



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



Taxonomía polifásica de actinomicetes útiles en biotecnología

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica otorgada por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autora: Diana Estefanía Baquero Vayas
Tutor: Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza; PhD

Ambato-Ecuador
Diciembre-2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza; PhD

CERTIFICA

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

Ambato, 15 de noviembre de 2018



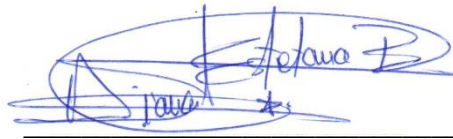
Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza; PhD

C.I 1802166502

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo Diana Estefanía Baquero Vayas, declaro que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; exceptuando las citas.



Diana Estefanía Baquero Vayas

1803719960

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.

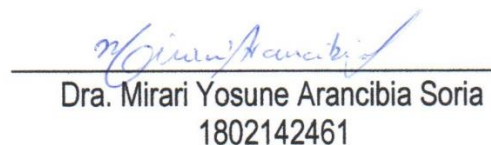
Para constancia firman:



Presidente Tribunal



Ing. MSc. Wilson Patricio Orozco Freire
1721363008




Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria
1802142461

Ambato, 10 de 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 esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Diana Estefanía Baquero Vayas

1803719960

AUTORA

DEDICATORIA

Confía en el SEÑOR de todo corazón, y no en tu propia inteligencia.

Reconócelo en todos tus caminos, y él allanará tus sendas.

No seas sabio en tu propia opinión; más bien, teme al SEÑOR y huye del mal.

Esto infundirá salud a tu cuerpo y fortalecerá tu ser.

Honra al SEÑOR con tus riquezas y con los primeros frutos de tus cosechas.

Proverbios 3, 5-9

A ustedes Ernesto y Verónica,
quienes son mi mayor inspiración.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar a mi *Abba Padre (Dios)*, sin su gracia, sin su amor nada en mi vida podría ser posible, esto solo es una muestra de que Él concede las peticiones de nuestro corazón.

A mis padres Ernesto y Verónica, por su amor, sacrificio y entrega para que mis sueños lleguen a cumplirse, aún por sobre los de ustedes.

A mi familia, pero sobre todo a mi mamita Tere, mi ñaño Javi, mis tías Laurita, Katita y Clarita, fuente de apoyo y amor en todo momento.

A Richard, Ale y Dieguito, siempre un apoyo inmenso e incondicional basados en la palabra de Dios.

A mis amigas Pame, Eva, Tefita, Mercy y Belita cuan bueno fue poder encontrar y contar con su amistad en todo este tiempo, vale la pena llamarlas amigas, que este vínculo nunca termine.

Al Doc Carlos, sinceramente creo que no hay palabras, es difícil encontrar personas que realmente inspiren a ser mejores, a esperar lo mejor de los demás, a siempre intentar ser lo mejor para los demás y docentes que de forma sincera tengan el deseo de que sus estudiantes desarrollen sus capacidades, más que un profesor, más que un tutor o un jefe es un excelente amigo y una persona increíble. Gracias por ser el tutor que con paciencia desarrolló mi potencial profesional, y el amigo que estuvo en momentos difíciles. Que esta amistad perdure. Un abrazo inmenso siempre para usted.

Al G+ Biofood and Engineering, Qco. Lander, Inge Fer, Inge Dieguito, Inge Lili, Docs, Inge Alex Jessy e Inge Anita, gracias siempre por su amistad y los momentos que me permitieron compartir a su lado.

Al grupo de Biotecnología Microbiana Danny, Mercy, Estefanía, Diego y Belén que bueno fue compartir a su lado experiencias gratas de amistad y desarrollo profesional.

A mis compañeros tesistas Andrea, Adrián, Diego, Karen, Jorgito e Iván gracias por las sonrisas y el tiempo de compinchería juntos.

A la familia de BIOSEB Organics, gracias por el conocimiento impartido y las grandes experiencias vividas junto a todos ustedes.

A la Universidad Técnica de Ambato, a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, sus autoridades, docentes, administrativos y a los que forman parte de la UODIDE, gracias por sus brazos abiertos.

GRACIAS A TODOS Y CADA UNO

INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

A. PÁGINAS PRELIMINARES

APROBACIÓN DEL TUTOR	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	III
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	IV
DERECHOS DE AUTOR	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTO	VII
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	VIII
INDICE DE TABLAS	X
INDICE DE FIGURAS	XII
RESÚMEN	XII
ABSTRACT	XIII

B. CONTENIDO

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	XIII
1.1 Generalidades	1
Justificación	1
1.2 Antecedentes investigativos	2
Generalidades de los actinomicetes	2
Características de los actinomicetes	2
Rol biológico de los actinomicetes en el suelo	3
Producción de compuestos bioactivos	4
Taxonomía	5
Caracterización genotípica	11
1.3 Objetivos	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
Hipótesis	15
Señalamiento de variables	15
CAPÍTULO II METODOLOGÍA	16
2.1 Caracterización fenotípica	16

Caracterización macroscópica	16
Caracterización microscópica	16
Rango de crecimiento en función del pH	17
Rango de crecimiento en función de la salinidad	17
Rango de crecimiento en función de la temperatura	18
Actividad enzimática extracelular	18
Aminoácidos como fuente de nitrógeno y carbono	19
Taxonomía numérica de datos fenotípicos	19
2.2 Caracterización genotípica	19
Extracción de ADN	19
Determinación de concentración, pureza e integridad del ADN	20
rep – PCR	20
Taxonomía numérica de datos genotípicos	22
Amplificación y secuenciamiento del gen codificante del ARNr 16S	23
Identificación molecular y análisis filogenético	23
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1 Análisis y discusión de los resultados	24
Caracterización fenotípica	24
Caracterización genotípica	31
Amplificación y secuenciamiento del gen codificante del ARNr 16S	34
Identificación molecular y análisis filogenético	38
Interpretación de resultados	43
Discusión general del trabajo	44
3.2 Verificación de hipótesis	46
CAPITULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
4.1 Conclusiones	47
4.2 Recomendaciones	48
MATERIALES DE REFERENCIA	49
Referencias Bibliográficas	49
Anexos	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Matriz n x t para el ordenamiento de datos fenotípicos de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs)	6
Tabla 2. Coeficientes de similitud utilizados en taxonomía numérica	8
Tabla 3. Tipos de morfología de las cadenas de esporas	10
Tabla 4. Métodos de tipificación genotípica bacteriana	13
Tabla 5. Tipos de morfología de esporulación	16
Tabla 6. Clasificación en base al rango de crecimiento en función del pH del medio	17
Tabla 7. Clasificación en base al rango de crecimiento en función de la salinidad del medio	18
Tabla 8. Clasificación en base al crecimiento en función de la temperatura de incubación	18
Tabla 9. Mezcla Master con PCR-SuperMix para el primer BOX	21
Tabla 10. Condiciones para BOX-PCR	21
Tabla 11. Mezcla Master para el primer ERIC	22
Tabla 12. Condiciones para ERIC-PCR	22
Tabla 13. Primers utilizados para procesos del gen codificante del ARNr 16S	23
Tabla 14. Grupos de color formados a partir de la caracterización macroscópica	24
Tabla 15. Clasificación de los actinomicetes en base a su rango de crecimiento en pH	25
Tabla 16. Clasificación de los actinomicetes en base a salinidad	26
Tabla 17. Rango de crecimiento de actinomicetes en función de la temperatura	27
Tabla 18. Crecimiento de actinomicetes con aminoácidos como fuente de nitrógeno	28
Tabla 19. Grupos fenéticos obtenidos a partir del análisis de datos fenotípicos	29
Tabla 20. Grupos genéticos obtenidos a partir del análisis genotípico	34
Tabla 21. Concentración de ADN extraído de actinomicetes para secuenciamiento	36
Tabla 22. Agrupación de actinomicetes en base a su identificación molecular	38
Tabla 23. Fotografías de cepas agrupadas en base a su identificación molecular	39
Tabla 24. Origen de cepas de actinomicetes	57
Tabla 25. Matriz de datos fenotípicos	58
Tabla 26. Matriz de similitud y diferencia de nucleótidos para la identificación de la cercanía entre actinomicetes secuenciados y especies conocidas del género <i>Streptomyces</i>	60
Tabla 27. Secuencia consenso del gen codificante del ARNr 16S, identificación molecular y número de nucleótidos de la secuencia de cada actinomicete representante secuenciado	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Matriz 2x2 para la colocación de características entre dos Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs). Adaptado de Sneath & Sokal,(1973)	7
Figura 2. Características de los distintos tipos de superficie de las esporas.	10
Figura 3. Etapas del método de tipado molecular rep-PCR. <i>Nota.</i> Adaptado de Olive & Bean, (1999).	14
Figura 4. Dendrograma obtenido a partir del análisis de datos fenotípicos con corte al 88.6% de similitud mediante el coeficiente de simple similitud (SSM) y el algoritmo UPGMA	30
Figura 5. Gel de electroforesis del ADN extraído de la colección de actinomicetes por el método de fenol-cloroformo	31
Figura 6. Posición de ADN genómico en el gel de electroforesis	32
Figura 7. Genotipado de la colección de actinomicetes por el método de rep-PCR con el primer BOX	33
Figura 8. Dendrograma con corte al 80% de similitud obtenido a partir del fingerprinting por rep-PCR con el primer BOX mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA	35
Figura 9. Análisis filogenético en base a la secuencia consenso del gen codificante para el ARNr 16S calculado mediante Neighbor joining (Saitou & Nei, 1987) <i>Nota:</i> Las especies subrayadas son las pertenecientes al clado de <i>Streptomyces violaceusniger</i> ARNr 16s.	37

RESÚMEN

Treinta cepas de actinomicetes aislados de suelo de jardín fueron caracterizadas por taxonomía polifásica e identificados molecularmente por secuenciamiento del gen codificante del ARNr 16S, éste último dió como resultado nueve especies cercanamente relacionadas a la colección de cultivos, éstas son *Streptomyces griseiniger*, *Streptomyces cangkringensis*, *Streptomyces rhizosphaericus*, *Streptomyces sporoclivatus*, *Streptomyces malaysiensis*, *Streptomyces decoyicus*, *Streptomyces fildesensis*, *Streptomyces rhizosphaerihabitans*, *Streptomyces spiroverticillatus*, obteniendo así un porcentaje del 30% de diversidad, esta fué corroborada por la variedad de características fenotípicas y genotípicas determinadas. Los grupos fenéticos mostraron mayor coherencia y homogeneidad a comparación de los genotípicos, sin embargo al analizarlos con el árbol filogenético se encuentra relación entre los resultados. La colección de actinomicetes demostró ser en su mayoría de naturaleza, halófila, neutrófila y mesófila, además de expresar potencial para la degradación de fuentes de carbono complejas y el uso de aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno. La importancia de este trabajo radica en la complementariedad de éstas tres herramientas para la caracterización e identificación de microorganismos, las cuales prosiguen del aislamiento selectivo, y la consecución de un perfil para determinar el potencial biotecnológico de los mismos, paso que se debería seguir en este trabajo. Se sugiere también la opción de tomar el análisis filogenético del 16S como punto de partida para la caracterización de microorganismos, teniendo como base la identificación molecular para orientar una perfilación adecuada de los mismos con pruebas de genotipado y finalmente fenotípicas para determinar sus condiciones de cultivo y crecimiento con el fin de identificar su utilidad biotecnológica.

Palabras clave: Pruebas fenotípicas, tipificación genética, gen codificante del ARNr 16S, rep-PCR, BOX, similaridad.

ABSTRACT

Thirty strains of actinomycetes isolated from garden soil were characterized by polyphasic taxonomy and identified molecularly by sequencing the coding gene for 16S rRNA, the latter resulting in nine species closely related to the culture collection, these are *Streptomyces griseiniger*, *Streptomyces cangkringensis*, *Streptomyces rhizosphaericus*, *Streptomyces sporoclivatus*, *Streptomyces malaysiensis*, *Streptomyces decoyicus*, *Streptomyces fildesensis*, *Streptomyces rhizosphaerihabitans*, *Streptomyces spiroverticillatus*, thus obtaining a diversity percentage of 30%, this was corroborated by the variety of phenotypic and genotypic characteristics determined. The phenetic groups showed greater coherence and homogeneity compared to the genotypic ones, however, when analyzing them with the phylogenetic tree, relationship between the results was found. The collection of actinomycetes proved to be mostly, halophilic, neutrotolerant and mesophilic, in addition to expressing potential for the degradation of complex carbon sources and the use of amino acids as a carbon and nitrogen source. The importance of this work lies in the complementarity of these three tools for the characterization and identification of microorganisms, which continue from selective isolation, and the achievement of a profile to determine the biotechnological potential of the same, step that should be followed in this work. The option of taking the 16S phylogenetic analysis as a starting point for the characterization of microorganisms is also suggested, having as a basis the molecular identification to guide an adequate profiling of them with genotyping and finally phenotypic tests to determine their culture conditions and growth in order to identify its biotechnological utility.

Key words: Phenotypic tests, genetic typing, coding gene for 16S rRNA, rep-PCR, BOX, similarity.

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades

Justificación

Los microorganismos son extraordinariamente diversos, y tienen un rol sumamente importante en la producción de compuestos bioactivos, en la biorremediación y en las industrias farmacéuticas, de alimentos y bebidas (Das, Dash, Mangwani Neelam, Chakraborty, & Kumari, 2014). Dentro de éstos, los actinomicetes son bacterias que juegan un rol trascendente en la industria biotecnológica gracias a su capacidad metabólica, siendo reconocidos como fuente significativa de antibióticos y moléculas bioactivas (Nikou, Ramezani, & Seyedmahdi, 2015).

Dentro del campo biotecnológico es imprescindible la identificación del microorganismo. Para esto la taxonomía numérica provee una visión informativa del mismo (Adegboye & Babalola, 2012). Sin embargo las técnicas convencionales basadas en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas no son suficientes para proporcionar un perfil completo del organismo en estudio (Das et al., 2014). Con el advenimiento de la genómica, la complejidad del mundo microbiano se ha convertido en un campo ampliamente entendible, por medio de técnicas de tipificación como rep-PCR o la secuenciación del gen codificante para el ARNr 16s (Stackebrandt, DeLong, Lory, & Thompson, 2014).

De esta forma los avances en la sistemática microbiana han permitido el desarrollo de una taxonomía polifásica, cuyo objetivo es generar información genotípica y fenotípica del taxón microbiano (Das et al., 2014).

El presente trabajo pretende caracterizar fenotípica y genotípicamente 30 actinomicetes con potencial biotecnológico, para establecer su ubicación taxonómica dentro de la clase *Actinobacteria* y si estos pertenecen a algunos de los siguientes órdenes: *Catenulisporales*, *Corynebacteriales*, *Micromonosporales*, *Pseudonocardiales*, *Streptomycetales*, *Streptosporangiales*.

Este tipo de investigaciones contribuyen al desarrollo del área biotecnológica en el Ecuador, incentivando el estudio de la diversidad microbiológica mediante la unificación de la taxonomía tradicional con la tipificación genética, dando como resultado una herramienta significativa para la identificación y clasificación de microorganismos.

1.2 Antecedentes investigativos

Generalidades de los actinomicetes

El *phylum Actinobacteria* representa una de las unidades taxonómicas más amplias dentro de las 18 líneas actualmente reconocidas dentro del dominio Bacteria. Están extensamente distribuidos tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos. En el suelo juegan un rol esencial en la humificación del mismo y en el reciclado de biomateriales, gracias a su capacidad degradadora de polímeros recalcitrantes como la quitina, queratina y lignocelulosa (Sharma, 2014).

La clase *Actinobacteria* se encuentra dentro del *phylum* con el mismo nombre. Históricamente estos microorganismos fueron considerados como intermediarios entre hongos y bacterias. Su nombre por sí mismo proviene de la morfología que presentan sus colonias al ser inoculadas en agar, las cuales exhiben crecimiento radial, además de esta característica comparte con los hongos su formación micelial y olor a humedad, mientras que con las bacterias comparte rasgos fisiológicos como la estructura de su pared celular en base al peptidoglicano (Sen et al., 2014). El primer trato taxonómico de las actinobacterias fue realizado por Buchanan en 1917, quien propuso nombrarlas como el orden Actinomycetales. (Waksman & Henrici, 1943)

Características de los actinomicetes

Los actinomicetes son bacterias Gram-positivas, aeróbicas, que presentan ramificaciones filamentosas o hifas y esporas asexuales (Abdus et al., 2015), contienen alto contenido de G+C con valores alrededor del 55-77% y están distribuidos ubicuamente en agua y suelo (Asef & Gupta, 2014).

Al principio fueron considerados como grupo intermedio entre bacterias y hongos, sin embargo la naturaleza procariote de la célula los ubica dentro del Dominio *Bacteria* (Asef & Gupta, 2014).

Los primeros actinomicetes conocidos eran microorganismos patógenos para el ser humano, es el caso de los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Actinomadura* reportados como agentes causantes de enfermedades como nocardiosis y mycetoma (Zerizer, Scolat, Raoult, Dalichaouche, & Boulahrouf, 2013), además de *Actinomyces bovis* causante de actinomycosis

en el ganado vacuno. De éste último se derivó el nombre para describir a éstos microorganismos (Asef & Gupta, 2014).

Los actinomicetes demuestran haber desarrollado capacidades metabólicas y fisiológicas asociadas con la producción de diferentes tipos de compuestos bioactivos con actividad anti-fúngica, anticancerígena, inhibidores de patógenos, pigmentos, entre otros (Abdus et al., 2015; Acharyabhatta et al., 2013), que aseguran su supervivencia en los diferentes hábitats en los que se desarrollan (Sharma, 2014).

Los actinomicetes pueden adaptarse para sobrevivir en ambientes hostiles y oleosos, son capaces de crecer a elevadas temperaturas y además son conocidos como degradadores de materiales tóxicos y polímeros complejos, convirtiéndolos en excelentes colaboradores para la remoción de hidrocarburos contaminantes como el petróleo (Sharma, 2014).

Rol biológico de los actinomicetes en el suelo

Las raíces de las plantas producen compuestos orgánicos dentro de la rizósfera de los suelos, necesarios para el crecimiento microbiano, éstos compuestos varían dependiendo de la especie de planta y de variables físicas como humedad y temperatura, representando un nicho biológico único de microflora diversa (Varalakshmi, Sekhar, & Charyulu, 2014).

Los actinomicetes son el grupo más prominente de microorganismos del suelo, éstos difieren con el tipo y pH del mismo, la localización geográfica y la condición climática (Adegboye & Babalola, 2012). Es a partir del suelo que estos microorganismos se distribuyen a otros como el agua y como el aire (Zerizer et al., 2013).

Los actinomicetes son bacterias saprofitas en la rizósfera, que influyen el crecimiento de las plantas y protegen sus raíces en contra de hongos patógenos (Varalakshmi et al., 2014).

Tienen gran utilidad en el ciclo de nutrientes del suelo y como potenciadores del crecimiento vegetal, mediante la degradación de moléculas complejas a moléculas de fácil asimilación (Sreevidya, Gopalakrishnan, Kudapa, & Varshney, 2016).

Los procesos metabólicos de estos microorganismos en el suelo dan como resultado la producción de sustancias volátiles como la geosmina, responsable del característico olor a “suelo mojado” (Sharma, 2014).

Producción de compuestos bioactivos

Los actinomicetes son reconocidos por su diversidad metabólica, con capacidad biocatalítica y biocida. El potencial bioactivo de estas bacterias facilita su supervivencia aún en condiciones ecológicas de riesgo o desfavorables para ellos (Nawani et al., 2013).

De los 23 000 metabolitos secundarios generados por microorganismos, 10 000 son producidos por los actinomicetes, representando casi el 45% de todos los metabolitos descubiertos (Sharma, 2014). El género *Streptomyces* aporta con alrededor del 80% de los productos naturales sintetizados por los actinomicetes (Varalakshmi et al., 2014).

Los actinomicetes son una destacada fuente de antibióticos. El primer antibiótico obtenido fue la estreptomicina aislada de *Streptomyces* en 1945. Entre los antibióticos que son producidos por estos microorganismos se incluyen antraciclinas, péptidos, macrólidos β -lactámicos, actinomicinas y tetraciclinas (Abdus et al., 2015).

Son productores de un amplio rango de enzimas en comparación con las obtenidas a partir de animales y plantas, debido a su facilidad de crecimiento, sus requerimientos nutricionales y su procesamiento downstream. Algunas de las enzimas producidas por los actinomicetes son proteasas, celulasas, quitinasas, amilasas, xilanasas, lignina peroxidasas, tirosinasas, estereasas, amidasas, entre otras (Prakash et al., 2013).

Los actinomicetes se encargan de la producción de sustancias para el control de fitopatógenos como los géneros *Fusarium*, *Ascochyta* y *Botrytis* (Sreevidya et al., 2016), convirtiéndose en los sintetizadores más prometedores de compuestos bioactivos en la industria y el comercio (Nawani et al., 2013). Un ejemplo es el género *Streptomyces*, con la producción de urauquimicinas, antifúngicos miembros de las antimicinas, que inhiben el flujo de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial (Sharma, 2014).

