	93.85	93.75	93.78	99.59	99.52	99.59	99.73	---	86/1463	11/1465	6/1465	4/1465	88/1464	5/1466	5/1466
18	98.63	93.63	94.05	94.05	94.05	98.50	99.73	99.52	98.56	98.56	98.51	98.15	93.78	93.71	93.78	93.84	94.12	---	94/1462	91/1462	88/1462	24/1463	87/1463	87/1463
19	93.44	100.00	99.39	99.39	99.39	93.64	93.43	93.43	93.44	93.44	93.32	93.37	99.25	99.32	99.25	99.11	99.25	93.57	---	11/1464	11/1465	96/1463	10/1465	10/1465
20	93.64	99.25	99.73	99.73	99.73	93.71	93.64	93.50	93.51	93.51	93.39	93.44	100.00	99.93	100.00	99.73	99.59	93.78	99.25	---	10/1464	93/1463	5/1465	5/1465
21	93.85	99.25	99.45	99.45	99.45	93.92	93.84	93.71	93.71	93.71	93.67	93.64	99.32	99.39	99.32	99.59	99.73	93.98	99.25	99.32	---	90/1463	9/1465	9/1465
22	99.73	93.50	93.92	93.92	93.92	99.59	98.09	98.02	99.39	99.39	99.36	99.80	93.64	93.57	93.64	93.71	93.99	98.36	93.44	93.64	93.85	---	89/1464	89/1464
23	93.92	99.32	99.93	99.93	99.93	93.99	93.92	93.78	93.78	93.78	93.67	93.72	99.66	99.59	99.66	99.39	99.66	94.05	99.32	99.66	99.39	93.92	---	0/1466
24	93.92	99.32	99.93	99.93	99.93	93.99	93.92	93.78	93.78	93.78	93.67	93.72	99.66	99.59	99.66	99.39	99.66	94.05	99.32	99.66	99.39	93.92	100.00	---

Legenda: 1.- *Bacillus subtilis* (AJ276351), 2.- *B. mycoides* (AB021192), 3.- *B. tropicus* (NR157736), 4.- *B. luti* (NR157730), 5.- *B. albus* (NR157729), 6.- *B. nakamurai* (NR151897), 7.- *B. haynesii* (NR157609), 8.- *B. licheniformis* (NR118996), 9.- *B. halotolerans* (NR115929), 10.- *B. halotolerans* (NR115929), 11.- *B. mojavensis* (NR118290), 12.- *B. velezensis* (NR075005), 13.- *B. cereus* (NR15714), 14.- *B. proteolyticus* (NR157735), 15.- *B. cereus* (NR074540), 16.- *B. thuringiensis* (NR043403), 17.- *B. paranthracis* (NR157728), 18.- EG-013, 19.- EG-014, 20.- EG-038, 21.- EG-041, 22.- EG-042, 23.- EG-043, 24.- EG-044

ANEXO E. CONCENTRACIÓN E INTEGRIDAD DEL ADN

Tabla E 1. Concentraciones de ADN de todas las cepas

Muestras	Concentración de ácidos nucleicos (ng/μl)	Relación 260/280	Relación 260/230
EG-001	169,7	2,59	1,37
EG-002	293,5	1,84	1,28
EG-003	61,5	1,81	1,83
EG-004	60,7	2	4,3
EG-005	34,9	1,81	4,39
EG-006	63,9	1,23	0,36
EG-007	28,4	1,62	1,14
EG-008	43,4	2,02	4,78
EG-009	53,1	1,61	0,65
EG-010	15,5	1,79	-12,01
EG-011	44	1,86	-4,46
EG-012	0,9	1,36	-0,06
EG-013	85,53	1,51	0,98
EG-014	24,3	1,79	2,66
EG-015	3,2	1,48	1,52
EG-016	3,7	1,65	1,42
EG-017	4,2	1,67	1,28
EG-018	2,6	1,37	1,24
EG-019	7,43	1,39	0,8
EG-020	15,23	1,35	0,53
EG-021	1,9	1,97	9,54
EG-022	1,8	1,56	2
EG-023	15,47	1,4	0,65
EG-024	1,8	1,92	0,95
EG-025	3,3	1,55	0,82
EG-026	26,2	1,9	1,65
EG-027	2833	1,78	1,38
EG-028	561,3	1,79	1,37
EG-029	336,93	1,45	0,65
EG-030	136,3	1,91	1,2
EG-031	310,1	1,74	1,07
EG-032	12,2	1,52	-0,77
EG-033	12,1	1,79	-0,56
EG-034	13,9	1,72	-0,7
EG-035	27,7	1,34	0,96
EG-036	17,5	1,49	-1,45
EG-037	31,9	1,55	2,06
EG-038	66,4	1,52	0,66
EG-039	25,5	1,49	0,79
EG-040	13,3	1,64	1,22
EG-041	43	1,82	1,57
EG-042	2,23	1,13	0,41
EG-043	16,67	1,35	0,44
EG-044	13,37	1,49	1,28

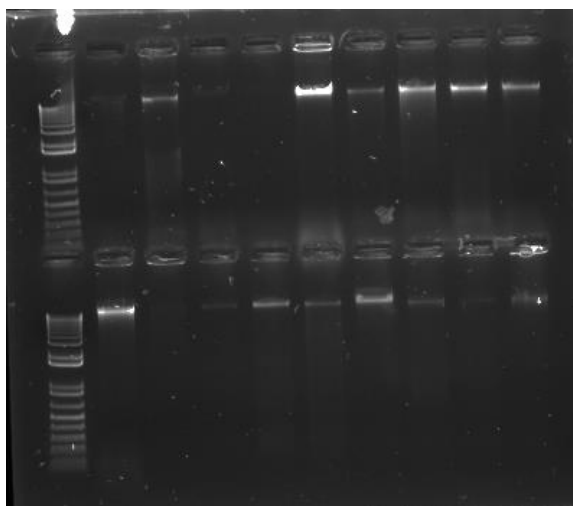


Figura E 1. Integridad del ADN

ANEXO F. BRITISH STANDARD SPECIFICATION OF COLOURS FOR IDENTIFICATION CODING AND SPECIAL PURPOSE



172 Pale roundel blue



112 Arctic blue



101 Sky blue



103 Peacock blue



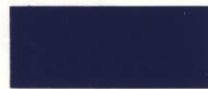
104 Azure blue



109 Middle blue



113 Deep Saxe blue



110 Roundel blue



105 Oxford blue



106 Royal blue



216 Eau-de-Nil



210 Sky



217 Sea green



280 Verdigris green



283 Aircraft grey green



267 Deep chrome green



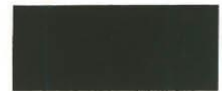
225 Light Brunswick green



285M NATO green



220 Olive green



241 (641) Dark green



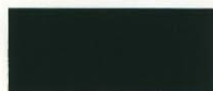
298 Olive drab



226 Middle Brunswick green



223 Middle bronze green



227 Deep Brunswick green



224 Deep bronze green



310 Primrose



367 Manilla



365 Vellum



353 Deep cream



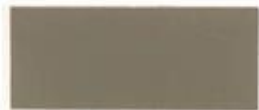
369 Biscuit



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



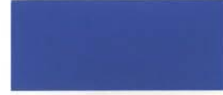
796 Dark violet



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