



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

**“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE
BACTERIAS ÚTILES EN BIOTECNOLOGÍA”**

Trabajo de Investigación (Graduación), Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI) presentado como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autora: Lorena de los Ángeles Núñez Villacís.

Tutor: Dr. Carlos Rodríguez. Ph.D.

Ambato – Ecuador

2013

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del trabajo de investigación realizado bajo el tema: **“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS ÚTILES EN BIOTECNOLOGÍA”**, realizado por la Egresada Lorena de los Ángeles Núñez Villacís; certifico que el trabajo investigativo fue realizado por la persona indicada. Considero que dicho trabajo investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Enero del 2013

Dr. Carlos Rodríguez M.: Ph.D

TUTOR

AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: “CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS ÚTILES EN BIOTECNOLOGÍA”, es absolutamente original, auténtico y personal; en tal virtud, el contenido, para efectos legales y académicos, que se desprenden del mismo, son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Ambato, Enero del 2013

Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

180425690-5

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Los miembros del tribunal de grado aprueban el presente trabajo de graduación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Enero del 2013

Para constancia firman:

Ing. Gladys Navas
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen, por haberme dado la fuerza y la constancia necesaria para no rendirme y cumplir con éxito un objetivo más en mi vida, y porque solo ellos conocen todo el esfuerzo plasmado en este trabajo.

A mis padres Guido y Nelly, porque son el pilar fundamental de mi vida. Gracias por todo su apoyo moral y económico, por sus palabras de aliento y motivación en esta espera. Gracias por la paciencia, por el amor y por todo el sacrificio que realizan cada día por sus hijos. Son los mejores padres del mundo y un ejemplo de vida y superación. Los amo muchísimo.

A mis ñaños, Porque siempre hemos estado juntos apoyándonos y compartiendo buenos y malos momentos. Gracias Mary por tu ejemplo de hermana mayor, por tu confianza, te admiro mucho. A ti Pao por inyectarme siempre ese buen humor y alegría que te caracterizan y a ti Santy por tu confianza y por preocuparte siempre de lo que me pasa. Gracias por demostrarme siempre su amor.

A mis abuelitos, mamá Angélica por su amor y por estar siempre pendiente de mí y a papá Ezequiel que aunque ya no está aquí siempre lo recuerdo. A mamá Laura y papá Alcides por el cariño y apoyo brindado y por abrirnos siempre las puertas de su casa y de su corazón.

A mis tíos y primos por haberme extendido una mano cada vez que lo necesite y por sus palabras de aliento.

LN/ER

AGRADECIMIENTO

Mis más sinceros agradecimientos:

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Bioquímica, por haberme formado en el ámbito profesional y personal. A todos quienes fueron mis profesores en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, gracias por sus conocimientos brindados a lo largo de mis años de carrera.

Al Doctor Carlos Rodríguez, por ser un excelente profesor y una gran persona, por sus conocimientos impartidos a lo largo de la carrera y por haberme guiado en toda la realización de este trabajo. Gracias por la paciencia, por sus consejos y por la confianza depositada en mí.

Al Departamento de Ciencias Biológicas de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, dirigido por el Ing. Raúl Camacho, gracias por haberme brindado su apertura para la realización de mi tesis. De igual forma mi sincero agradecimiento al Ing. Rigoberto Mancheno y a la Sra. Patricia Marroquin por toda su ayuda y amistad brindada en el desarrollo de esta investigación.

A mis queridas amigas Belén y Sil por sus palabras de apoyo y de aliento en los momentos que más lo necesite, gracias por su amistad y por estar conmigo en todo momento, ayudándome en lo que he necesitado. A todos los Marines, gracias por los años de amistad y por los momentos compartidos.

LN/ER

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

A. PÁGINAS PRELIMINARES

Tema	i
Aprobación del tutor	ii
Autoría	iii
Aprobación del Tribunal de Grado	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice general del contenidos	vii
Índice de tablas, gráficos y figuras	xii
Resumen	xx
Summary	xxi

B. TEXTO

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACION

1.1. Tema de Investigación	1
1.2. Planteamiento del Problema	1
1.2.1. Contextualización	1
1.2.1.1. Contextualización Macro	1
1.2.1.2. Contextualización Meso	2
1.2.1.3. Contextualización Micro	3
1.2.2. Análisis Crítico	4
1.2.2.1. Árbol de Problemas	4
1.2.2.2. Relación Causa – Efecto	5
1.2.3. Prognosis	6
1.2.4. Formulación del Problema	6
1.2.5. Preguntas directrices	6
1.2.6. Delimitación	7

1.2.6.1. Delimitación Científica	7
1.3. Justificación	7
1.4. Objetivos	9
1.4.1. General	9
1.4.2. Específicos	9

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos	10
2.1.1. Importancia de los Microorganismos en la Biotecnología	10
2.1.2. Principales Grupos de Microorganismos Útiles en Biotecnología	10
2.1.2.1 Bacterias Biorremediadoras	10
2.1.2.2 Bacterias Productoras de Antibióticos	11
2.1.2.3 Bacterias Solubilizadoras de Fósforo	12
2.1.2.4 Bacterias con Genes de Importancia Industrial	13
2.1.3 Principios de Taxonomía	14
2.1.3.1. Taxonomía Bacteriana	15
2.1.3.2. Taxonomía Polifásica	16
2.1.3.3. Taxonomía Numérica	17
2.1.3.3.1. Coeficiente de Jaccard.	18
2.1.3.3.2. Coeficiente de Simple Coincidencia.	18
2.1.4 Técnicas Moleculares Asociadas a Taxonomía Moderna	19
2.1.4.1 Aislamiento de ADN	19
2.1.4.2 Electroforesis	21
2.1.4.3 PCR - Reacción en Cadena de la Polimerasa	21
2.1.5 Técnicas de Fingerprinting	23
2.1.5.1 REP - PCR	23
2.1.6. Filogenia	24
2.1.6.1. Determinación del Parentesco Evolutivo	24
2.1.6.2. Construcción de Árboles Filogenéticos	25
2.1.6.2.1. UPGMA	25
2.2. Fundamentación Filosófica	26
2.3. Fundamentación Legal	26