Los actinomicetes también son productores notables de compuestos agroactivos. De hecho el 60% de los insecticidas y herbicidas reportados en los últimos años son originarios del género *Streptomyces* (Sharma, 2014).

Son capaces de sintetizar compuestos o desarrollar funciones que promueven el crecimiento de la planta (Plant Growth Promotion-PGP) o que facilitan en la misma la absorción de nutrientes del suelo. Estos pueden ser la síntesis de sideróforos, la fijación de nitrógeno o la solubilización y síntesis de fitohormonas (Sharma, 2014).

Taxonomía

La taxonomía es la ciencia de la clasificación biológica cuyo grupo base es la especie. La información taxonómica es esencial para comprender la biodiversidad y las relaciones de los organismos vivos (Adegboye & Babalola, 2012).

En los procariontes la taxonomía comenzó en el siglo XIX, permitiendo la identificación de cepas microbianas provenientes de muestras ambientales o clínicas y clasificándolas inicialmente en base a sus características fenotípicas como su morfología, requerimientos para su crecimiento y patogenicidad. De forma posterior se unió el estudio de sus propiedades bioquímicas y fisiológicas, permitiendo la aparición de la quimiotaxonomía y la taxonomía numérica (Ramasamy et al., 2014).

Taxonomía numérica

La taxonomía numérica, algunas veces llamada taxometría, fue desarrollada al final de los años cincuenta y en microbiología tiene el propósito de clasificar cepas individuales de microorganismos en grupos homogéneos (convencionalmente especies) y la adaptación de éstos en géneros o grupos más grandes (Sneath, 2001). La taxonomía numérica permite la agrupación de estas unidades taxonómicas mediante la evaluación de la afinidad o similaridad entre ellas, por medio de métodos numéricos o estadísticos. Éste término incluye el trazo de vínculos (entre los microorganismos en estudio) inferidos a partir de la información obtenida (Sneath & Sokal, 1973).

La afinidad, similaridad o semejanza, se refiere a los atributos que un organismo posee hoy en día sin referencia a como esos atributos aparecieron. Esta es expresada en proporciones de similitud o diferencia y se denomina relación fenética (Sneath, 2001).

Los microorganismos a examinar son generalmente cepas individuales, pero estas pueden ser clasificadas de diversas formas (cepas, especies, géneros) para las cuales no hay un término en común, por lo que se las ha denominado Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) (Sneath, 2001), y nacen por la necesidad de estudiar un grupo taxonómico manejable. Los OTUs son los taxones de menor rango empleados en un estudio (Sneath & Sokal, 1973).

Michener y Sokal describieron en 1957 un carácter como una propiedad o característica que varía de un tipo de organismo a otro (Sneath & Sokal, 1963).

Uno de los problemas más grandes al inicio de la taxonomía numérica fue fijar la igualdad de peso para todo carácter a estudiar. De ésta forma se estableció el uso de un código binario, cuya representación sería 1 para expresar presencia y 0 para expresar ausencia de la característica en estudio (Sneath, 1957). En práctica se utiliza en ocasiones una tercera categoría para expresar la indeterminación de un carácter (Sneath & Sokal, 1963).

Para estimar la similaridad entre OTUs se ordena la información que servirá para taxonomía numérica en una matriz de la forma $n \times t$ (Tabla 1), donde n son los caracteres a estudiar, t los distintos OTUs a ser agrupados y X_{ij} es el valor del OTU j para un carácter i . (Sneath & Sokal, 1973)

Tabla 1. Matriz $n \times t$ para el ordenamiento de datos fenotípicos de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs)

CARACTERES	OTUs			
	1	2	...	T
1	X_{11}	X_{12}	...	X_{1t}
2	X_{21}	X_{22}	...	X_{2t}
.
.
.
N	X_{n1}	X_{n2}	...	X_{nt}

Nota: Adaptado de Sneath & Sokal, (1973)

Para determinar la similaridad existen varios métodos, sin embargo el más utilizado es el de los coeficientes de asociación (Tabla 2), también llamados de similaridad, relación o

coincidencia (Sneath & Sokal, 1963). Este coeficiente es una cuantificación de la similaridad entre los elementos en las dos columnas de la matriz que representan el estado de los caracteres para dos OTUs en cuestión (Sneath & Sokal, 1973).

Al comparar los estados de los caracteres por pares de columnas para dos OTUs se establece una matriz de 2x2 (Figura 1).

		OTU j		
		1	0	
OTU k	1	A	B	$a + b$
	0	C	D	$c + d$
		$a + c$	$b + d$	
		$n = a + b + c + d$		

Figura 1. Matriz 2x2 para la colocación de características entre dos Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs). Adaptado de Sneath & Sokal,(1973)

Dónde:

a : Es el número de caracteres para los cuales ambos OTUs codifican 1, es decir coinciden positivamente.

b y c: Son el número de caracteres para los cuales ambos OTUs no coinciden.

d: Es el número de caracteres para los cuales ambos OTUs codifican para cero, es decir coinciden negativamente.

m: Es el número de coincidencias, es decir $a + d$.

u: Es el número de no coincidencias, es decir $b + c$.

n: Es la suma de las cuatro frecuencias, dando como total el número de características a menos que existan características registradas como indeterminadas, es decir $m + u$.

(Sneath & Sokal, 1973)

Tabla 2. Coeficientes de similitud utilizados en taxonomía numérica

COEFICIENTES	FÓRMULA
*Jaccard (S_j)	$S_j = \frac{a}{a + u} = \frac{a}{a + b + c}$
*Simple Coincidencia (S_{SM})	$S_{SM} = \frac{m}{m + u} = \frac{m}{n} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$
Yule (S_Y)	$S_Y = \frac{(ad - bc)}{(ad + bc)}$
Hamann	$S_H = \frac{a + d - b - c}{a + b + c + d}$
Diferencia Total	$S_{TD} = \frac{b + c}{a + b + c + d}$
No Métrica	$S_{NM} = \frac{b + c}{2a + b + c}$
Ochiai	$S_o = \frac{a}{\sqrt{(a + b)(a + c)}}$
Rogers y Tanimoto	$S_{RT} = \frac{a + d}{a + d + 2(b + c)}$
Pearson	$S_P = \frac{(ad - bc)^2}{(a + b)(a + c)(b + d)(c + d)}$

Nota: *Coeficientes más utilizados en taxonomía numérica microbiana.

Adaptado de Austin & Colwell, (1977)

Pruebas para caracterización fenotípica de actinomicetes

La caracterización taxonómica de actinomicetes es un aspecto muy importante en la búsqueda de metabolitos. Esta ciencia provee una visión informativa del microorganismo (Adegboye & Babalola, 2012).

En microbiología la taxonomía numérica implica la examinación de varias cepas para un gran número de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas antes de asignar el organismo de prueba a un grupo basado en opciones compartidas (Sharma, 2014).

Caracterización macroscópica

Cuando los actinomicetes son inoculados en un medio de cultivo forman una red de hifas cuyo crecimiento se produce tanto en la superficie (micelio aéreo) como debajo de la misma (micelio de sustrato) (Sharma, 2014). La caracterización macroscópica o en bruto, observa características del microorganismo como cantidad, presencia y color del micelio aéreo o de sustrato, esporulación y pigmentos difusibles (Labeda, 1987).

Caracterización microscópica

La caracterización microscópica observa la presencia y modo de esporulación (Labeda, 1987). Para este tipo de caracterización se utilizan medios estándar que permitan la esporulación del actinomicete como por ejemplo: agar extracto de levadura-extracto de malta (ISP2), agar avena (ISP 3), agar almidón-sales inorgánicas (ISP4) o agar glicerol-asparagina (ISP 5) (Shirling & Gottlieb, 1966).

Esta determina las características de la hifa esporulante y de la cadena de esporas, por medio de microscopía directa. Generalmente se utiliza la técnica del cubre objetos insertado en el medio de cultivo solidificado (Sharma, 2014).

En cultivos maduros (14-21 semanas) se determina el número de esporas al final de la hifa y se puede establecer como espora individual, en pares, cadenas de 3-10 esporas o en cadenas de más de 10 esporas. También se describe la forma de la cadena de esporas. En la Tabla 3 se puede observar los distintos tipos de morfologías que pueden presentar las cadenas de esporas, en algunos casos se puede observar más de un tipo de morfología. También es importante observar características como esporangios globulares, esporas flageladas, o esporas en forma de conidias y la ocurrencia de esclerocios. En la Figura 2 se presentan los distintos tipos de superficies que pueden ser observadas en las esporas. Si se cuenta con un microscopio electrónico se puede incluir microfotografías de la superficie de la espora (Shirling & Gottlieb, 1966).

Tabla 3. Tipos de morfología de las cadenas de esporas

Tipo	Símbolo
Recta	R
Flexibles	F
Bucles abiertos	RA
Espirales	S

Nota: Adaptado de Shirling & Gottlieb, (1966)

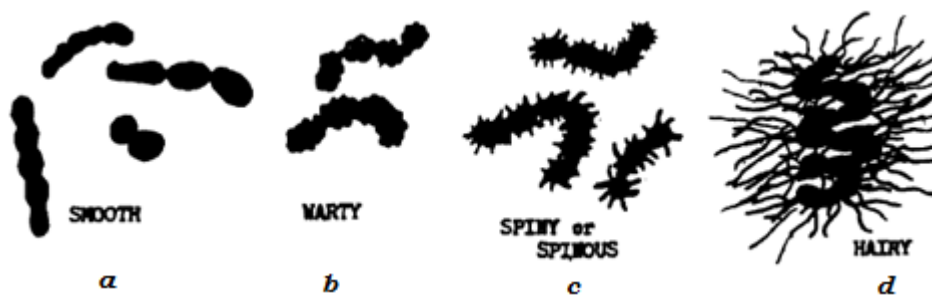


Figura 2. Características de los distintos tipos de superficie de las esporas.

Nota: a. Lisa b. Verrugosa c. Espinosa d. Peluda. Adaptado de Shirling & Gottlieb, (1966)

Pruebas fisiológicas

El estudio de las propiedades fisiológicas se encarga de analizar el crecimiento de los microorganismos en rangos de pH, temperatura, salinidad, tolerancia a fungicidas o a antibióticos (Sreevidya et al., 2016).

Se estudia la utilización de fuentes de carbono como almidón, glucosa, glicerol, sacarosa, maltosa, xilosa, lactosa y arabinosa o el aprovechamiento de fuentes de nitrógeno como sulfatos de amonio, cloruro de amonio, nitrato de potasio, nitrato de sodio, asparagina, caseína, extracto de levadura o harina de soya (Asef & Gupta, 2014).

Quimiotaxonomía

La composición de la pared celular en los actinomicetes varía grandemente y tiene una considerable significancia taxonómica. Ésta característica conjuntamente con el patrón total de azúcares en la célula, forman la quimiotaxonomía de microorganismos (Labeda, 1987). Los tipos de pared celular son establecidos a partir de las tres características de la composición y

estructura del peptidoglicano (i) isómero de ácido diaminopimélico en la posición tres de la cadena lateral tetrapeptídica, (ii) contenido de azúcar del peptidoglicano, (iii) presencia de glicina en puentes interpeptídicos (Sharma, 2014).

Pruebas bioquímicas

La realización de pruebas bioquímicas tales como indol, citrato, reducción de nitratos, producción de ácido sulfhídrico, además del análisis de la actividad enzimática extracelular como catalasa, oxidasa, gelatinasa, caseinasa, producción de lipasas, celulasas, o la secreción de sideróforos, son parámetros fisiológicos que permiten la identificación del microorganismo y su adecuada clasificación a nivel taxonómico (Asef & Gupta, 2014; Sreevidya et al., 2016).

Sin embargo, la taxonomía tradicional debido a su tamizaje inespecífico provoca dificultad al momento de identificar cepas productoras de metabolitos secundarios nuevos, debido a que diferentes cepas de actinomicetes pertenecientes a la misma especie son capaces de producir metabolitos secundarios diferentes, y metabolitos secundarios idénticos pueden ser producidos por cepas taxonómicamente distintas. Es por eso que los avances basados en la secuenciación son añadidos, proveyendo soluciones eficaces para el establecimiento de relaciones taxonómicas (Mangamuri, Muvva, Poda, & Kamma, 2012).

Caracterización genotípica

Los avances más influyentes en la taxonomía son a través del estudio de los ácidos nucleicos, alcanzando una nueva posición con la introducción de técnicas de secuenciamiento (Sharma, 2014).

La caracterización genotípica se basa en técnicas de extracción de ADN, amplificación de secuencias por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Dastager, Pandey, Lee, Li, & Kim, 2009) y su análisis por electroforesis en gel de agarosa (Sreevidya et al., 2016).

Además la secuenciación y comparación del gen amplificado permite generar un análisis de las relaciones entre los organismos estudiados, por medio de softwares y bancos de información genética (Smaoui et al., 2011).

Secuenciación del gen codificante para ARNr 16s

El advenimiento de tecnologías de secuenciación revelaron la secuencia nucleotídica de moléculas altamente conservadas como los ARNs ribosomales, permitiendo reflejar las relaciones genealógicas de los microorganismos, facilitando así la clasificación bacteriana (Stackebrandt, DeLong, Lory, & Thompson, 2014).

Los estudios filéticos apoyados en la amplificación y secuenciamiento del gen codificante para ARNr 16S, permiten la identificación del microorganismo a nivel de género y especie (Sharma, 2014).

Por razones prácticas relacionadas con el contenido informativo y fiable, del gen codificante del ARNr 16S, este ha sido establecido como una prioridad en la clasificación de procariotes (Stackebrandt et al., 2014).

rep - PCR

Existen varios métodos de tipificación genética (Tabla 4), sin embargo gracias a su sensibilidad el polimorfismo de elementos repetitivos (rep-PCR) se ha convertido en un método frecuente para diferenciar especies de bacterias sin la necesidad de conocer de antemano la secuencia genómica de la especie en estudio (Bezerra, Silva, & Valicente, 2013).

Los cromosomas bacterianos contienen múltiples secuencias repetitivas que ocupan regiones intergénicas dispersas a través del genoma y pueden servir como objetivos genéticos, permitiendo así la generación de un perfil único de ADN o fingerprinting individual de cepas bacterianas (Versalovic, de Bruijn, & Lupski, 1998).

Muchos de estos elementos repetitivos son secuencias conservadas en diversos géneros de bacterias y por lo tanto permite que un simple set de primers universales sea usado para generar fingerprintings de una gran variedad de microorganismos (Bezerra et al., 2013).

El proceso de rep-PCR fue introducido por Versalovic en 1991 y requiere fragmentos de ADN de distintos tamaños que pueden ser obtenidos por medio de amplificación por PCR (Figura 3), siendo complementarios a primers de secuencias repetitivas de oligonucleótidos. Los

amplicones pueden ser separados por electroforesis en gel de agarosa y constituir el patrón de ADN específico (fingerprinting) para las cepas individuales (Versalovic et al., 1998).

Tabla 4. Métodos de tipificación genotípica bacteriana

Método de Tipificación	Definición
Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	Separación de fragmentos largos de ADN aplicando cambios de dirección de corriente eléctrica.
Tipificación multilocus de secuencias (MLST)	Basada en los nucleótidos del cromosoma. Usa secuencias de generalmente siete genes consenso.
Polimorfismo de ADN amplificado arbitrariamente (RAPD)	Uso de primers arbitrarios para la generación de patrones específicos de especie.
Análisis del perfil plasmídico	Los ADNs plasmídicos son extraídos y separados por electroforesis en gel de agarosa.
Técnicas de secuenciamiento del ADN	Determinación del orden de las bases nucleotídicas en la molécula de ADN.
Consenso intergénico repetitivo Enterobacterial (ERIC)	Usa primers específicos para éste tipo de secuencias consenso, generando fingerprintings bacterianos.
Secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP)	Usa los elementos repetitivos de ADN para generar fingerprintings específicos de cepa.
Ribotipeado	Uso de endonucleasas de restricción para generar fragmentos de ADN, identificados por Southern blotting.
Polimorfismo de longitud de Fragmentos amplificados (AFLP)	Digestión del ADN genómico total para la identificación de polimorfismos.
Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	Utiliza las variaciones de las secuencias homologas de ADN para caracterizar la bacteria.

Nota: Adaptado de Adzitey, Huda, & Ali,(2013)

El fingerprinting o huella dactilar define cada cromosoma bacteriano sin la necesidad de medir la expresión de un gen o la función de una enzima, además refleja distancias variables entre los sitios de unión del primer a las secuencias repetitivas (Versalovic et al., 1998).

Las unidades palindrómicas (PU) o Palindromas repetitivos extragénicos (REP) fueron descritos por primera vez en los operones de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Cepni

& Gürel, 2012) y conforman una familia de secuencias repetitivas que consisten en una repetición invertida de 35-40 pb. Una segunda familia de elementos repetitivos son los llamados Unidades Intergénicas Repetitivas (IRU) o Consenso Intergénico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC), con una longitud de 124-127 pb. Ambas familias están similarmente ubicadas en regiones no codificantes o probablemente regiones transcritas del cromosoma. Por último el elemento consenso BOX, basado en primers cuyo objetivo son las secuencias altamente conservadas de la subunidad BOX A del elemento consenso BOX de *Streptococcus pneumoniae* (Rademaker et al., 2000), está constituido en sentido 5' - 3' de tres subunidades, boxA (59 pb), boxB (45pb) y boxC (50pb) (Bezerra et al., 2013).

La naturaleza palindrómica de estos elementos y su capacidad de formar estructuras de bucle en el ARN transcrito sugiere que tienen una función regulatoria asociada con la terminación transcripcional, la estabilidad del ARNm y la organización cromosomal en bacterias (Cepni & Gürel, 2012).



Figura 3. Etapas del método de tipado molecular rep-PCR. Nota. Adaptado de Olive & Bean, (1999).

Actualmente la taxonomía de procariotes se basa en las combinaciones polifásicas de características fenotípicas, quimio taxonómicas y genómicas (Ramasamy et al., 2014).

1.3 Objetivos

Objetivo General

Identificar mediante taxonomía polifásica la ubicación de actinomicetes con potencial biotecnológico dentro la clase *Actinobacteria*

Objetivos Específicos

Caracterizar actinomicetes fenotípicamente

Caracterizar actinomicetes genotípicamente por medio del método de tipificación rep –PCR

Identificar el género y especie de los actinomicetes representantes de grupos fenéticos

Hipótesis

Hipótesis Nula (H_0)

No existe diversidad biológica entre los actinomicetes de la colección caracterizada, en base al análisis de sus características fenotípicas y genotípicas.

Hipótesis Alternativa (H_0)

Existen al menos dos especies diferentes de actinomicetes en la colección caracterizada, en base al análisis de sus características fenotípicas y genotípicas.

Señalamiento de variables

Caracterización fenotípica

Caracterización macroscópica y microscópica de los actinomicetes.

Rango de crecimiento de los actinomicetes en base a temperatura, pH y salinidad.

Producción de enzimas extracelulares.

Utilización de aminoácidos como única fuente de nitrógeno.

Caracterización genotípica

Pruebas de rep-PCR para la obtención de fingerprintings.

Secuenciamiento de los amplicones del gen codificante para el ARNr 16s.

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

2.1 Caracterización fenotípica

Caracterización macroscópica

Se caracterizó una colección de 30 actinomicetes obtenidos de suelo de jardín (ANEXO A). Estos fueron crecidos en agar glucosa extracto de levadura y extracto de malta (GYM) y agar avena (ANEXO B) e incubados a 26°C durante dos semanas. Se formó grupos de color en base al color de micelio aéreo, color de micelio de sustrato y pigmento difusible con la ayuda de las tablas de colores Acrilex y British Standard Specification for colours for identification coding and special purposes (ANEXO D).

Caracterización microscópica

La morfología de la cadena de esporas se observó con la ayuda de cubreobjetos, portaobjetos y pinzas estériles, en cepas que fueron incubadas durante dos semanas a 26°C en agar GYM y avena. El cubreobjetos fue insertado en el momento de repicar la cepa y con la ayuda de las pinzas se colocó sobre el portaobjetos, fijándolo con esmalte sin color. Se observó al microscopio la placa y se identificó el tipo de morfología de la esporulación de acuerdo a la descripción de la Tabla 5.

Tabla 5. Tipos de morfología de esporulación

SÍMBOLO	TIPO	DESCRIPCIÓN
S	Espiral	Cadenas de esporas formando espirales abiertas o cerradas en el micelio aéreo.
R	Rectas	Cadenas de esporas rectas, cortas o largas.
RA	Incompletas	Cadenas de esporas en forma de ganchos, espirales incompletas, u onduladas.
E	Esporangios	Estructuras en forma de saco o bolsa que contiene en su interior esporas.
M	Esporas simples	Esporas individuales aparecen en las hifas del micelio aéreo.

Nota: Adaptado de Vinueza & Rodriguez, (2010)

Rango de crecimiento en función del pH

La determinación del rango de crecimiento de los actinomicetes en función del pH se realizó usando medio GYM, cuyo pH fue ajustado mediante un sistema de buffers (ANEXO B). Se inocularon 5 uL de las suspensiones de esporas previamente preparadas, en el medio de cultivo con valores pH de 3.5; 4.5; 5.5; 6.5; 7.5; 8.6 y 9.6. Las cajas se incubaron a 26 °C durante 7 días. El crecimiento se evaluó por código binario, si existió crecimiento se le asignó un valor de 1, caso contrario, en ausencia de crecimiento, 0. La clasificación de los actinomicetes se realizó en base a la información de la Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de los microorganismos en base al rango de crecimiento en función del pH del medio

pH del medio							Clasificación
3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.6	9.6	
+	+	+	-	-	-	-	Acidófilo
+	+	+	+	-	-	-	Neutrotolerante
+	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
-	-	+	+	+	-	-	Neutrófilo
-	-	-	+	+	-	-	Neutrófilo
-	-	-	+	-	-	-	Neutrófilo
-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
-	-	-	-	+	+	+	Alcalófilo

Nota: Adaptado de Garzón, (2013)

Rango de crecimiento en función de la salinidad

La determinación del rango de crecimiento de los actinomicetes en función de la salinidad se realizó en agar GYM. Se inocularon 5 uL de las suspensiones de esporas en el medio de cultivo con concentraciones de salinidad del 1%, 2%, 5% y 10% (peso/volumen). Las cajas se incubaron a 26 °C durante 7 días. El crecimiento se evaluó por código binario, si existió crecimiento se le designó un valor de 1, caso contrario en ausencia de crecimiento, 0. La clasificación de los actinomicetes se realizó en base a la información de la Tabla 7.

Tabla 7. Clasificación de los microorganismos en base al rango de crecimiento en función de la salinidad del medio

NaCl (%)				Clasificación
1	2	5	10	
+	-	-	-	Halotolerante
+	+	+	-	Halófilo
+	+	+	+	Halófilo extremo

Nota: Adaptado de Garzón, (2013)

Rango de crecimiento en función de la temperatura

La determinación del rango de crecimiento de los actinomicetes en función de la temperatura se realizó en agar GYM. Se inocularon 5 uL de las suspensiones de esporas en el medio de cultivo y las cajas se incubaron a temperaturas de 4 °C, 26 °C, 37 °C y 50 °C durante 7 días. El crecimiento se evaluó por código binario, si existió crecimiento se le designó un valor de 1, caso contrario en ausencia de crecimiento, 0. La clasificación de los actinomicetes se realizó en base a la información de la Tabla 8.

Tabla 8. Clasificación de los microorganismos en base al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación

Temperaturas de incubación °C				Clasificación
4	26	37	50	
+	-	-	-	Psicrófilo
+	+	-	-	Psicrótrofo
+	+	+	-	Mesófilo
+	+	+	+	Mesófilo extremo

Nota: Adaptado de Garzón, (2013)

Actividad enzimática extracelular

Se determinó la actividad enzimática extracelular de los actinomicetes con el uso de un medio basal (ANEXO B) tomando como fuente de carbono distintos carbohidratos como celulosa, almidón, quitina y cascarilla, inoculando 5 uL de las suspensiones de esporas en el medio. Las cajas fueron incubadas a 26 °C durante 7 días. Se evaluó la actividad enzimática por código binario, con la colocación de lugol en el medio, observando la presencia o ausencia de un halo

de hidrólisis alrededor de las colonias. Si existió presencia del halo se le designó un valor de 1, caso contrario en ausencia de crecimiento, 0.

Aminoácidos como fuente de nitrógeno y carbono

Se determinó el crecimiento de los actinomicetes en un medio basal con distintos aminoácidos como fuente de nitrógeno y carbono. Los aminoácidos que se utilizaron fueron ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, histidina, leucina, lisina, tirosina, treonina y valina. Se inocularon 5 uL de la suspensión de esporas en el medio de cultivo, las cajas fueron incubadas a 26 °C durante 7 días. El crecimiento se evaluó por código binario, si existió crecimiento se le designó un valor de 1, caso contrario en ausencia de crecimiento, 0.

Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Los datos obtenidos a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos fueron procesados con el programa NTSYS, calculando los porcentajes de similitud con el coeficiente de simple similitud (SSM) y éstos fueron utilizados para la construcción del dendrograma mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Los grupos fenéticos fueron identificados en base a un corte al 88.6% de similitud.

2.2 Caracterización genotípica

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se hizo crecer los cultivos en agar no esporulante (ANEXO B) durante cuatro días a 26 °C sobre una membrana de celulosa, para que éstos no se adhirieran al agar provocando errores en los procesos posteriores. En tubos de microcentrifuga estériles se colocó alrededor de 0.05 g de perlas de vidrio de diámetro $\leq 106 \mu\text{m}$ (Sigma), conjuntamente con 400 uL de buffer de extracción (ANEXO B), con palillos estériles se raspó la totalidad del cultivo crecido sobre la membrana y se colocó en el tubo de micro centrifuga sin tocar las perlas de vidrio, ni mezclar los componentes. Se dejó en congelación durante 24 horas. Luego los tubos se descongelaron a temperatura ambiente y se procedió con la vortización de los mismos durante 10 minutos, se centrifugaron a máxima velocidad (15000 rpm) por 20 minutos (a temperatura de refrigeración). Posteriormente se colocaron 200 uL del sobrenadante evitando la biomasa y 200 uL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (Ambion) en un

nuevo tubo de microcentrifuga estéril, mezclando uniformemente pero no de forma vigorosa para evitar la fragmentación del ADN. Se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos (a temperatura de refrigeración). En un nuevo tubo de microcentrifuga estéril se colocó 150 uL del sobrenadante y se añadió 300 uL de etanol al 100% frío (2:1), se centrifugó nuevamente a máxima velocidad por 20 minutos. De aquí en adelante se procedió al lavado del ADN. Se descartó el sobrenadante con cuidado de no perder el precipitado y se lavó con 500 uL de etanol al 70% frío, se centrifugó a velocidad máxima durante 15 minutos. Se repitió este paso una vez más. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se colocaron los tubos boca abajo dejándolos secar a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas o hasta que el olor a etanol haya desaparecido. Finalmente se resuspendió el ADN en 40 uL de buffer TE 1X (ANEXO B).

Determinación de concentración, pureza e integridad del ADN

Para determinar la concentración y pureza del ADN extraído, se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Fisher), posteriormente se determinó la integridad del ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó una solución al 1% de agarosa en buffer TBE 0.5 X (ANEXO B), y se añadió a la mezcla Sybersafe 10000X (Invitrogen) a 1 uL por cada 10 ml de agarosa líquida, se mezcló hasta formar una solución rosada homogénea y se vertió en la placa de electroforesis. Después de solidificarse se procedió a colocar la misma en un tanque de electroforesis con buffer TBE 0.5X. El gel se cargó con 2 uL de Ladder TrackIt 100 bp DNA (Invitrogen), 0.8 uL de loading buffer 10X (Invitrogen) y 4 uL del ADN extraído, se dejó correr durante 35 minutos a 100 V con una fuente de poder Enduro 300 V (Labnet). Para la visualización se utilizó un fotodocumentador ChemiDoc (BIORAD). Las imágenes fueron obtenidas en formato TIFF. Se realizó nuevamente la extracción de ADN en aquellas muestras donde no se visualizó la banda ni se determinó concentración por Nanodrop.

rep – PCR

Para la caracterización genotípica de las cepas se utilizó el método de tipificación rep-PCR, con los primers BOX y ERIC.

BOX

Para el primer BOX se utilizó el PCR- SuperMix (Invitrogen) en una mezcla descrita de acuerdo a la Tabla 9 dando un volumen total de 22 uL. La cantidad de cada ingrediente se multiplicó

por el número de muestras. Previo a la mezcla los componentes se vortearon, centrifugaron y se colocaron en un tubo eppendorf de 0.6 ml, toda la reacción se realizó en frío con la ayuda de un cubo de congelamiento. La mezcla se dividió para el número de muestras a amplificar y se colocó en tubos PCR de 0.2 ml, éstos se vortearon, centrifugaron y se colocaron en un termociclador Multigene Optimax (Labnet). La reacción de PCR se realizó en base a las condiciones de la Tabla 10. La concentración de ADN utilizado fue de 50 ng/uL.

Tabla 9. Mezcla Master con PCR-SuperMix para el primer BOX

INGREDIENTE	CANTIDAD
PCR Super Mix	20 uL
BOX A1R1	1 uL
ADN	1 uL

Tabla 10. Condiciones para BOX-PCR

ETAPAS	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	1
Desnaturalización	94 °C	45 seg	
Alineamiento	52 °C	1 min 15 seg	35
Extension	70 °C	8 min	
Extensión final	72 °C	10 min	1
Hold	4 °C	∞	1

ERIC

Para la realización de rep-PCR con el primer ERIC se procedió de la misma forma que con BOX pero con un volumen total de mezcla master de 25 uL y 0,1 uL de Taq Polimerasa Recombinante (Invitrogen) colocada en la etapa Hold de 80°C. La mezcla master se realizó de acuerdo a la descripción de la Tabla 11, y el proceso de PCR se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones presentadas en la Tabla 12. La concentración de ADN utilizado fue de 50 ng/uL.

Para la visualización de los fingerprintings en base a rep-PCR se utilizó 4 uL de Ladder TrackIt 1 Kb plus DNA (Invitrogen), 18 uL de los amplicones y 2 uL de loading buffer 10X fueron

cargados en un gel de agarosa de 1.28% con buffer TBE 0.5X. La electroforesis se realizó a 70 V durante cuatro horas. Se visualizó a luz ultravioleta con la ayuda del fotodocumentador ChemiDoc (BIORAD). Las imágenes fueron obtenidas en formato TIFF.

Tabla 11. Mezcla Master para el primer ERIC

INGREDIENTE	CANTIDAD
Agua Ultra Pura	Hasta 25 uL
10X Taq Buffer	2,5 uL
50 mM MgCl ₂	0,75 uL
12,5 mM dNTP's	0,75 uL
E1 (20 uM)	1 uL
E2 (20 uM)	1 uL
DMSO	2 uL
ADN	1 uL

Tabla 12. Condiciones para ERIC-PCR

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
Hold	80°C	∞	1
Activación Taq	94 °C	2 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineamiento	52 °C	30 seg	35
Extensión	70 °C	45 seg	
Extensión Final	72 °C	20 min	1
Hold	4 °C	∞	1

Taxonomía numérica de datos genotípicos

Los datos obtenidos a partir de taxonomía numérica de datos genotípicos fueron procesados con el programa GelJ, calculando los porcentajes de similaridad con el coeficiente de correlación de Pearson y éstos fueron utilizados para la construcción del dendrograma mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Los grupos genotípicos fueron identificados en base a un corte al 80% de similaridad.

Amplificación y secuenciamiento del gen codificante del ARNr 16S

Para la amplificación y secuenciamiento del gen codificante del ARNr 16S se realizó la extracción de ADN como se menciona anteriormente con la diferencia de que la resuspensión se realizó en 40 uL de agua ultrapura. Las muestras fueron enviadas a Macrogen (USA). La Tabla 13 muestra los primers utilizados para los procesos de amplificación y secuenciamiento de los actinomicetes representantes escogidos. Las condiciones para estos procesos fueron protocolos propios de la empresa.

Tabla 13. Primers utilizados para procesos del gen codificante del ARNr 16S

PRIMER	SECUENCIA	PROCESO
1492 R	5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT ^{3'}	Amplificación
27 F	5'AGAGTTTGATCMTGGCTCA ^{3'}	
800R	5'TACCAGGGTATCTAATCC ^{3'}	Secuenciamiento
518F	5'CCAGCAGCCGCGGTAATACG ^{3'}	

Identificación molecular y análisis filogenético

Para el alineamiento y análisis filogenético se procedió a obtener las secuencias completas del gen codificante del ARNr 16S a partir de las secuencias parciales de cada primer en cada actinomicete, y se realizó la alineación de las mismas con secuencias similares hasta obtener una secuencia consenso de alrededor de 1400 nucleótidos, todo esto con la ayuda del programa PHYDIT (Chun, 1995, 1999). Aquellos casos en los que funcionó solo un primer o solo secciones cortas por cada primer (secuencias parciales entre 750 hasta 1300 nt), no se tomaron en cuenta para la realización del árbol filogenético. La secuencia obtenida fue alineada manualmente utilizando la opción "pairwise alignment" de forma conjunta con la información de su estructura secundaria, con el programa mencionado anteriormente. Se comparó con otras secuencias de géneros relacionados obtenidas de la base de datos del GenBank mediante la opción BLAST-N del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las distancias evolutivas fueron calculadas por el algoritmo de Jukes & Cantor (Jukes & Cantor, 1969), para de forma posterior construir el árbol filogenético en base al algoritmo de Neighbor joining (Saitou & Nei, 1987). La congruencia de la topología del árbol se determinó mediante análisis de Bootstrap (Felsenstein, 1985) en base a 1000 sets de datos.

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

Caracterización fenotípica

El resumen de los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica se puede visualizar en la Tabla 25 (ANEXO A).

Caracterización macroscópica

La Tabla 14 muestra los cinco grupos de color obtenidos en base a la caracterización macroscópica. De éstos, cuatro grupos fueron conformados por al menos cinco actinomicetes y sólo un grupo estuvo conformado por un único representante. El color predominante en ambos medios de cultivo fue White. El actinomicete DBV-022 (grupo 5) no presentó micelio aéreo en agar GYM, mientras que el actinomicete DBV-018 no presentó pigmento difusible en agar Avena.

Tabla 14. Grupos de color formados a partir de la caracterización macroscópica

GRUPO DE COLOR	ID DEL ACTINOMICETE
1	DBV-001, DBV-005, DBV-006, DBV-007, DBV-011, DBV-012, DBV-014, DBV-019, DBV-027, DBV-028
2	DBV-002, DBV-009, DBV-010, DBV-015, DBV-023
3	DBV-003, DBV-004, DBV-008, DBV-013, DBV-017
4	DBV-016, DBV-018, DBV-020, DBV-021, DBV-024, DBV-025, DBV-026, DBV-029, DBV-030
5	DBV-022

Caracterización microscópica

22 actinomicetes presentaron cadena de esporas en forma de espiral rígida y los actinomicetes restantes presentaron cadena de esporas en forma RA (Incompleta).

Rango de crecimiento en función del pH

La Tabla 15 muestra la clasificación de los actinomicetes en base a su crecimiento en rango de pH, determinando así 26 actinomicetes neutrotolerantes con crecimiento en un rango de pH de 4.5 a 6.5, de los cuales únicamente el DBV-026 no creció a pH 4.5 y cuatro actinomicetes alcalitolerantes con crecimiento en un rango de pH de 4.5 a 9.6.

Tabla 15. Clasificación de los actinomicetes en base a su rango de crecimiento en pH

ID DEL ACTINOMICETE	pH						CLASIFICACIÓN
	4,5	5,5	6,5	7,5	8,6	9,6	
DBV - 001	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 002	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 003	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 004	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 005	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 006	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 007	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 008	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 009	1	1	1	1	1	1	Alcalitolerante
DBV - 010	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 011	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 012	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 013	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 014	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 015	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 016	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 017	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 018	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 019	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 020	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 021	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 022	1	1	1	1	1	1	Alcalitolerante
DBV - 023	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 024	1	1	1	1	1	1	Alcalitolerante
DBV - 025	1	1	1	1	1	1	Alcalitolerante
DBV - 026	0	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 027	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 028	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 029	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
DBV - 030	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante

Rango de crecimiento en función de la salinidad

La Tabla 16 muestra la clasificación de los actinomicetes en base a su crecimiento en rango de salinidad, determinando así 27 actinomicetes halófilos, dentro de los cuales doce actinomicetes crecieron hasta una concentración del 2% y 15 actinomicetes hasta el 5% de salinidad en el medio. Únicamente tres actinomicetes fueron determinados como halotolerantes.

Tabla 16. Clasificación de los actinomicetes en base a su rango de crecimiento en salinidad

ID DEL ACTINOMICETE	SALINIDAD			CLASIFICACIÓN
	1%	2%	5%	
DBV-001	1	1	0	Halófilo
DBV-002	1	0	0	Halotolerante
DBV-003	1	1	1	Halófilo
DBV-004	1	1	1	Halófilo
DBV-005	1	0	0	Halotolerante
DBV-006	1	0	0	Halotolerante
DBV-007	1	1	0	Halófilo
DBV-008	1	1	1	Halófilo
DBV-009	1	1	1	Halófilo
DBV-010	1	1	0	Halófilo
DBV-011	1	1	0	Halófilo
DBV-012	1	1	1	Halófilo
DBV-013	1	1	1	Halófilo
DBV-014	1	1	0	Halófilo
DBV-015	1	1	0	Halófilo
DBV-016	1	1	0	Halófilo
DBV-017	1	1	0	Halófilo
DBV-018	1	1	1	Halófilo
DBV-019	1	1	0	Halófilo
DBV-020	1	1	1	Halófilo
DBV-021	1	1	1	Halófilo
DBV-022	1	1	1	Halófilo
DBV-023	1	1	0	Halófilo
DBV-024	1	1	0	Halófilo
DBV-025	1	1	1	Halófilo
DBV-026	1	1	0	Halófilo
DBV-027	1	1	1	Halófilo
DBV-028	1	1	1	Halófilo
DBV-029	1	1	1	Halófilo
DBV-030	1	1	1	Halófilo

Rango de crecimiento en función de la temperatura

Los actinomicetes fueron evaluados a cuatro distintas temperaturas. Ningún actinomicete presentó crecimiento en las temperaturas de 4 °C y 50 °C, 28 actinomicetes presentaron crecimiento a 37 °C y todos los actinomicetes presentaron crecimiento a 26°C. Los actinomicetes DBV-002 y DBV-006 crecieron únicamente a 26°C. La colección se determinó como mesófila. Los resultados pueden observarse en la Tabla 17.

Tabla 17. Rango de crecimiento de actinomicetes en función de la temperatura

ID DEL ACTINOMICETE	TEMPERATURA			
	4 °C	26°C	37 °C	50 °C
DBV – 001	0	1	1	0
DBV – 002	0	1	0	0
DBV – 003	0	1	1	0
DBV – 004	0	1	1	0
DBV – 005	0	1	1	0
DBV – 006	0	1	0	0
DBV – 007	0	1	1	0
DBV – 008	0	1	1	0
DBV – 009	0	1	1	0
DBV – 010	0	1	1	0
DBV – 011	0	1	1	0
DBV – 012	0	1	1	0
DBV – 013	0	1	1	0
DBV – 014	0	1	1	0
DBV – 015	0	1	1	0
DBV – 016	0	1	1	0
DBV – 017	0	1	1	0
DBV – 018	0	1	1	0
DBV – 019	0	1	1	0
DBV – 020	0	1	1	0
DBV – 021	0	1	1	0
DBV – 022	0	1	1	0
DBV – 023	0	1	1	0
DBV - 024	0	1	1	0
DBV - 025	0	1	1	0
DBV - 026	0	1	1	0
DBV - 027	0	1	1	0
DBV - 028	0	1	1	0
DBV - 029	0	1	1	0
DBV - 030	0	1	1	0

Actividad enzimática extracelular

En la prueba de actividad enzimática extracelular todos los actinomicetes tuvieron la capacidad de degradar celulosa, quitina y cascarilla a excepción del actinomicete DBV-021 que presentó actividad enzimática nula, sin embargo la capacidad de degradar almidón fue observada únicamente en los actinomicetes DBV-009, DBV-010, DBV-011 y DBV-012. Los resultados se pueden observar en la Tabla 25 (ANEXO A).

Aminoácidos como fuente de nitrógeno y carbono

La Tabla 18 muestra que la colección de actinomicetes utilizó al menos nueve aminoácidos para su crecimiento. Ninguno de ellos creció en ácido aspártico o ácido glutámico, dieciocho crecieron en lisina y dos actinomicetes el DBV-006 y el DBV-026 no crecieron en arginina.

Tabla 18. Crecimiento de actinomicetes con aminoácidos como fuente de nitrógeno

ID DEL ACTINOMICETE	FUENTE DE NITRÓGENO Y CARBONO												
	LYS	GLU	CYS	LEU	ALA	ASN	HIS	VAL	PHE	THR	TYR	ARG	ASP
DBV-001	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-002	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-003	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-004	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-005	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-006	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
DBV-007	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-008	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-009	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-010	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-011	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-012	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-013	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-014	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-015	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-016	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-017	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-018	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-019	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-020	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-021	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-022	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-023	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-024	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-025	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-026	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
DBV-027	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-028	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-029	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DBV-030	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

Taxonomía numérica de datos fenotípicos

En la Figura 4 se observa el dendrograma obtenido a partir del análisis de datos fenotípicos con un corte al 88.6% de similitud, a partir de éste se determinaron diez grupos fenéticos que pueden ser visualizados en la Tabla 19, cinco conformados por un solo miembro, los grupos restantes se constituyeron por al menos dos individuos. El grupo más amplio es el grupo dos con 14 miembros.

Tabla 19. Grupos fenéticos obtenidos a partir del análisis de datos fenotípicos

GRUPO FENÉTICO	ID DEL ACTINOMICETE
1	DBV-001, DBV-014, DBV-011, DBV-017
2	DBV-003, DBV-004, DBV-008, DBV-023, DBV-005, DBV-016, DBV-019, DBV-007, DBV-027, DBV-020, DBV-029, DBV-030, DBV-018, DBV-028
3	DBV-002, DBV-006
4	DBV-010
5	DBV-012, DBV-013, DBV-015
6	DBV-026
7	DBV-009
8	DBV-022
9	DBV-024, DBV-025
10	DBV-021

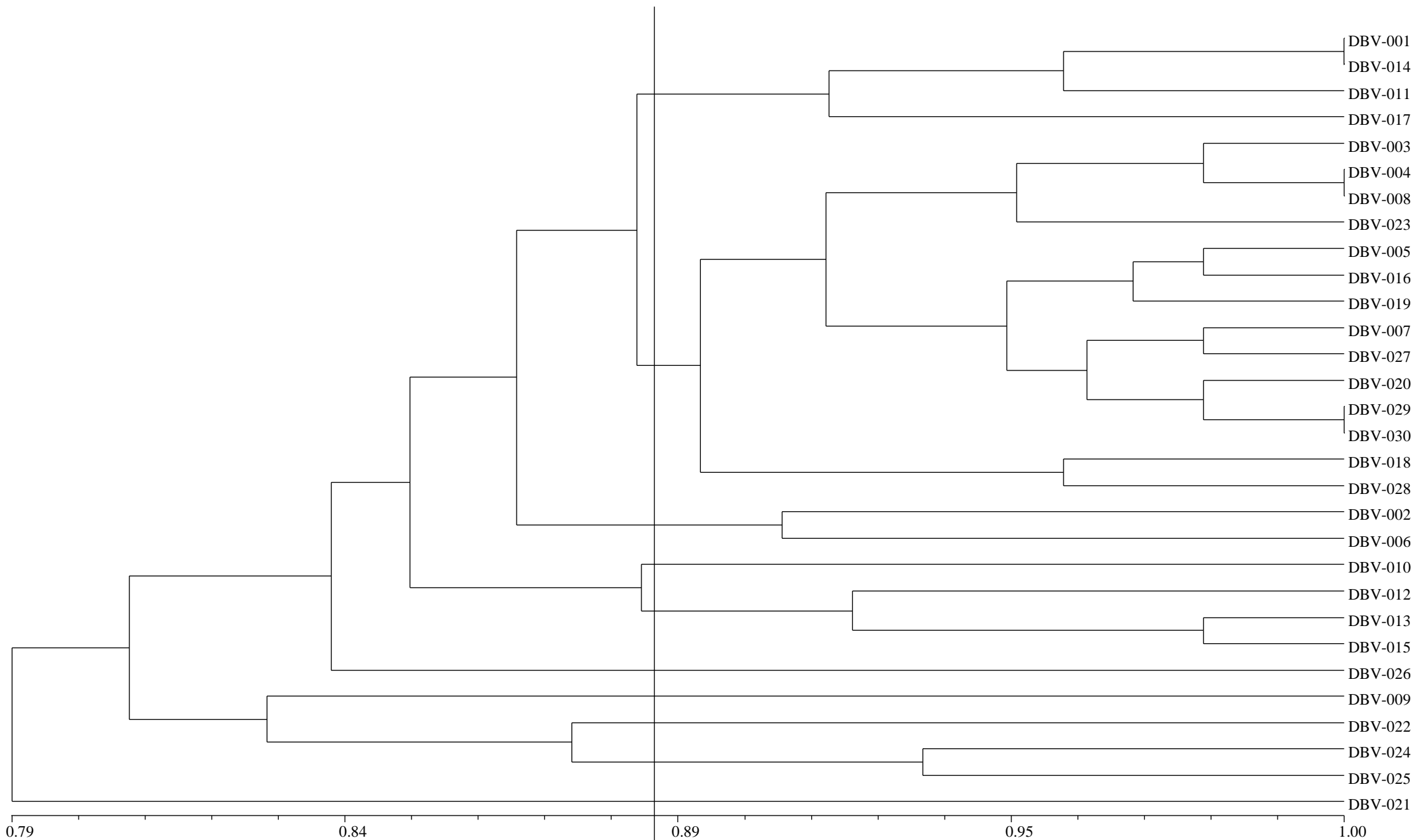


Figura 4. Dendrograma obtenido a partir del análisis de datos fenotípicos con corte al 88.6% de similitud mediante el coeficiente de simple similitud (SSM) y el algoritmo UPGMA

Caracterización genotípica

Determinación de concentración, pureza e integridad del ADN

En la Figura 5 se observa el ADN extraído de la colección de actinomicetes. La banda de ADN genómico se visualiza en la parte superior de cada muestra. Se observó también la presencia de ARN ribosomal.

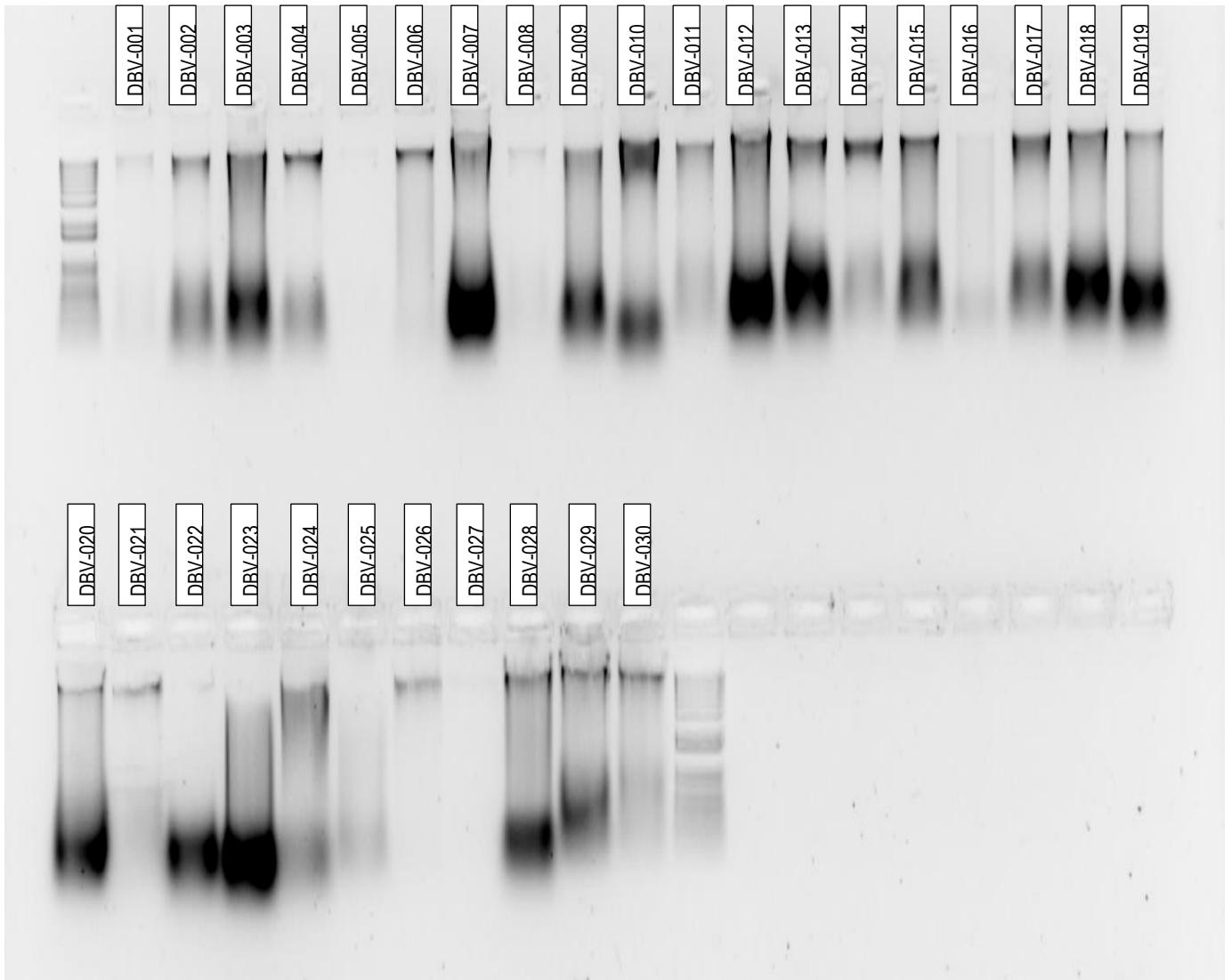


Figura 5. Gel de electroforesis del ADN extraído de la colección de actinomicetes por el método de fenol-cloroformo



Figura 6. Posición de ADN genómico en el gel de electroforesis

rep – PCR

La Figura 7 muestra el fingerprinting realizado a la colección de actinomicetes por el método de rep-PCR con el primer BOX. Con el primer ERIC no hubo resultados eficientes ni en cantidad ni en visibilidad de bandas en todas las muestras, por lo que no se tomó en cuenta para la generación del análisis genotípico. Mientras que el genotipado con el primer BOX, brindó bandas en todos los microorganismos, permitiendo observar las posibles relaciones entre los mismos.

Taxonomía numérica de datos genotípicos

En la Figura 8 se observa el dendrograma obtenido a partir del análisis de datos genotípicos con un corte al 80% de similitud. La Tabla 20 muestra los seis grupos genotípicos identificados, conformados por al menos tres miembros. El grupo cuatro es el más extenso constituido por 11 actinomicetes.

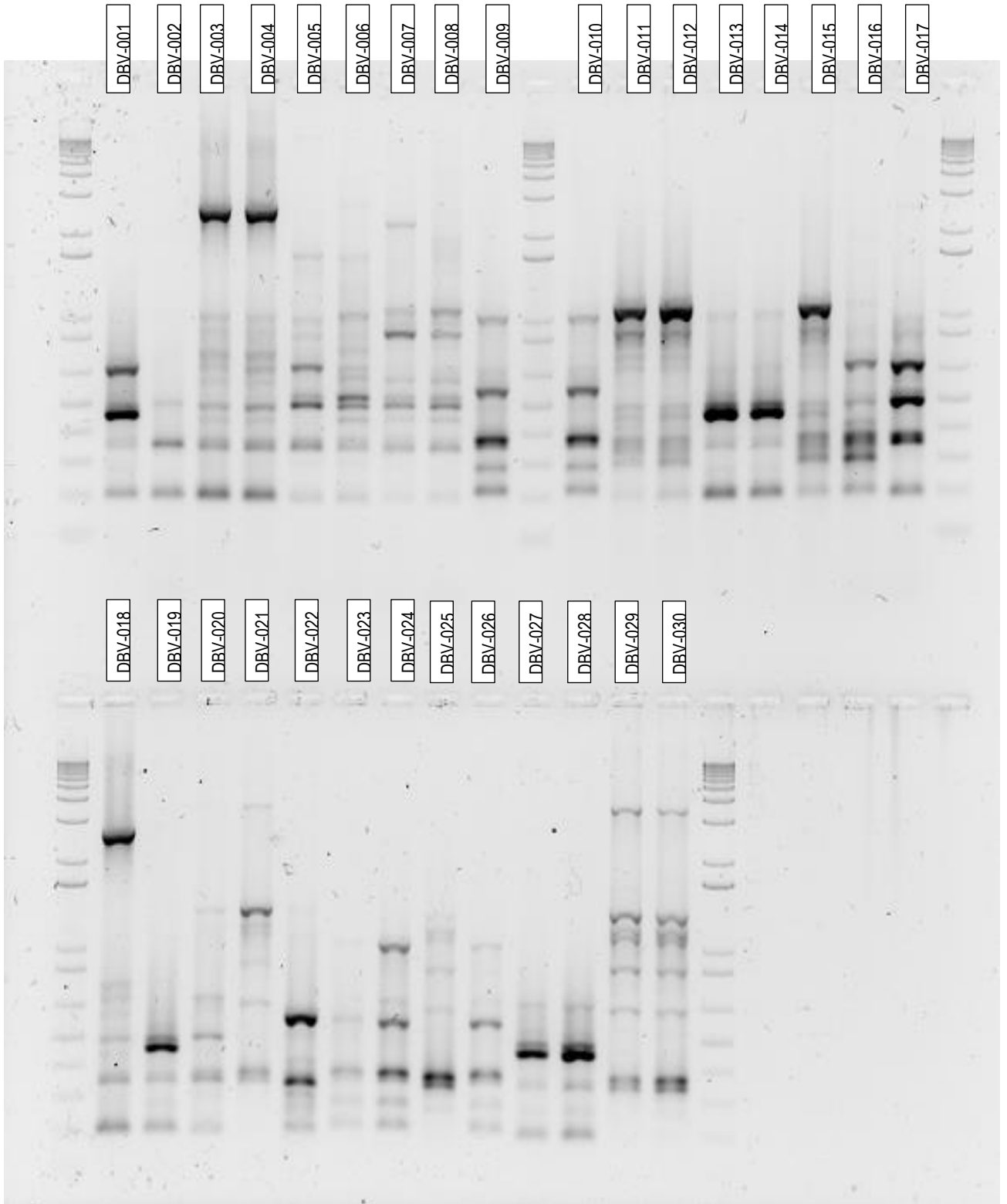


Figura 7. Genotipado de la colección de actinomicetes por el método de rep-PCR con el primer BOX

Tabla 20. Grupos genéticos obtenidos a partir del análisis genotípico

GRUPO GENOTÍPICOS	ID DEL ACTINOMICETE
1	DBV-018, DBV-004, DBV-003
2	DBV-015, DBV-012, DBV-011
3	DBV-008, DBV-007, DBV-006, DBV-005
4	DBV-030, DBV-029, DBV-025, DBV-021, DBV-023, DBV-020, DBV-022, DBV-026, DBV-024, DBV-010, DBV-009
5	DBV-017, DBV-016, DBV-002
6	DBV-028, DBV-027, DBV-019, DBV-014, DBV-013, DBV-001

Amplificación y secuenciamiento del gen codificante del ARNr 16S

La Tabla 21 muestra los códigos de los 25 actinomicetes escogidos para el secuenciamiento con su respectiva medición de concentración de ADN y sus relaciones 260/280 y 260/230.

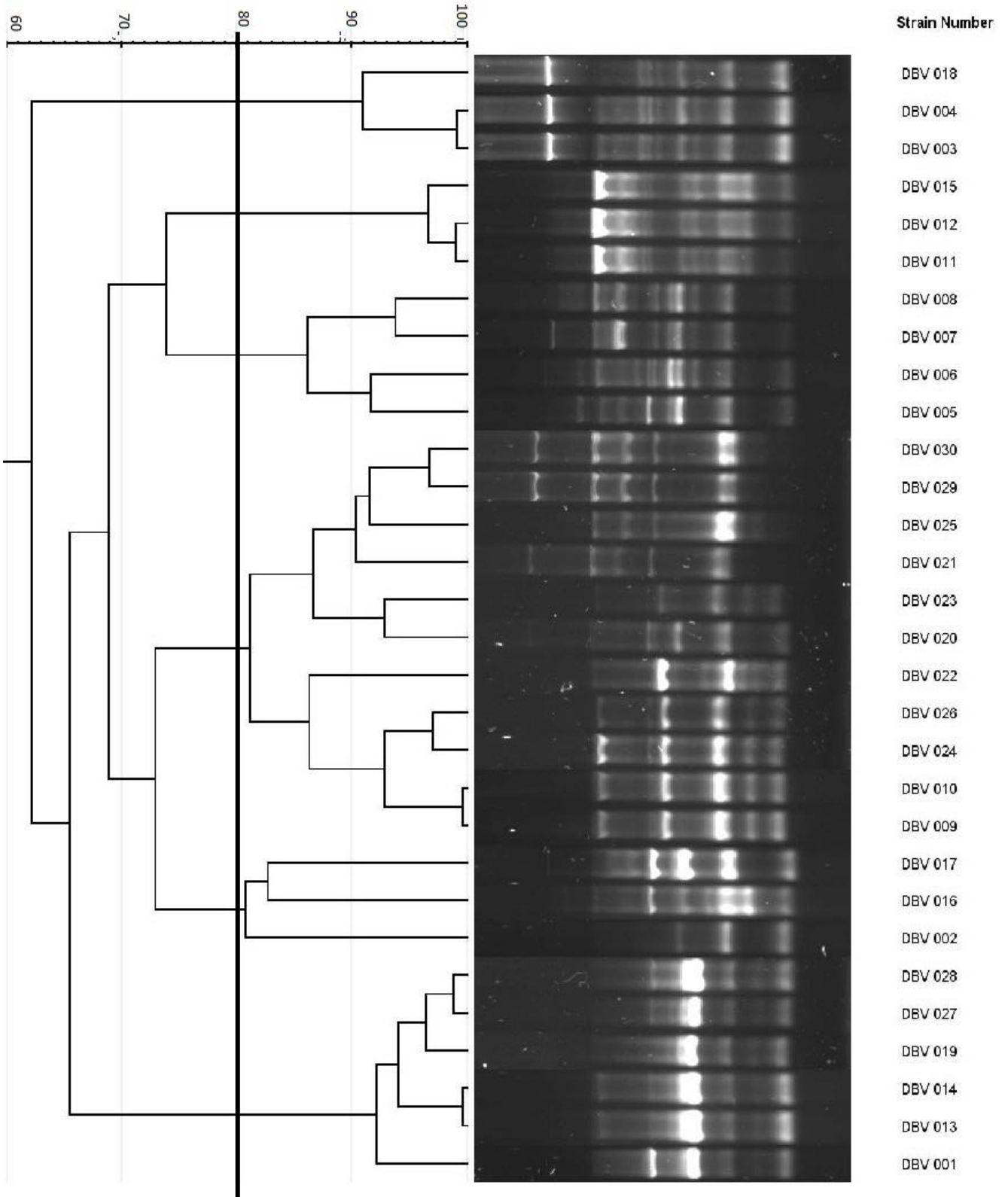


Figura 8. Dendrograma con corte al 80% de similitud obtenido a partir del fingerprinting por rep-PCR con el primer BOX mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA

Tabla 21. Concentración de ADN extraído de actinomicetes escogidos para secuenciamiento

ID ACTINOMICETE	CONCENTRACIÓN	260/280	260/230
DBV-001	594,833	1,747	1,100
DBV-002	420,700	1,840	1,077
DBV-004	198,367	1,593	0,690
DBV-005	-0,225	2,880	-0,035
DBV-006	366,667	1,750	0,957
DBV-008	136,300	1,907	1,993
DBV-009	767,900	1,703	0,933
DBV-010	213,733	1,970	1,797
DBV-011	442,867	1,807	1,163
DBV-014	745,133	1,937	1,730
DBV-015	345,267	1,710	0,797
DBV-016	456,900	1,547	0,773
DBV-017	24,300	1,760	1,577
DBV-018	487,967	1,867	1,617
DBV-019	794,567	1,783	1,043
DBV-020	350,100	1,867	1,563
DBV-021	402,233	1,840	1,683
DBV-022	319,100	1,860	1,637
DBV-023	901,433	1,823	1,070
DBV-024	850,433	1,903	1,467
DBV-025	443,833	1,860	1,803
DBV-026	731,233	1,903	1,680
DBV-028	93,567	1,470	0,510
DBV-029	382,367	1,737	1,047
DBV-030	566,200	1,747	1,003

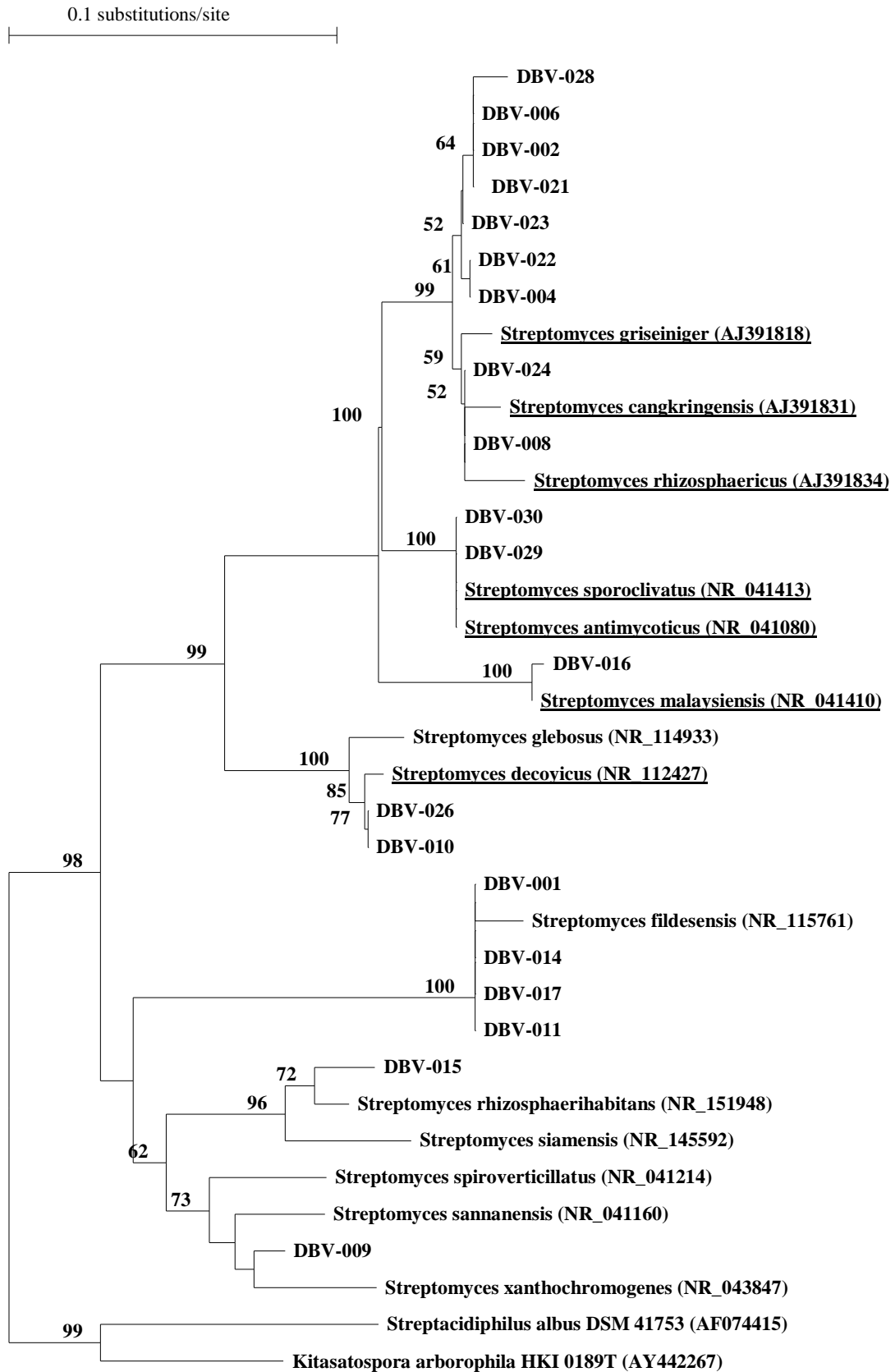


Figura 9. Análisis filogenético en base a la secuencia consenso del gen codificante para el ARNr 16S calculado mediante Neighbor joining (Saitou & Nei, 1987) Nota: Las especies subrayadas son las pertenecientes al clado de *Streptomyces violaceus niger* ARNr 16s.

Identificación molecular y análisis filogenético

La Figura 9 muestra el análisis filogenético realizado a las cepas de actinomicetes representantes. En base al mismo se determinó que todas éstas se encuentran dentro del género *Streptomyces* perteneciente a la familia *Streptomycetaceae* y al orden *Streptomycetales* (Goodfellow et al., 2012). Se identificó nueve especies a nivel molecular que pueden observarse en la Tabla 22 de forma conjunta con el número de miembros, su codificación y el grupo de color al que pertenecen. Además se muestra el número de nucleótidos de la secuencia consenso del gen codificante del ARNr 16S de cada actinomicete, el número mayor es del DBV-002 perteneciente a *Streptomyces griseiniger* y el menor del DBV-017 perteneciente a *Streptomyces fildesensis*. La matriz de similitud y diferencia de nucleótidos y las secuencias consenso de cada actinomicete se pueden observar en las Tablas 26 y 27 respectivamente (ANEXO A).

Tabla 22. Agrupación de actinomicetes en base a su identificación molecular

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NMERO DE MIEMBROS	ID DEL ACTINOMICETE	GRUPO DE COLOR	NÚMERO DE NUCLEÓTIDOS
<i>Streptomyces griseiniger</i>	7	DBV-028	1	1455
		DBV-006	1	1477
		DBV-002	2	1503
		DBV-021	4	1467
		DBV-023	2	1471
		DBV-022	5	1465
		DBV-004	3	1460
<i>Streptomyces cangkringensis</i>	1	DBV-024	4	1456
<i>Streptomyces rhizozphaericus</i>	1	DBV-008	3	1455
<i>Streptomyces sporoclivatus</i>	2	DBV-030	4	1457
		DBV-029	4	1454
<i>Streptomyces malaysiensis</i>	1	DBV-016	4	1451
<i>Streptomyces decoyicus</i>	2	DBV-026	4	1456
		DBV-010	2	1458
<i>Streptomyces fildesensis</i>	4	DBV-001	1	1458
		DBV-014	1	1454
		DBV-017	3	1453
		DBV-011	1	1458
<i>Streptomyces rhizosphaerihabitans</i>	1	DBV-015	2	1462
<i>Streptomyces spiroverticillatus</i>	1	DBV-009	2	1456

En la Tabla 23 se presenta la agrupación de los actinomicetes en base a su identificación molecular, comparándolos fotográficamente, visualizando las similitudes y diferencias macroscópicas entre las cepas dentro del mismo grupo molecular.

Tabla 23. Fotografías de cepas agrupadas en base a su identificación molecular


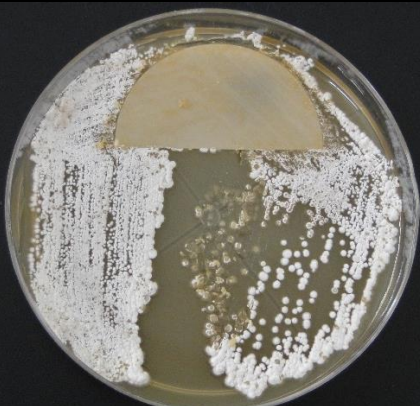
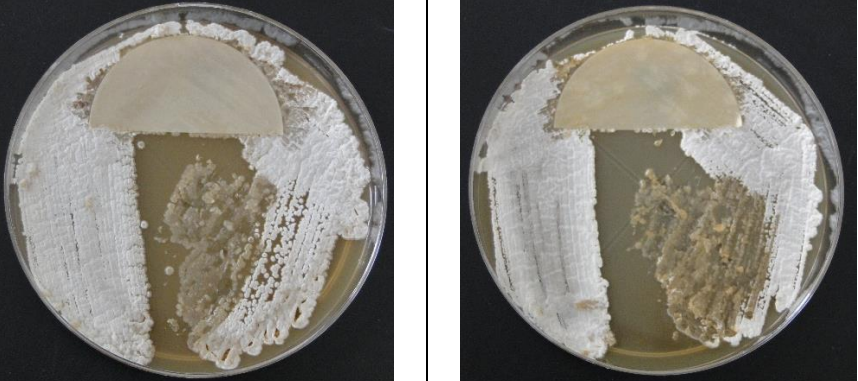
CEPAS	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR
 <p data-bbox="676 1010 778 1039">DBV-024</p>	<p data-bbox="1262 770 1442 860"><i>Streptomyces cangkringensis</i></p>
 <p data-bbox="676 1458 778 1487">DBV-008</p>	<p data-bbox="1262 1218 1442 1308"><i>Streptomyces rhizosphaericus</i></p>
 <p data-bbox="443 1906 545 1935">DBV-029</p> <p data-bbox="906 1906 1008 1935">DBV-030</p>	<p data-bbox="1262 1675 1442 1765"><i>Streptomyces sporoclivatus</i></p>

TABLA 23. (Continuación)





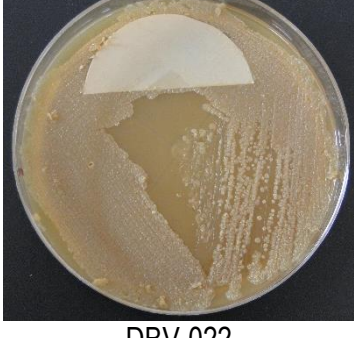


CEPAS		IDENTIFICACIÓN MOLECULAR
		<i>Streptomyces griseiniger</i>
DBV-002	DBV-004	
		
DBV-006	DBV-021	
		
DBV-022	DBV-023	
		
DBV-028		

TABLA 23. (Continuación)


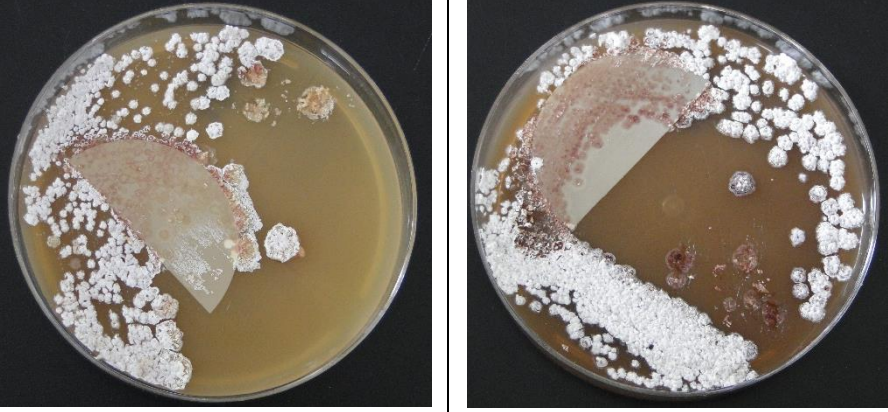
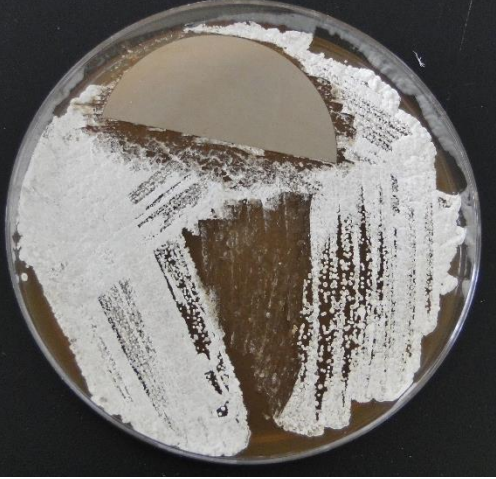





CEPAS	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR
 <p data-bbox="671 860 783 891">DBV-016</p>	<p data-bbox="1267 584 1430 674"><i>Streptomyces malaysiensis</i></p>
 <p data-bbox="440 1308 552 1339">DBV-010</p> <p data-bbox="903 1308 1015 1339">DBV-026</p>	<p data-bbox="1267 1066 1430 1155"><i>Streptomyces decoyicus</i></p>
 <p data-bbox="671 1839 783 1870">DBV-015</p>	<p data-bbox="1222 1565 1469 1655"><i>Streptomyces rhizosphaerihabitans</i></p>

TABLA 23. (Continuación)

CEPAS	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	
 <p data-bbox="676 860 788 898">DBV-009</p>	<p data-bbox="1259 595 1452 685"><i>Streptomyces spiroverticillatus</i></p>	
 <p data-bbox="443 1335 555 1373">DBV-001</p>	 <p data-bbox="914 1335 1026 1373">DBV-011</p>	<p data-bbox="1273 1350 1437 1440"><i>Streptomyces fildesensis</i></p>
 <p data-bbox="443 1827 555 1865">DBV-014</p>	 <p data-bbox="914 1827 1026 1865">DBV-017</p>	

Interpretación de resultados

La caracterización fenotípica permitió observar las relaciones generales entre los actinomicetes en base a sus características morfológicas y fisiológicas mediante el dendrograma generado a partir de la taxonomía numérica de datos fenotípicos. La diversidad intra-grupo encontrada en aquellos formados por pocos miembros es baja (grupos 1, 3, 5 y 9), mientras que lo contrario se encontró en el grupo más numeroso (grupo 2). Es evidente que mientras más integrantes existan en un grupo fenético, la probabilidad de encontrar mayor diversidad se incrementa, tal como se puede confirmar con los resultados obtenidos en el presente estudio (Williams et al., 1983). Además, factores como la cantidad y composición del medio de cultivo pueden llegar a influir en la pigmentación de esporas y micelio del sustrato (Goodfellow et al., 2012), por lo que ligeras variaciones en la pigmentación son más visibles en grupos numerosos (Stackebrandt et al., 2014). La gran mayoría de actinomicetes fueron identificados como mesófilos, neutrotolerantes y halófilos, características que concuerdan con la descripción general de actinomicetes que son aislados de suelos templados (Antony-Babu & Goodfellow, 2008; Ballav, Kerkar, Thomas, & Augustine, 2015; Tresner, Hayes, & Backus, 1968), además de confirmar su capacidad degradadora de compuestos complejos mediante la generación de enzimas extracelulares y de metabolizar aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno.

En la caracterización genotípica en base a rep-PCR mediante el primer BOX se pudo determinar la alta sensibilidad del coeficiente utilizado, ya que Pearson considera tanto la intensidad de las bandas como la posición. Esto provocó la separación de miembros con características fenotípicas similares, en diferentes grupos, debido a que, a pesar de tener el mismo patrón de bandas, la intensidad fue diferente. El ejemplo más claro puede observarse con el actinomicete DBV-017 cuyo fingerprinting es muy similar al del grupo genotípico 6, sin embargo, por la diferencia en la intensidad de sus bandas se lo coloca fuera del mismo. Además, otra situación que se evidencia es que la cantidad de bandas generadas por el protocolo en muchos casos no fueron las suficientes para poder formar grupos congruentes o similares. Es el caso de la cepa DBV-002 que al presentar pocas bandas quedó fuera de comparación con algún grupo homogéneo, cuando se sugiere que para un fingerprinting eficiente se trabaje con al menos 20 bandas (Lanoot et al., 2004), situaciones que provocaron problemas en la construcción del dendrograma y la coherencia de los grupos genotípicos.

En la identificación molecular se pudo establecer que la colección está cercanamente relacionada a nueve distintas especies. Si se considera que se trabajó con 30 cepas, el

porcentaje de especies diferentes encontradas corresponde a prácticamente el 30% del total, demostrando que existe una gran diversidad de actinomicetes con potencial biotecnológico, demostrado por un ensayo preliminar donde se observó la producción de compuestos fungicidas y por la presencia de *Streptomyces griseiniger*, miembro junto con otras 16 especies, del clado de *Streptomyces violaceusniger*. Este grupo es conocido por su amplia capacidad de generar compuestos bioactivos (Sahin, Sazak, Güven, & Dogramaci, 2010).

En éste estudio, seis de las nueve especies identificadas están dentro de éste clado. Considerando que muchas de las especies válidamente descritas en el grupo de *S. violaceusniger* difieren entre 3 y 41 nt. (al comparar las secuencias casi completas del gen del ADNr 16S), y que han sido identificadas y separadas únicamente en base a hibridización ADN:ADN (Goodfellow, Kumar, Labeda, & Sembiring, 2007), podría significar que varios de los actinomicetes identificados en ésta investigación, podrían corresponder a especies nuevas dentro de éste clado. Probablemente sería necesario determinar la intra-relación entre las especies válidamente descritas y las identificadas ya sea mediante Multilocus Sequence Typing (MST), secuenciamiento del genoma, o hibridización ADN:ADN.

Discusión general del trabajo

La importancia de este trabajo radica en la complementariedad que se encuentra al combinar la caracterización fenotípica, genotípica y la identificación molecular, donde el secuenciamiento del gen codificante del ADNr 16S debería ser el punto de partida para direccionar la búsqueda de la utilidad biotecnológica de los microorganismos, ya que este nos permite identificar y entender el grupo con el que se está trabajando, de ésta manera se puede orientar las experimentaciones de forma específica en base a las especies reconocidas, prosiguiendo con caracterizaciones como fingerprintings utilizando sets de primers con protocolos estandarizados que permitan obtener un número de bandas considerable para obtener relaciones precisas entre los microorganismos y finalmente con pruebas fenotípicas que permiten observar las características intra-especie e identificar las condiciones de cultivo y crecimiento para la producción de compuestos bioactivos útiles para biotecnología.

La caracterización fenotípica demostró ser más congruente que la genotípica al momento de compararla con el análisis filogenético, esto se puede corroborar con *Streptomyces griseiniger* cuya diversidad se manifestó claramente en cuatro grupos homogéneos (2, 3, 8 y 10), la presencia de todos los miembros de *Streptomyces fildesensis* en un solo grupo fenético y la

diversidad intra-especie al observar la separación de los actinomicetes DBV-026 y el DBV-010 como individuos únicos a pesar de pertenecer a la misma especie de acuerdo al análisis filogenético. Además, en esta parte se evidenció que la baja concentración de esporas en la solución stock del DBV-021 y DBV-022, probablemente influyó en la separación de los mismos como individuos únicos, mientras que los análisis posteriores de fingerprinting e identificación molecular los confirmaron como parte de grupos homogéneos. La caracterización genotípica demostró tener dos grupos congruentes (3 y 4) cuando se comparó con el análisis filogenético, agrupando a la mayoría de actinomicetes pertenecientes al clado de *S. violasceusniger* en los mismos, y determinando que la falta de coherencia en los demás grupos se debe a los errores antes mencionados.

La gran diversidad determinada en base al análisis filogenético pudo verse reflejada en los resultados arrojados por la caracterización fenotípica con características similares pero no 100% iguales y por la genotípica, con la obtención de fingerprintings similares o parecidos pero no iguales. Los errores antes mencionados en ambas caracterizaciones provocaron que entre las mismas no haya congruencia, sin embargo, los resultados se vuelven coherentes al compararlos con el análisis filogenético.

Este trabajo ha permitido obtener una colección de actinomicetes altamente caracterizados en varios niveles, lo que ha posibilitado conocer su diversidad. Se debe tomar en cuenta que las herramientas de caracterización utilizadas son valiosos procesos complementarios al aislamiento selectivo de microorganismos, y no es recomendado desvincularlos ya que en sí mismas la parte fenotípica y genotípica no son concluyentes, y a pesar de que el gen del 16S sí lo es (identificando la ubicación taxonómica del microorganismo), necesita de este tipo de caracterizaciones para poder completar el perfil del mismo, dando en consecución la determinación de su utilidad en el campo biotecnológico, paso que debería seguirse a este trabajo.

3.2 Verificación de hipótesis

Hipótesis

Hipótesis Nula (H_0)

No existe diversidad biológica entre los actinomicetes de la colección caracterizada, en base al análisis de sus características fenotípicas y genotípicas.

Hipótesis Alternativa (H_1)

Existen al menos dos especies diferentes de actinomicetes en la colección caracterizada, en base al análisis de sus características fenotípicas y genotípicas.

En base a los resultados de diversidad intra-especie encontrada en las características fenotípicas y fingerprintings y la corroboración de ésta diversidad mediante análisis filogenético de las especies estudiadas, se acepta la hipótesis alternativa, afirmando que existen al menos dos especies diferentes en la colección caracterizada.

CAPITULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Por medio de caracterización fenotípica se determinó diez grupos fenéticos al 88.6% de corte de similaridad, los cuales fueron completamente congruentes y homogéneos, demostrando diversidad genética intra-especie. Únicamente los grupos ocho y diez vieron influenciada su separación como miembros únicos a causa de la concentración de esporas en la solución stock.
- Mediante caracterización genotípica se determinó seis grupos al 80% de similaridad, de los cuales dos demostraron ser congruentes, mientras que los demás divergieron a causa de la cantidad de bandas y/o a la sensibilidad del coeficiente de correlación de Pearson.
- Se identificó nueve especies relacionadas cercanamente con la colección de actinomicetes escogidos para secuenciamiento, por medio del análisis filogenético de la secuencia consenso del gen codificante para ARNr 16S, éstas son *Streptomyces griseiniger*, *Streptomyces cangkringensis*, *Streptomyces rhizosphaericus*, *Streptomyces sporoclivatus*, *Streptomyces malaysiensis*, *Streptomyces decoyicus*, *Streptomyces fildesensis*, *Streptomyces rhizosphaerihabitans*, *Streptomyces spiroverticillatus*, demostrando un porcentaje alto de diversidad del 30% en la colección.
- En su mayoría la colección de actinomicetes es neutrófila, halófila y mesófila, demostrando también capacidad biodegradadora de fuentes de carbono complejas y asimilación de aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno
- La caracterización fenotípica demostró ser más congruente que la genotípica en base a la coherencia y homogeneidad de sus grupos al compararla con el análisis filogenético del 16S.

- Se corroboró la diversidad de la colección presentada por el análisis filogenético del 16S mediante la variedad de características fenotípicas y la generación de fingerprintings similares no iguales, demostrando variabilidad genética intra-especie.

4.2 Recomendaciones

- Para la identificación y caracterización de microorganismos tomar como punto de partida el análisis filogenético del gen codificante para el ARNr 16S y de éste continuar con las caracterizaciones por fingerprintings y pruebas fenotípicas para tener un entendimiento más orientado del microorganismo en base a su identificación molecular.
- Utilizar más de un primer para la generación de fingerprintings y estandarizar condiciones para la obtención de bandas necesarias para la obtención de grupos congruentes y relaciones más precisas.
- Establecer no solo el rango de crecimiento de microorganismos, sino sus condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo, para optimizar recursos al identificar su potencial biotecnológico.
- Desarrollar una caracterización fenotípica con alto número de pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas para obtener alta discriminación entre las especies estudiadas.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Abdus, S., Wahab, A., Yasmeen, T., Abbas, T., Khan, I., & Idress, S. (2015). Screening of Actinomycetes From Indigenous Soil for Production of. *International Journal of Current Research*, 7(JANUARY), 12078–12083. <https://doi.org/DOI: 10.13140/2.1.4015.5840>
- Acharyabhata, A., Kandula, S. K., Terli, R., Acharyabhata, A., Kandula, S. K., & Terli, R. (2013). Taxonomy and Polyphasic Characterization of Alkaline Amylase Producing Marine Actinomycete *Streptomyces rochei* BTSS 1001. *International Journal of Microbiology*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/276921>
- Adegboye, M. F., & Babalola, O. O. (2012). Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *African Journal of Agricultural Reseach*, 7(15), 2255–2261. <https://doi.org/10.5897/AJARX11.071>
- Adzitey, F., Huda, N., & Ali, G. R. R. (2013). Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. 3 *Biotech*, 3(2), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0074-4>
- Antony-Babu, S., & Goodfellow, M. (2008). Biosystematics of alkaliphilic streptomycetes isolated from seven locations across a beach and dune sand system. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(4), 581–591. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9277-4>
- Asef, M., & Gupta, S. G. (2014). SCREENING OF ACTINOMYCETES FOR POTENTIAL ANTIMICROBIAL ACTIVITY. *Journal of Advances in Applied Sciences and Technology*, 1(1), 41–47. <https://doi.org/10.13140/2.1.4015.5840>
- Austin, B., & Colwell, R. (1977). Evaluation of Some Coefficients for Use in Numerical Taxonomy of Microorganisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 27(3), 204–210. <https://doi.org/10.1099/00207713-27-3-204>
- Ballav, S., Kerkar, S., Thomas, S., & Augustine, N. (2015). Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(3), 323–330. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2014.08.017>
- Bezerra, R., Silva, D., & Valicente, F. H. (2013). Molecular characterization of *Bacillus*

thuringiensis using rep-PCR. *Springer Open Journal*, 2, 641. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867629/pdf/40064_2013_Article_733.pdf

Cepni, E., & Gürel, F. (2012). Variation in extragenic repetitive DNA sequences in *Pseudomonas syringae* and potential use of modified REP primers in the identification of closely related isolates. *Genetics and Molecular Biology*, 35(3), 650–656. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012005000040>

Chun, J. (1995). *Computer Assisted Classification and Identification of Actinomycetes [thesis]*. University of Newcastle, Newcastle upon Tyne (UK).

Chun, J. (1999). Phylogenetic Editor (PHYDIT).

Das, S., Dash, H., Mangwani Neelam, Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 80–100. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.013>

Dastager, S. G., Pandey, A., Lee, J. C., Li, W. J., & Kim, C. J. (2009). Polyphasic taxonomy of novel actinobacteria showing macromolecule degradation potentials in bigeum Island, Korea. *Current Microbiology*, 59(1), 21–29. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9397-8>

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.

Garzón, D. (2013). “*Determinación De La Biodiversidad Bacteriana En Ecosistemas Glaciares De La Antártida*”. Universidad Técnica de Ambato. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3179>

Goodfellow, M., Kampfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K., Ludwig, W., & Whitman, W. (Eds.). (2012). *BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. THE ACTINOBACTERIA, PART A AND B. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology Volume 5 (Segunda)*. Georgia, USA: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>

Goodfellow, M., Kumar, Y., Labeda, D. P., & Sembiring, L. (2007). The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for streptomycetes with rugose ornamented spores. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92(2), 173–199. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9146-6>

- Jukes, T., & Cantor, C. (1969). Evolution of protein molecules. *HN Munro, Mammalian Protein Metabolism*, 3, 21–132.
- Labeda, D. P. (1987). Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Developments in Industrial Microbiology*, 28(28), 115–121. Retrieved from <https://naldc.nal.usda.gov/download/24576/PDF>
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, J., Huang, Y., ... Swings, J. (2004). BOX-PCR Fingerprinting as a Powerful Tool to Reveal Synonymous Names in the Genus *Streptomyces*. Emended Descriptions are Proposed for the Species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. pha*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 84–92. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00257>
- Mangamuri, U. K., Muvva, V., Poda, S., & Kamma, S. (2012). Isolation, Identification and Molecular Characterization of Rare Actinomycetes from Mangrove Ecosystem of Nizampatnam. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(2), 83–91. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AV2012092035>
- Nawani, N., Aigle, B., Mandal, A., Bodas, M., Ghorbel, S., & Prakash, D. (2013). Actinomycetes: Role in biotechnology and medicine. *BioMed Research International*, 2013(March 2014). <https://doi.org/10.1155/2013/687190>
- Nikou, M. M., Ramezani, M., & Seyedmahdi, S. S. (2015). Polyphasic identification of *Lechevaliera fradia* subsp. *Iranica*, A rare actinomycete isolated from Loshan region of Iran. *Biological Journal of Microorganism 3 Rd Year*, 3(12). Retrieved from http://bjm.ui.ac.ir/article_19544_2560c13f2ed3ca685beb772d78b80816.pdf
- Olive, D. M., & Bean, P. (1999). MINIREVIEW Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 37(6), 1661–1669. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC84917/pdf/jm001661.pdf>
- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmales, M., & Kapadani, B. (2013). Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential Revenue Resource. *BioMed Research International*, 2013(264020), 8. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2013/264020>

- Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., ... De Bruijn, F. J. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA–DNA homology studies : *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 665–677. Retrieved from <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/50/2/0500665a.pdf?expires=1509836489&id=id&accname=guest&checksum=F3EE31D9DBE4E37DB9C3A115F86DDDE0>
- Ramasamy, D., Mishra, A. K., Lagier, J. C., Padhmanabhan, R., Rossi, M., Sentausa, E., ... Fournier, P. E. (2014). A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 2), 384–391. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.057091-0>
- Sahin, N., Sazak, A., Güven, K., & Dogramaci, M. (2010). Diversity of members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade in the legumes rhizosphere in Turkey. *Annals of Microbiology*, 60(4), 669–684. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0112-6>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4, 406–425.
- Sen, A., Daubin, V., Abrouk, D., Gifford, I., Berry, A. M., & Normand, P. (2014). Phylogeny of the class Actinobacteria revisited in the light of complete genomes. The orders ‘Frankiales’ and Micrococcales should be split into coherent entities: proposal of Frankiales ord. nov., Geodermatophilales ord. nov., Acidothermales ord. nov. and Nakamurellales ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3821–3832. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.063966-0>
- Sharma, M. (2014). Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 801–832. Retrieved from [http://www.ijcmas.com/vol-3-2/Mukesh Sharma.pdf](http://www.ijcmas.com/vol-3-2/Mukesh%20Sharma.pdf)
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313–340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Smaoui, S., Mathieu, F., Fourati, L., Fguira, B., Merlina, G., & Mellouli, L. (2011). TAXONOMY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF A NEW STREPTOMYCES SP. TN17 ISOLATED

- IN THE SOIL FROM AN OASIS IN TUNIS. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 63(4), 1047–1056.
<https://doi.org/10.2298/ABS1104047S>
- Sneath, P. (1957). The Application of Computers to Taxonomy. *Microbiology*, 17(1), 201–226.
<https://doi.org/10.1099/00221287-17-1-201>
- Sneath, P. (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
- Sneath, P., & Sokal, R. (1963). *Principles of Numerical Taxonomy*. (D. Whitaker, R. Emerson, D. Kennedy, & G. Beadle, Eds.). San Francisco. Retrieved from W.H Freeman and Company
- Sneath, P., & Sokal, R. (1973). *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. (D. Kennedy & R. Park, Eds.). San Francisco. Retrieved from <http://www.brclasssoc.org.uk/books/>
- Sreevidya, M., Gopalakrishnan, S., Kudapa, H., & Varshney, R. K. (2016). Environmental Microbiology Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.030>
- Stackebrandt, E., DeLong, E., Lory, S., & Thompson, F. (2014). *The Prokaryotes* (Cuarta). Berlin: Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9>
- Tresner, H. D., Hayes, J. A., & Backus, E. J. (1968). Differential tolerance of streptomycetes to sodium chloride as a taxonomic aid. *Applied Microbiology*, 16(8), 1134–1136. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5675504>
- Varalakshmi, T., Sekhar, K. M., & Charyulu, P. B. B. (2014). Taxonomic studies and phylogenetic characterization of potential and pigmented antibiotic producing actinomycetes isolated from rhizosphere soils. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6), 511–519. Retrieved from <http://www.ijppsjournal.com/Vol6Issue6/9762.pdf>
- Versalovic, J., de Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1998). Repetitive Sequence-based PCR (rep-PCR) DNA Fingerprinting of Bacterial Genomes. In *Bacterial Genomes* (pp. 437–454). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6369-3_34

- Vinueza, G., & Rodríguez, C. (2010). *Determinación de la relación entre la caracterización fenotípica y genotípica de actinomicetes como mecanismo de dereplicación de microorganismos útiles en biotecnología*. Universidad Técnica de Ambato. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/412/browse?type=author&order=ASC&rp=20&value=Vinueza+Villarés%2C+Adriana+Gabriela>
- Waksman, S., & Henrici, A. (1943). THE NOMENCLATURE AND CLASSIFICATION OF THE. *Journal of Bacteriology*, 46(4), 337–341. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/46/4/337.full.pdf+html>
- Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A., & Sackin, M. J. (1983). Numerical Classification of Streptomyces and Related Genera. *Microbiology*, 129(6), 1743–1813. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-6-1743>
- Zerizer, H., Scolat, B. La, Raoult, D., Dalichaouche, M., & Boulahrouf, A. (2013). African Journal of Microbiology Research Isolation and polyphasic characterization of aerobic actinomycetes genera and species rarely encountered in clinical specimens, 7(28), 3681–3689. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5407>

ANEXOS

ANEXO A

RESULTADOS

Tabla 24. Origen de cepas de actinomicetes

ID DEL ACTINOMICETE	ORIGEN	MEDIO DE CULTIVO	pH	TEMPERATURA (°C)
DBV-001	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-002	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-003	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-004	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-005	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-006	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-007	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-008	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-009	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-010	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-011	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-012	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-013	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-014	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-015	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-016	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-017	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-018	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-019	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-020	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-021	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-022	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-023	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-024	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-025	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-026	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-027	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-028	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-029	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28
DBV-030	Suelo de jardín - Ambato	GYM	6.8	28

Tabla 25. Matriz de datos fenotípicos

CÓDIGO	CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA																					
	GYM											AGAR AVENA										
	Presencia Micelio Aéreo	Presencia Pigmento	MICELIO AÉREO		MICELIO DE SUSTRATO			PIGMENTO DIFUSIBLE				Presencia Micelio Aéreo	Presencia Pigmento	MICELIO AÉREO		MICELIO DE SUSTRATO				PIGMENTO DIFUSIBLE		
		384 Light straw	White	320 (410) Light brown	358 Light buf	536 Amarillo cadmio	358 Light buff	585 Capuccino	570 Verde Pistache	568 (368) Apricot			367 Manilla	White	310 Primrose	568 (368) Apricot	538 Amarillo Piel	539 Sienna Natural	518 Salmon	529 Marfil	568 (368) Apricot	358 Light buff
DBV 001	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
DBV 002	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
DBV 003	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
DBV 004	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
DBV 005	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
DBV 006	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
DBV 007	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
DBV 008	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
DBV 009	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
DBV 010	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
DBV 011	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
DBV 012	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
DBV 013	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
DBV 014	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
DBV 015	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
DBV 016	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
DBV 017	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
DBV 018	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
DBV 019	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
DBV 020	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
DBV 021	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
DBV 022	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
DBV 023	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
DBV 024	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
DBV 025	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
DBV 026	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
DBV 027	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
DBV 028	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
DBV 029	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
DBV 030	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0

TABLA 25. Matriz de datos fenotípicos (continuación)

CÓDIGO	CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA		PRUEBAS FISIOLÓGICAS																																	
	RA	CADENA EN ESPIRAL	SALINIDAD				pH								ENZIMAS EXTRACELULARES						AMINOÁCIDOS						TEMPERATURA									
			1%	2%	5%	10%	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,6	9,6	CELULOSA	QUITINA	ALMIDÓN	CASCARILLA	LISINA	ÁCIDO GLUTÁMICO	CISTEÍNA	LEUCINA	ALANINA	ASPARAGINA	HISTIDINA	VALINA	FENILALANINA	TREONINA	TIROSINA	ARGININA	ÁCIDO ASPÁRTICO	4 °C	26°C	37 °C	50 °C		
DBV-001	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-002	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
DBV-003	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-004	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-005	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-006	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	
DBV-007	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-008	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-009	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-010	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-011	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-012	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-013	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-014	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-015	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-016	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-017	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-018	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-019	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-020	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-021	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-022	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-023	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-024	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-025	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-026	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
DBV-027	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-028	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-029	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
DBV-030	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0

Tabla 26. Matriz de similitud y diferencia de nucleótidos para la identificación de la cercanía entre actinomicetes secuenciados y especies conocidas del género *Streptomyces*

ESPECIES	<i>Streptomyces antimycoticus</i>	<i>Streptomyces sporoclivatus</i>	<i>Streptomyces cangkringensis</i>	<i>Streptomyces griseiniger</i>	<i>Streptomyces rhizosphaericus</i>	<i>Kitatospora arborophila</i>	<i>Streptacidiphilus albus</i>	<i>Streptomyces sannanensis</i>	<i>Streptomyces xanthochromogenus</i>	<i>Streptomyces fildesensis</i>	<i>Streptomyces rhizosphaerihabita</i>	<i>Streptomyces glebosus</i>	<i>Streptomyces decoycicus</i>	<i>Streptomyces siamensis</i>	<i>Streptomyces malaysiensis</i>	<i>Streptomyces spiroverticillatus</i>	DBV-002	DBV-004
<i>Streptomyces antimycoticus</i>	---	0/1475	16/1455	16/1469	18/1456	58/1433	68/1466	48/1430	55/1460	67/1443	52/1448	32/1475	29/1472	57/1472	20/1440	51/1472	14/1456	14/1450
<i>Streptomyces sporoclivatus</i>	100.00	---	16/1461	16/1475	18/1462	58/1437	68/1473	48/1433	55/1464	67/1446	52/1452	32/1479	29/1475	57/1479	20/1444	51/1475	14/1460	14/1454
<i>Streptomyces cangkringensis</i>	98.90	98.90	---	7/1482	8/1479	62/1437	69/1469	49/1431	55/1443	64/1425	49/1431	37/1458	35/1457	51/1474	23/1423	48/1455	6/1439	6/1433
<i>Streptomyces griseiniger</i>	98.91	98.92	99.53	---	8/1480	60/1437	68/1483	53/1433	59/1457	66/1439	52/1445	38/1472	36/1469	54/1488	22/1437	51/1469	6/1453	4/1447
<i>Streptomyces rhizosphaericus</i>	98.76	98.77	99.46	99.46	---	64/1437	71/1470	55/1432	61/1444	70/1426	54/1432	40/1459	38/1458	56/1475	25/1424	53/1456	8/1440	8/1434
<i>Kitatospora arborophila</i>	95.95	95.96	95.69	95.82	95.55	---	37/1438	40/1413	45/1424	58/1407	58/1413	55/1437	53/1436	62/1438	53/1408	49/1437	62/1417	60/1411
<i>Streptacidiphilus albus</i>	95.36	95.38	95.30	95.41	95.17	97.43	---	50/1427	58/1465	68/1440	70/1454	65/1471	62/1467	80/1489	61/1442	58/1469	69/1470	66/1451
<i>Streptomyces sannanensis</i>	96.64	96.65	96.58	96.30	96.16	97.17	96.50	---	17/1434	48/1428	34/1434	38/1435	39/1434	44/1435	52/1422	23/1434	49/1433	49/1432
<i>Streptomyces xanthochromogenus</i>	96.23	96.24	96.19	95.95	95.78	96.84	96.04	98.81	---	48/1446	28/1460	39/1466	41/1462	37/1465	58/1441	22/1463	56/1464	56/1457
<i>Streptomyces fildesensis</i>	95.36	95.37	95.51	95.41	95.09	95.88	95.28	96.64	96.68	---	49/1446	55/1447	55/1443	59/1447	75/1438	46/1446	65/1446	63/1446
<i>Streptomyces rhizosphaerihabita</i>	96.41	96.42	96.58	96.40	96.23	95.90	95.19	97.63	98.08	96.61	---	44/1454	47/1450	16/1454	59/1440	22/1452	49/1460	49/1456
<i>Streptomyces glebosus</i>	97.83	97.84	97.46	97.42	97.26	96.17	95.58	97.35	97.34	96.20	96.97	---	7/1477	49/1478	43/1444	43/1476	36/1460	36/1454
<i>Streptomyces decoycicus</i>	98.03	98.03	97.60	97.55	97.39	96.31	95.77	97.28	97.20	96.19	96.76	99.53	---	52/1474	41/1440	46/1473	35/1456	35/1450
<i>Streptomyces siamensis</i>	96.13	96.15	96.54	96.37	96.20	95.69	94.63	96.93	97.47	95.92	98.90	96.68	96.47	---	68/1441	35/1476	51/1457	51/1451
<i>Streptomyces malaysiensis</i>	98.61	98.61	98.38	98.47	98.24	96.24	95.77	96.34	95.98	94.78	95.90	97.02	97.15	95.28	---	52/1440	20/1444	21/1444
<i>Streptomyces spiroverticillatus</i>	96.54	96.54	96.70	96.53	96.36	96.59	96.05	98.40	98.50	96.82	98.48	97.09	96.88	97.63	96.39	---	48/1456	48/1450
DBV-002	99.04	99.04	99.58	99.59	99.44	95.62	95.31	96.58	96.17	95.50	96.64	97.53	97.60	96.50	98.61	96.70	---	2/1460
DBV-004	99.03	99.04	99.58	99.72	99.44	95.75	95.45	96.58	96.16	95.64	96.63	97.52	97.59	96.49	98.55	96.69	99.86	---
DBV-006	98.98	98.98	99.52	99.52	99.38	95.59	95.30	96.58	96.12	95.50	96.64	97.48	97.55	96.46	98.61	96.66	100.00	99.86
DBV-008	99.10	99.10	99.79	99.79	99.65	95.80	95.37	96.50	96.14	95.50	96.62	97.58	97.65	96.47	98.61	96.68	99.79	99.79
DBV-010	98.13	98.14	97.48	97.44	97.27	96.16	95.72	97.34	97.25	96.27	96.84	99.52	99.86	96.48	97.23	96.89	97.73	97.73
DBV-016	98.54	98.55	98.25	98.33	98.11	96.10	95.65	96.28	95.86	94.65	95.78	96.89	97.02	95.15	99.93	96.26	98.55	98.48
DBV-028	98.82	98.83	99.37	99.38	99.23	95.38	95.09	96.36	95.93	95.29	96.41	97.31	97.37	96.27	98.40	96.47	99.79	99.66
DBV-029	100.00	100.00	98.88	98.89	98.74	95.87	95.29	96.64	96.21	95.37	96.41	97.79	97.99	96.06	98.61	96.47	99.04	99.04
DBV-030	100.00	100.00	98.88	98.89	98.74	95.88	95.30	96.64	96.22	95.37	96.42	97.79	98.00	96.06	98.61	96.48	99.04	99.04
DBV-001	95.65	95.66	95.80	95.71	95.39	96.18	95.59	96.93	96.98	99.72	96.91	96.49	96.48	96.21	95.07	97.11	95.81	95.95
DBV-009	96.75	96.75	96.78	96.60	96.43	97.09	96.48	99.02	99.11	96.75	98.28	97.59	97.37	97.72	96.67	99.24	96.70	96.70
DBV-011	95.64	95.65	95.80	95.70	95.38	96.17	95.59	96.92	96.98	99.72	96.91	96.48	96.47	96.20	95.07	97.10	95.74	95.94
DBV-014	95.63	95.64	95.79	95.69	95.37	96.16	95.57	96.92	96.97	99.72	96.90	96.48	96.47	96.20	95.06	97.10	95.80	95.94
DBV-015	96.34	96.28	96.44	96.27	96.09	95.90	94.98	97.49	97.74	96.48	99.45	96.70	96.49	98.76	95.77	98.55	96.51	96.50
DBV-017	95.63	95.64	95.79	95.69	95.37	96.16	95.57	96.92	96.97	99.72	96.90	96.48	96.47	96.20	95.06	97.10	95.80	95.94
DBV-021	99.04	99.04	99.58	99.59	99.44	95.62	95.34	96.58	96.17	95.50	96.64	97.53	97.59	96.50	98.61	96.70	100.00	99.86
DBV-022	99.04	98.97	99.51	99.66	99.37	95.69	95.40	96.51	96.10	95.64	96.58	97.46	97.52	96.42	98.48	96.63	99.80	99.93
DBV-023	99.11	99.11	99.65	99.66	99.52	95.71	95.42	96.65	96.25	95.57	96.71	97.61	97.67	96.58	98.55	96.78	99.93	99.93
DBV-024	99.10	99.10	99.79	99.79	99.65	95.80	95.37	96.49	96.14	95.50	96.62	97.58	97.64	96.47	98.61	96.67	99.73	99.79
DBV-026	98.13	98.14	97.48	97.43	97.27	96.16	95.71	97.34	97.25	96.27	96.83	99.52	99.86	96.48	97.22	96.89	97.73	97.73

TABLA 26. Matriz de similitud y diferencia de nucleótidos para la identificación de la cercanía entre actinomicetes secuenciados y especies conocidas del género *Streptomyces* (continuación)

ESPECIES	DBV-006	DBV-008	DBV-010	DBV-016	DBV-028	DBV-029	DBV-030	DBV-001	DBV-009	DBV-011	DBV-014	DBV-015	DBV-017	DBV-021	DBV-022	DBV-023	DBV-024	DBV-026
<i>Streptomyces antimycoticus</i>	15/1467	13/1446	27/1447	21/1443	17/1446	0/1446	0/1448	63/1447	47/1445	63/1445	63/1443	53/1449	63/1443	14/1455	14/1453	13/1461	13/1444	27/1445
<i>Streptomyces sporoclivatus</i>	15/1471	13/1449	27/1450	21/1447	17/1449	0/1449	0/1451	63/1451	47/1448	63/1448	63/1446	54/1453	63/1446	14/1459	15/1457	13/1465	13/1447	27/1448
<i>Streptomyces cangkringensis</i>	7/1450	3/1428	36/1429	25/1426	9/1428	16/1428	16/1430	60/1430	46/1427	60/1427	60/1425	51/1432	60/1425	6/1438	7/1436	5/1444	3/1426	36/1427
<i>Streptomyces griseiniger</i>	7/1464	3/1442	37/1443	24/1440	9/1442	16/1442	16/1444	62/1444	49/1441	62/1441	62/1439	54/1446	62/1439	6/1452	5/1450	5/1458	3/1440	37/1441
<i>Streptomyces rhizosphaericus</i>	9/1451	5/1429	39/1430	27/1427	11/1429	18/1429	18/1431	66/1431	51/1428	66/1428	66/1426	56/1433	66/1426	8/1439	9/1437	7/1445	5/1427	39/1428
<i>Kitasatospora arborophila</i>	63/1428	59/1406	54/1408	55/1411	65/1406	58/1406	58/1408	54/1412	41/1409	54/1409	54/1407	58/1414	54/1407	62/1416	61/1414	61/1422	59/1404	54/1406
<i>Streptacidiphilus albus</i>	69/1468	67/1446	62/1448	63/1449	71/1445	68/1445	68/1448	64/1451	51/1448	64/1451	64/1446	73/1454	64/1446	68/1458	67/1456	67/1462	67/1447	62/1446
<i>Streptomyces sannanensis</i>	49/1433	50/1427	38/1430	53/1425	52/1427	48/1427	48/1429	44/1433	14/1431	44/1430	44/1428	36/1435	44/1428	49/1433	50/1433	48/1433	50/1425	38/1428
<i>Streptomyces xanthochromogenes</i>	57/1470	56/1452	40/1455	60/1448	59/1451	55/1451	55/1454	44/1457	13/1455	44/1455	44/1452	33/1461	44/1452	56/1463	57/1461	55/1468	56/1451	40/1453
<i>Streptomyces fildesensis</i>	65/1446	65/1446	54/1447	77/1439	68/1445	67/1446	67/1446	4/1447	47/1447	4/1447	4/1447	51/1447	4/1447	65/1446	63/1446	64/1446	65/1444	54/1446
<i>Streptomyces rhizosphaerihabitans</i>	49/1458	49/1451	46/1454	61/1447	52/1450	52/1450	52/1453	45/1457	25/1455	45/1456	45/1452	8/1461	45/1452	49/1460	50/1460	48/1458	49/1451	46/1452
<i>Streptomyces glebosus</i>	37/1471	35/1449	7/1452	45/1447	39/1449	32/1449	32/1451	51/1452	35/1450	51/1449	51/1447	48/1455	51/1447	36/1459	37/1457	35/1465	35/1447	7/1450
<i>Streptomyces decoyicus</i>	36/1467	34/1445	2/1448	43/1443	38/1445	29/1445	29/1447	51/1448	38/1446	51/1445	51/1443	51/1451	51/1443	35/1455	36/1453	34/1461	34/1443	2/1446
<i>Streptomyces siamensis</i>	52/1468	51/1446	51/1449	70/1444	54/1446	57/1446	57/1448	55/1452	33/1450	55/1449	55/1447	18/1455	55/1447	51/1456	52/1454	50/1462	51/1444	51/1447
<i>Streptomyces malaysiensis</i>	20/1444	20/1441	40/1442	1/1444	23/1441	20/1441	20/1443	71/1441	48/1440	71/1440	71/1438	61/1441	71/1438	20/1444	22/1444	21/1444	20/1439	40/1440
<i>Streptomyces spiroverticillatus</i>	49/1467	48/1445	45/1447	54/1443	51/1445	51/1445	51/1447	42/1451	11/1448	42/1448	42/1446	21/1453	42/1446	48/1455	49/1453	47/1461	48/1443	45/1445
DBV-002	0/1466	3/1455	33/1456	21/1451	3/1454	14/1454	14/1457	61/1457	48/1454	62/1457	61/1452	51/1460	61/1452	0/1467	3/1465	1/1466	4/1456	33/1454
DBV-004	2/1460	3/1455	33/1456	22/1451	5/1454	14/1454	14/1457	59/1457	48/1454	59/1454	59/1452	51/1457	59/1452	2/1460	1/1460	1/1460	3/1453	33/1454
DBV-006	---	3/1455	33/1456	21/1451	3/1454	14/1454	14/1457	61/1457	48/1454	61/1454	61/1452	51/1459	61/1452	0/1465	3/1463	2/1471	3/1453	33/1454
DBV-008	99.79	---	34/1455	22/1446	6/1453	13/1454	13/1455	61/1452	46/1452	61/1452	61/1452	51/1452	61/1452	3/1455	3/1455	2/1455	0/1453	34/1454
DBV-010	97.73	97.66	---	41/1447	36/1454	27/1454	27/1456	50/1454	37/1455	50/1454	50/1453	50/1455	50/1453	33/1456	33/1456	32/1456	34/1453	0/1456
DBV-016	98.55	98.48	97.17	---	24/1446	21/1446	21/1448	73/1448	50/1445	73/1445	73/1443	63/1448	73/1443	21/1451	23/1451	22/1451	22/1444	41/1445
DBV-028	99.79	99.59	97.52	98.34	---	17/1453	17/1454	64/1451	51/1451	64/1451	64/1450	54/1451	64/1450	3/1454	5/1454	4/1454	6/1451	36/1452
DBV-029	99.04	99.11	98.14	98.55	98.83	---	0/1454	63/1451	47/1451	63/1451	63/1451	54/1451	63/1451	14/1454	14/1454	13/1454	13/1452	27/1453
DBV-030	99.04	99.11	98.15	98.55	98.83	100.00	---	63/1454	47/1454	63/1454	63/1452	54/1454	63/1452	14/1457	14/1457	13/1457	13/1453	27/1454
DBV-001	95.81	95.80	96.56	94.96	95.59	95.66	95.67	---	43/1455	0/1455	0/1453	47/1458	0/1453	61/1457	60/1457	60/1457	61/1450	50/1452
DBV-009	96.70	96.83	97.46	96.54	96.49	96.76	96.77	97.04	---	43/1455	43/1453	24/1456	43/1453	48/1454	48/1454	47/1454	46/1450	37/1453
DBV-011	95.80	95.80	96.56	94.95	95.59	95.66	95.67	100.00	97.04	---	0/1453	47/1456	0/1453	61/1456	59/1456	60/1454	61/1453	50/1452
DBV-014	95.80	95.80	96.56	94.94	95.59	95.66	95.66	100.00	97.04	100.00	---	47/1453	0/1453	61/1452	59/1452	60/1454	61/1450	50/1452
DBV-015	96.50	96.49	96.56	95.65	96.28	96.28	96.29	96.78	98.35	96.77	96.77	---	47/1453	51/1460	52/1460	50/1459	51/1451	50/1453
DBV-017	95.80	95.80	96.56	94.94	95.59	95.66	95.66	100.00	97.04	100.00	100.00	96.77	---	61/1452	59/1452	60/1452	61/1450	50/1452
DBV-021	100.00	99.79	97.73	98.55	99.79	99.04	99.04	95.81	96.70	95.81	95.80	96.51	95.80	---	3/1465	1/1465	3/1455	33/1454
DBV-022	99.79	99.79	97.73	98.41	99.66	99.04	99.04	95.88	96.70	95.95	95.94	96.44	95.94	99.80	---	2/1463	3/1455	33/1454
DBV-023	99.86	99.86	97.80	98.48	99.72	99.11	99.11	95.88	96.77	95.87	95.87	96.57	95.87	99.93	99.86	---	2/1453	32/1454
DBV-024	99.79	100.00	97.66	98.48	99.59	99.10	99.11	95.79	96.83	95.80	95.79	96.49	95.79	99.79	99.79	99.86	---	34/1453
DBV-026	97.73	97.66	100.00	97.16	97.52	98.14	98.14	96.56	97.45	96.56	96.56	96.56	96.56	97.73	97.73	97.80	97.66	---

Tabla 27. Secuencia consenso del gen codificante del ARNr 16S, identificación molecular y número de nucleótidos de la secuencia de cada actinomicete representante secuenciado

CÓDIGO	SECUENCIA 5' - 3'	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NÚMERO DE NUCLEÓTIDOS
DBV-001	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC ACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTCCTCCTCGGGGTGGGTAA AGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG AGGGCGACCGGCCAACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGCGAAAGCCTG ATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGA AGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGT GCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGG TCTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCGGGTCTGCATTGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATT CCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAA GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGC CGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGA GCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTGC GTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCA GCATGCCCTTCGGGGTGTAGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCT TATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCGGTACAATGAGCTGCGATAACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTT CGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCGTGCAAGGTGGGACTG GCGATTGGGACGAAGTC</p>	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1458
DBV-002	<p>ATCAGTCGTAACAAGGTANCCGTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGC CGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGCGTT CCCGCATGGGATACGCGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTAGGCCTACCAAGGCGACGACGGG TAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCAACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG CCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGC CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCCTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGA TGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGC AGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGC CGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGCAAGAACCTTACCAAGGCTTAC ATACACCGGAAAACCCCTGGAGACAGGGTCCCGCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTGCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGTAGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGA CGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAA AGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGG CCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGGGACTGGCGATT GGGACGAAGTCGTAACA</p>	<i>Streptomyces griseiniger</i>	1503

CÓDIGO	SECUENCIA 5' - 3'	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NÚMERO DE NUCLEÓTIDOS
DBV-004	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGCCGAACGGGTGAGTA ACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGCGTTCCCGCATGGGATACGCGT GGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCC GCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCC TGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAG CCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAG AAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAG GCGGCTTGTCACGTGCGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCG GAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAG CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTC CGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG GCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCCAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGAAAACCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGT GGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGT TGCCAGCATGCCTTTGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATG CCCCATTATGCTTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCT CAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGG CCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGA CTGGCGATTGGGACGAAGTC</p>	<i>Streptomyces griseiniger</i>	1460
DBV-006	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGCCGAACGGGTGAGTA ACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGCGTTCCCGCATGGGATACGCGT GGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCC GCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCC TGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG CCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG AAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAG GCGGCTTGTCACGTGCGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCG GAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAG CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTC CGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG GCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCCAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGAAAACCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGT GGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGT TGCCAGCATGCCTTTGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATG CCCCATTATGCTTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCT CAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGG CCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGA CTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAGGGTAGCCGTA</p>	<i>Streptomyces griseiniger</i>	1477

CÓDIGO	SECUENCIA 5' - 3'	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NÚMERO DE NUCLEÓTIIDOS
DBV-008	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACGCGTTCCCGCATGGGATACGCGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA TTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAA GCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCG GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTGATAC GGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGA AGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGTTGGGAAGTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCC GCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTA CCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTC ACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCT ACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACT CGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT CACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGAC G</p>	<i>Streptomyces rhizosphaericus</i>	1455
DBV-009	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGA GTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCCTGCCTGCATGGGC GGGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGG GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG CACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGA ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTGATACGG GCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAG GCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC CGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA AGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCA AGGCTTGACATATAACCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTG TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACA GGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACA ATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGA CCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC GTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACG AA</p>	<i>Streptomyces spiroverticillatus</i>	1456

CÓDIGO	SECUENCIA 5' - 3'	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NÚMERO DE NUCLEÓTIIDOS
DBV-010	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGT GAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACACGACCGCATGG TCTGTGTGTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGA CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATA TTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAA GCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCG GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTGATAC GGGCGAGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGA AGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGTTGGGAAGTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCCCGCCCTGGGGAGTACGGCC GCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTC ACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCT ACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACT CGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT CACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGGAGGGAATCGTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGG ACGA</p>	<i>Streptomyces decoyicus</i>	1458
DBV-011	<p>CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGG TGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACAATCTCCTCCTCCTGG GGGTGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGAC GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATAT TGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAA GCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCG GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTGATAC GGGCGAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGA AGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGTTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCCCGCCCTGGGGAGTACGGCC GCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTC ACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGC TACAATGGTCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAAC TCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG TCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCTGCAAGGGAGGGAGTGTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGG ACGAA</p>	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1458

CÓDIGO	SECUENCIA 5' - 3'	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NÚMERO DE NUCLEÓTIIDOS
DBV-014	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGA GTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTCCTCCTGGGG GTGGGTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGG GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG CACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC GCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGA ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTGATACGG GCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAG GCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA CGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA AGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCA AGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGACTCGTG TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACA GGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTAC AATGGTGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCG ACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA CGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTGTGCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGAC G</p>	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1454
DBV-015	<p>GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTG AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTGCCTGCATGGG CGGGGGTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAAGTGGCTCACCAAGGCGACGACG GGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT GCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAG CGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACG GGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAA GGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCC GCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGACTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTC ACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCT ACAATGGCAGGTACAAAAGAGCTGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCTGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACT CGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT CACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGG ACGAAGTCGT</p>	<i>Streptomyces rhizosphaerihabitanus</i>	1462

CÓDIGO	SECUENCIA 5' - 3'	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NÚMERO DE NUCLEÓTIOS
DBV-016	<p>TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGA GTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGCGTTCGCCGATGGGA TACGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCACCAAGGCGACGACG GGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAG CGTGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCCGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACTCCGGGTCTGCATTCGATACG GGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAA GGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCG CAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTAC CAAGGCTTGACATACATCGGAAACATCCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGACTCG TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTCACAGGAGA CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGC CGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCAC GAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAAGTC</p>	<i>Streptomyces malaysiensis</i>	1451
DBV-017	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGA GTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCTCCTCCTCCTGGGG GTGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGG GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGC GCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGA ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGG GCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAG GCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA CGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA AGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCA AGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGACTCGTG TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACA GGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTAC AATGGTCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCG ACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA CGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTGTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGAC G</p>	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1453

CÓDIGO	SECUENCIA 5' - 3'	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NÚMERO DE NUCLEÓTIIDOS
DBV-021	<p>TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGCCGAACGG GTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGCGTTCCCGCAT GGGATACGCGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGAC GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA TATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAAG AAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTC CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGAT ACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGG CCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACC TTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGATGGGGA CTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGT GCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCA ACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCC CGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGG GACGAAGTCGTACA</p>	<i>Streptomyces griseiniger</i>	1467
DBV-022	<p>TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGCCGAACGG GTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGCGTTCCCGCAT GGGATACGCGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGAC GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA TATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAAG AAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTC CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGAT ACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGG CCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACC TTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGATGGGGA CTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGT GCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCA ACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCC CGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGG GACGAAATCGTA</p>	<i>Streptomyces griseiniger</i>	1465

CÓDIGO	SECUENCIA 5' - 3'	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NÚMERO DE NUCLEÓTIIDOS
DBV-023	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGCGAACGGGT GAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGCGTTCGCCGATGG GATACGCGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGA CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA TTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAA GCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCG GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATAC GGGCGAGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGA AGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGTTGGGAAGTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCC GCAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGATGGGGACTC ACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCT ACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACT CGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT CACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGAC GAAGTCGTAACAAGGTA</p>	<i>Streptomyces griseiniger</i>	1471
DBV-024	<p>CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGCGAACG GGTGTAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACGCGTTCGCCGCA TGGGATACGCGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGA CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA ATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAA GAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGT CCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGA TACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG CGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGTTGGGAAGTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACG GCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAAC CTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTC GCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGATGGGG ACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACG TGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGC AACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC CCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTG GGA</p>	<i>Streptomyces cangkringensis</i>	1456

CÓDIGO	SECUENCIA 5' - 3'	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NÚMERO DE NUCLEÓTIDOS
DBV-026	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGT GAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACACGACCGCATGG TCTGTGTGTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGA CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA TTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAA GCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCG GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACAGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTGATAC GGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGA AGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGTTGGGAAGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCGTCGCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCC GCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTGAGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTC ACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCT ACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACT CGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT CACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGG AC</p>	<i>Streptomyces decoyicus</i>	1456
DBV-028	<p>CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTG AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGCGTTCCCGCATGGG ATACGCGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGAC GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAA GCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCG GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACAGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTGATAC GGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGA AGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGTTGGGAAGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCGTCGCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCC GCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCCTGAGAGACAGGTCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTC ACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCT ACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAATGGGGTCTGCAAC TCGACCCCATGAAGTCGGAGTTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG TCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGGAGGAGCCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGG GA</p>	<i>Streptomyces griseiniger</i>	1455

CÓDIGO	SECUENCIA 5' - 3'	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NÚMERO DE NUCLEÓTIDOS
DBV-029	<p>CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGTTTTCGGCCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTG AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGCTCCCGCATGGG ATGCGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCC GCCGCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGAC GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT TGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAA GCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCG GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTGCGCTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACTCCGGGTCTGCATTGATAC GGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGA AGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGTTGGGAAGTGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGCGCCGACGTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCCTGGGGAGTACGGC CGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTT ACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACCTCTGGAGACAGGGGCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCT CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTATGGGGACT CACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTG CTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAA CTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC GTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGGGGAGCCGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGG ACG</p>	<i>Streptomyces sporoclivatus</i>	1454
DBV-030	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGTTTTCGGCCGGGGATTAGTGGCGAACGGGT GAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGCTCCCGCATGG GATGCGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCC GCCGCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGA CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAA GCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCG GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTGCGCTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACTCCGGGTCTGCATTGATAC GGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGA AGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGTTGGGAAGTGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGCGCCGACGTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCCTGGGGAGTACGGC CGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTT ACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACCTCTGGAGACAGGGGCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCT CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTATGGGGACT CACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTG CTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAA CTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC GTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGGGGAGCCGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGG ACGAA</p>	<i>Streptomyces sporoclivatus</i>	1457

ANEXO B

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR GLUCOSA EXTRACTO DE LEVADURA EXTRACTO MALTA (GYM)

Extracto de malta (g)	10
Extracto de levadura (g)	10
Glucosa (g)	4
Carbonato de calcio (g)	2
Agar (g)	15
Volumen agua destilada (ml)	1000

AGAR AVENA

Avena (g)	20
Sales traza (g)	1
Agar (g)	15
Volumen agua de llave (ml)	1000
*pH=6.8	

MEDIO BASAL

Fuente de nitrógeno (g)	1
Fuente de carbono (g)	1
K ₂ HPO ₄ (g)	0,5
Sales traza (ml)	1
Agar (g)	15
Volumen agua destilada (ml)	1000

AGAR NO ESPORULANTE

Almidón soluble (g)	20
Casaminoácidos (g)	20
Extracto de levadura (g)	4
Agar (g)	15
Volumen agua destilada (ml)	1000

SOLUCIONES

SISTEMA DE BUFFERS ÁCIDO CÍTRICO Y FOSFATO DIBÁSICO DE SODIO

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

*Solución con volumen de 100 ml

SISTEMA DE BUFFERS GLICINA E HIDRÓXIDO DE SODIO

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	pH 8.6	pH 9.6
Glicina	0.2 M	50 ml	50 ml
Hidróxido de Sodio	0.2 M	4 ml	22.4 ml

Diluir en 200 ml de agua destilada cada buffer

BUFFERS PARA BIOLOGÍA MOLECULAR

Realizar y esterilizar soluciones stock de EDTA 0.5 M, Glucosa 0.5 M, Tris-HCl 0.25 M

BUFFER DE EXTRACCIÓN

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
EDTA (pH8)	10 mM
Glucosa	50 mM
Tris-HCl (pH8)	25 mM

A partir de los stocks obtener el buffer con las concentraciones presentadas en la tabla anterior al volumen deseado.

BUFFER TE 1X

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
EDTA (pH8)	10 mM
Tris-HCl (pH8)	25 mM

A partir de los stocks obtener el buffer con las concentraciones presentadas en la tabla anterior al volumen deseado.

BUFFER TBE 5X

REACTIVO	CANTIDAD
Tris base	27 g
Ácido Bórico	13.75 g

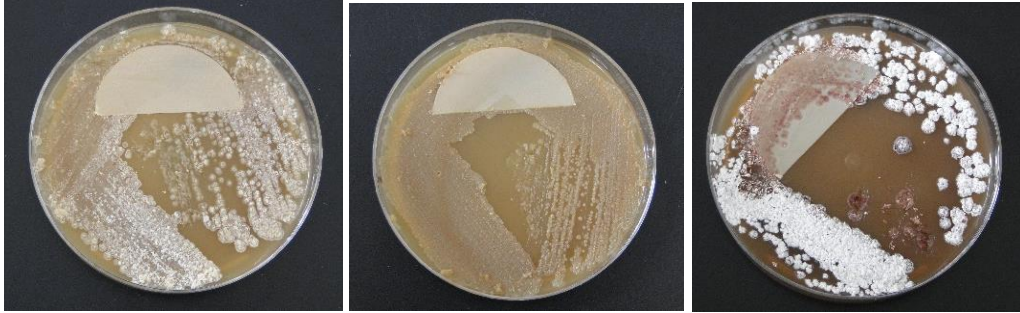
Disolver en un volumen de agua destilada conocido, añadir 10 ml de EDTA 0.5 M pH8, aforar a 500 ml y esterilizar. Realizar una dilución 1/10 para obtener **Buffer TBE 0.5**

ANEXO C

FOTOGRAFÍAS

CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA

CRECIMIENTO DE ACTINOMICETES EN AGAR GYM

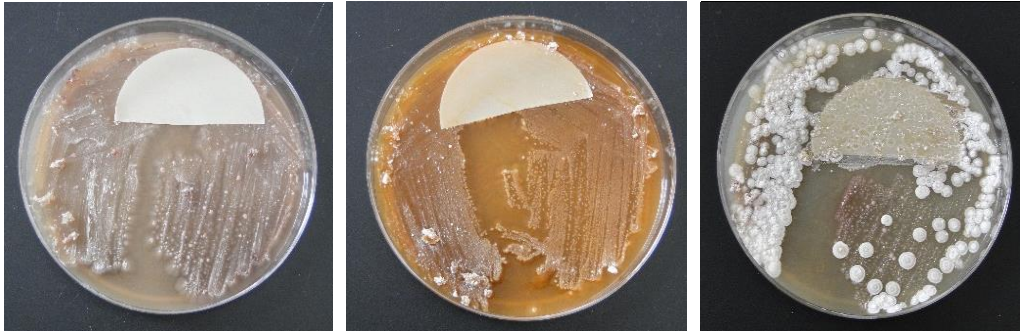


DBV-009

DBV-022

DBV-026

CRECIMIENTO DE ACTINOMICETES EN AGAR AVENA

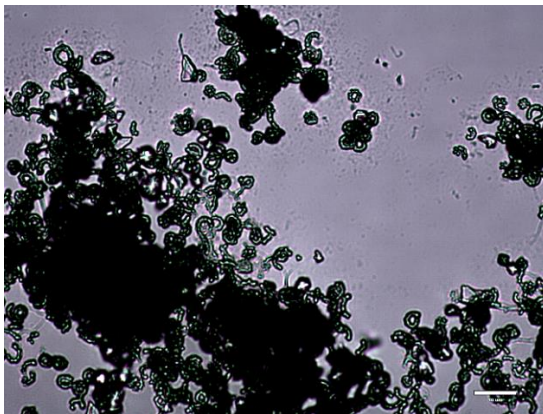


DBV-009

DBV-022

DBV-026

CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA



CADENA EN ESPIRAL COMPACTA (DBV-013)

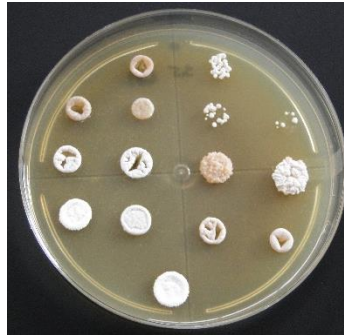


CADENA RA (INCOMPLETA) (DBV-018)

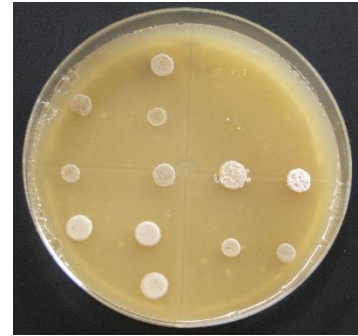
RANGO DE CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DEL pH



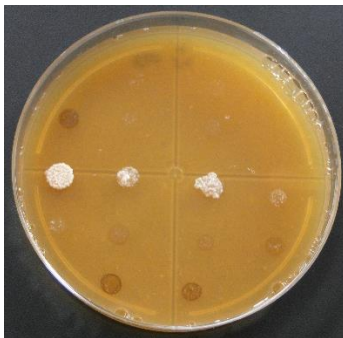
pH 4,5



pH 5,5



pH 6,5



pH 7,5

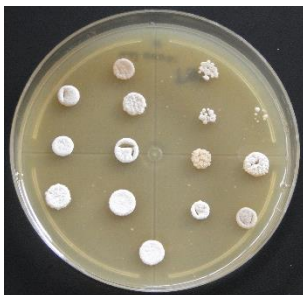


pH 8,6

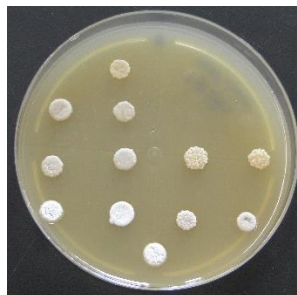


pH 9,6

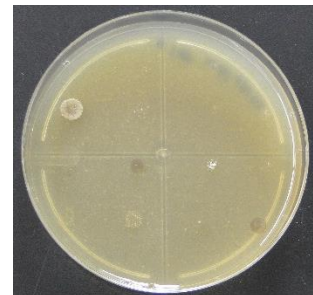
RANGO DE CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DE LA SALINIDAD



1%

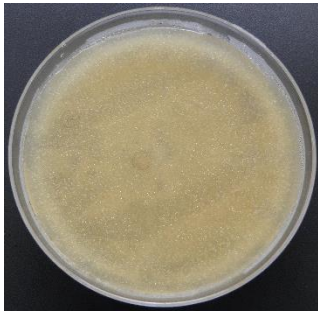


2%

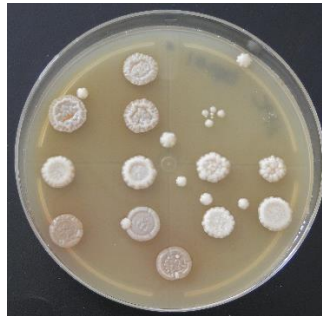


5%

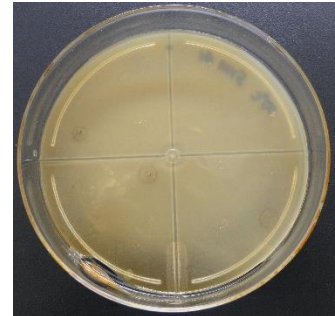
RANGO DE CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA



4°C

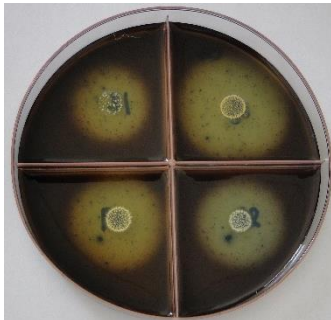


37°C

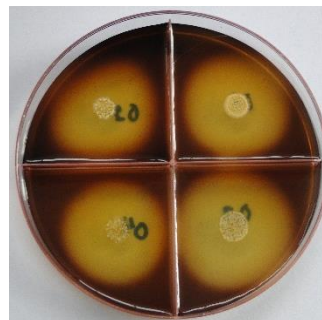


50°C

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR



CASCARILLA

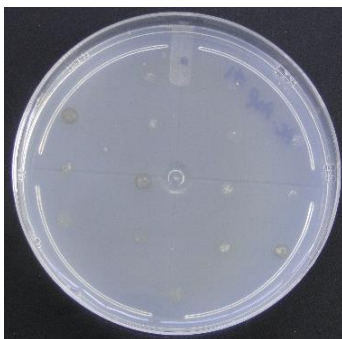


CELULOSA

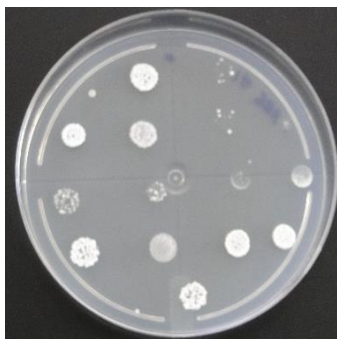


QUITINA

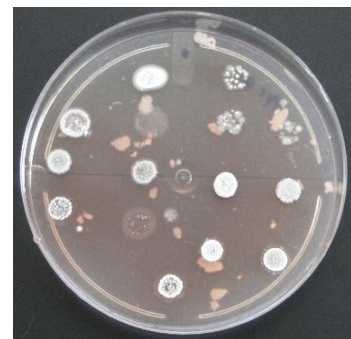
AMINOÁCIDOS COMO FUENTE DE NITRÓGENO Y CARBONO



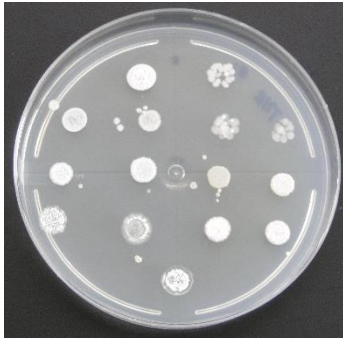
ÁCIDO ASPÁRTICO



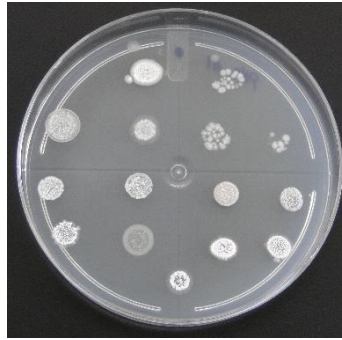
ARGININA



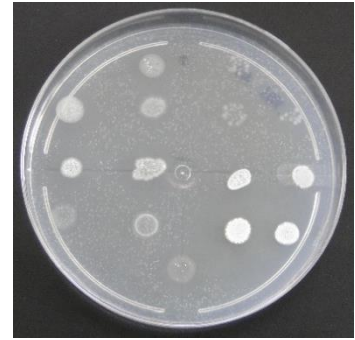
TIROSINA



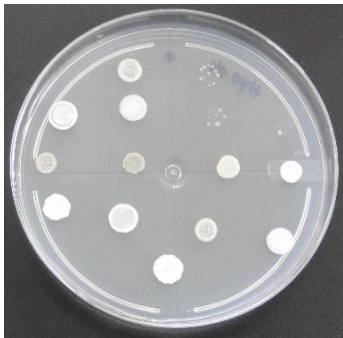
TREONINA



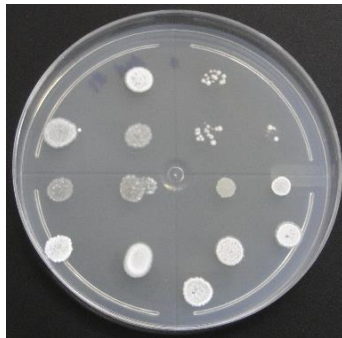
FENILALANINA



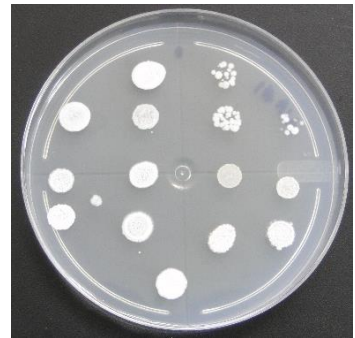
VALINA



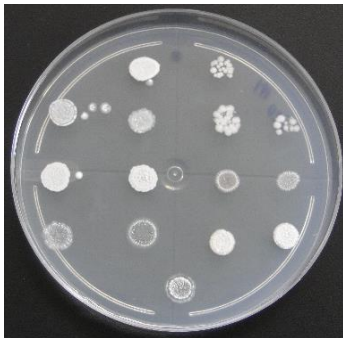
HISTIDINA



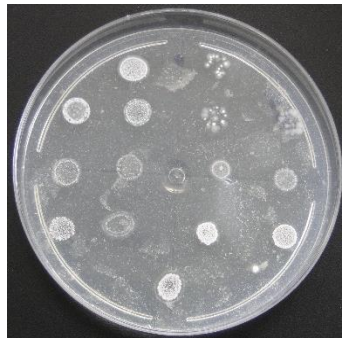
ASPARAGINA



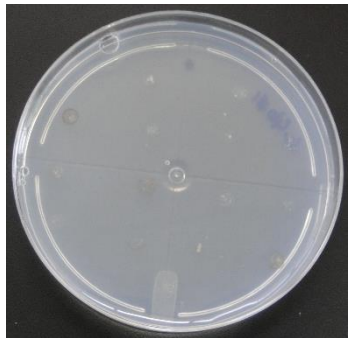
ALANINA



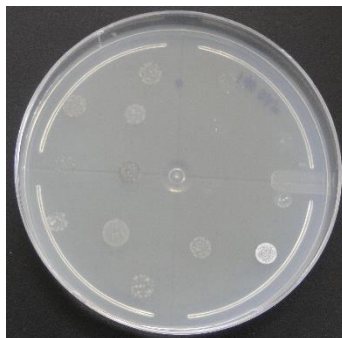
LEUCINA



CISTEINA

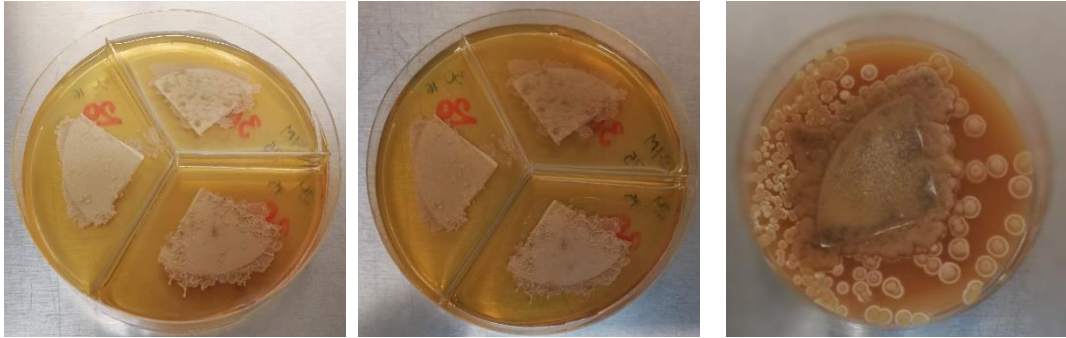


ÁCIDO GLUTÁMICO



LISINA

CRECIMIENTO DE ACTINOMICETES EN AGAR NO ESPORULANTE



ANEXO D

TABLAS DE COLORES

TABLA DE COLORES ACRILEX

Mates - Ref.: 04140, 04125 y 04106

 500 <input type="checkbox"/> Incoloro	 519 <input type="checkbox"/> Blanco	 529 <input type="checkbox"/> Marfil	 538 <input type="checkbox"/> Amarillo Piel
 566 <input type="checkbox"/> Melocotón	 518 <input type="checkbox"/> Salmón	 589 <input type="checkbox"/> Amarillo Canario	 504 <input type="checkbox"/> Amarillo Limón
 505 <input type="checkbox"/> Amarillo Oro	 536 <input type="checkbox"/> Amarillo Cadmio	 517 <input type="checkbox"/> Naranja	 801 <input type="checkbox"/> Mandarina
 586 <input type="checkbox"/> Coral	 507 <input type="checkbox"/> Rojo Fuego	 541 <input type="checkbox"/> Rojo Vivo	 583 <input type="checkbox"/> Rojo Tomate
 508 <input type="checkbox"/> Rojo Escarlata	 805 <input type="checkbox"/> Guayaba Quemada	 550 <input type="checkbox"/> Púrpura	 509 <input type="checkbox"/> Rojo Carmim
 588 <input type="checkbox"/> Rojo Quemado	 565 <input type="checkbox"/> Vino	 537 <input type="checkbox"/> Rosa	 567 <input type="checkbox"/> Rosa Té
 542 <input type="checkbox"/> Rosa Oscuro	 549 <input type="checkbox"/> Magenta	 804 <input type="checkbox"/> Fuchsia	 587 <input type="checkbox"/> Lavanda
 528 <input type="checkbox"/> Lila	 540 <input type="checkbox"/> Violeta Cobalto	 516 <input type="checkbox"/> Violeta	 568 <input type="checkbox"/> Azul Cerúleo

 535 <input type="checkbox"/> Azul Mar	 560 <input type="checkbox"/> Azul Caribe	 503 <input type="checkbox"/> Azul Celeste	 584 <input type="checkbox"/> Azul Invierno
 501 <input type="checkbox"/> Azul Turquesa	 543 <input type="checkbox"/> Azul Ultramar	 502 <input type="checkbox"/> Azul Cobalto	 544 <input type="checkbox"/> Azul Marino
 552 <input type="checkbox"/> Verde Glacial	 803 <input type="checkbox"/> Acqua Marina	 802 <input type="checkbox"/> Verde Manzana	 510 <input type="checkbox"/> Verde Hoja
 572 <input type="checkbox"/> Verde Aguacate	 570 <input type="checkbox"/> Verde Pistache	 513 <input type="checkbox"/> Verde Musgo	 582 <input type="checkbox"/> Verde Gramo
 512 <input type="checkbox"/> Verde Veronese	 545 <input type="checkbox"/> Verde Oliva	 511 <input type="checkbox"/> Verde Bandera	 546 <input type="checkbox"/> Verde Pino
 573 <input type="checkbox"/> Ocre Oro	 539 <input type="checkbox"/> Sienna Natural	 569 <input type="checkbox"/> Caramelo	 506 <input type="checkbox"/> Cerámica
 585 <input type="checkbox"/> Capuccino	 807 <input type="checkbox"/> Jacarandá	 531 <input type="checkbox"/> Marrón	 514 <input type="checkbox"/> Tierra Tostada
 551 <input type="checkbox"/> Sepia	 574 <input type="checkbox"/> Gris Lunar	 520 <input type="checkbox"/> Negro	

Metálicos - Ref.: 04340

 562 <input type="checkbox"/> Blanco	 533 <input type="checkbox"/> Plata	 553 <input type="checkbox"/> Amarillo	 532 <input type="checkbox"/> Oro
 534 <input type="checkbox"/> Cobre	 555 <input type="checkbox"/> Rojo	 559 <input type="checkbox"/> Azul	 557 <input type="checkbox"/> Verde

Fluorescentes - Ref.: 04040

 102 <input type="checkbox"/> Amarillo Limón	 108 <input type="checkbox"/> Amarillo Oro	 103 <input type="checkbox"/> Rojo	 107 <input type="checkbox"/> Rosado
 109 <input type="checkbox"/> Azul	 101 <input type="checkbox"/> Verde		

Glitter - Ref.: 05040 y 05025

 209 <input type="checkbox"/> Cristal	 202 <input type="checkbox"/> Plata	 212 <input type="checkbox"/> Amarillo	 201 <input type="checkbox"/> Oro
 203 <input type="checkbox"/> Cobre	 205 <input type="checkbox"/> Rojo	 214 <input type="checkbox"/> Rose	 207 <input type="checkbox"/> Violeta
 211 <input type="checkbox"/> Azul Turquesa	 204 <input type="checkbox"/> Azul	 213 <input type="checkbox"/> Verde Esmeralda	 206 <input type="checkbox"/> Verde

ACRILEX®

TABLA DE COLORES BRITISH STANDARD SPECIFICATION OF COLORS FOR IDENTIFICATION CODING AND SPECIAL PURPOSES



172 Pale roundel blue



112 Arctic blue



101 Sky blue



103 Peacock blue



104 Azure blue



109 Middle blue



113 Deep Saxe blue



110 Roundel blue



105 Oxford blue



106 Royal blue



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



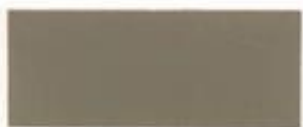
369 Biscuit



352 Pale cream



384 Light straw



389 Camouflage beige



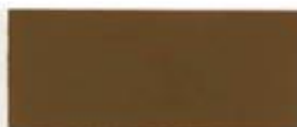
388 Beige



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



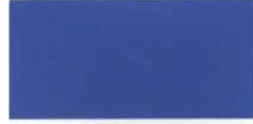
796 Dark violet



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