2.4. Categorías Fundamentales	27
2.5. Hipótesis	29
2.5.1. Hipótesis nula	29
2.5.2. Hipótesis alternante	29
2.6. Señalamiento de variables de las hipótesis	29

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Enfoque	30
3.2. Modalidad Básica de la Investigación	30
3.3. Nivel o Tipo de Investigación	30
3.4. Población y Muestra	30
3.5. Operacionalización de Variables	30
3.6. Recolección de Información	32
3.6.1. Determinación de la Pureza de los Cultivos de Bacterias y Actinomicetes	32
3.6.1.1. Recuperación, Purificación y Almacenamiento de Microorganismos	32
3.6.1.2. Determinación de Bacterias Psicrófilas en las Bacterias de la Antártida y Chimborazo	32
3.6.2. Caracterización Molecular	33
3.6.2.1. Extracción de ADN Genómico	33
3.6.2.2. Determinación de Cantidad, Integridad y Pureza del ADN Genómico.	35
3.6.2.3. rep-PCR	36
3.6.3. Caracterización Fenotípica	40
3.6.3.1. Caracterización Macroscópica	40
3.6.3.2. Caracterización Microscópica de Bacterias	41
3.6.3.3. Tinción de Gram	41
3.6.3.4. Tinción de Cápsulas	42
3.6.3.5. Tinción de Endosporas	42
3.6.3.6. Caracterización Microscópica de Actinomicetes	42
3.7. Procesamiento y Análisis	43

3.7.1 Dereplicación de Cultivos de Microbios Mediante rep - PCR	43
3.7.2. Caracterización fenotípica	45
3.7.3. Análisis completo	45

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de los Resultados.	46
4.1.1. Determinación de Bacterias Psicrófilas	46
4.1.2. Caracterización Molecular	46
4.1.2.1. Determinación de Cantidad, Integridad y Pureza del ADN Genómico.	46
4.1.2.2. rep-PCR	47
4.1.2.3. Taxonomía Numérica de Datos Genotípicos y Fenotípicos	48
4.2. Interpretación de Datos	51
4.2.1. Determinación de la Pureza de los Cultivos de Microorganismos	51
4.2.2. Caracterización Genotípica y Fenotípica	51
4.2.3. Diversidad Biológica de los Grupos Bacterianos	53
4.2.4. Discusión General del Trabajo Investigativo	53
4.3. Verificación de hipótesis	55
4.3.1. Hipótesis nula	55
4.3.2. Hipótesis alternante	55

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	56
5.2. Recomendaciones	57

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos Informativos	58
6.1.1. Título	58
6.1.2. Instituciones Ejecutoras	58
6.1.3. Beneficiarios	58

6.1.4. Ubicación	58
6.1.5. Tiempo Estimado para la Ejecución	58
6.1.6. Equipo Técnico Responsable	59
6.2. Antecedentes de la Propuesta	59
6.3. Justificación	59
6.4. Objetivos	60
6.4.1. Objetivo General	60
6.4.2. Objetivos Específicos	60
6.5. Análisis de Factibilidad	60
6.6. Fundamentación	61
6.7. Metodología – Modelo Operativo	61
6.7.1. Caracterización Molecular	61
6.7.1.1. Extracción de ADN Genómico	61
6.7.1.2. Determinación de Cantidad, Integridad y Pureza del ADN Genómico.	63
6.7.1.3. rep-PCR	64
6.7.2. Caracterización Fenotípica	66
6.7.2.1. Caracterización Macroscópica	66
6.7.2.2. Caracterización Microscópica de Bacterias	66
6.7.2.3. Tinción de Gram	66
6.7.2.4. Tinción de Cápsulas	67
6.7.2.5. Tinción de Endosporas	67
6.7.2.6. Caracterización Microscópica de Actinomicetes	67
6.8. Administración	68
6.9. Previsión de la Evaluación	69

C. MATERIALES DE REFERENCIA

Bibliografía	70
Anexos	78

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Bacterias Productoras de Antibióticos
- Tabla 2. Técnicas Utilizadas en Taxonomía
- Tabla 3. Coeficientes de similaridad
- Tabla 4. Secuencia de primers usados en rep - PCR
- Tabla 5. Mezcla típica para 25 μ l de reacción de rep-PCR usando el primer BOX.
- Tabla 6. Mezcla típica para 25 μ l de reacción de rep-PCR usando el primer REP.
- Tabla 7. Mezcla típica para 25 μ l de reacción de rep-PCR usando el primer ERIC.
- Tabla 8. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Árbol de Problemas
- Figura 2. Organizador lógico de variables.
- Figura 3. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma elevación y margen.

ANEXO A. DATOS EXPERIMENTALES

- Tabla A1. Datos de Origen de los Microorganismos.
- Tabla A2. Determinación de Bacterias Psicrófilas.
- Tabla A3. Microorganismos Caracterizados.
- Tabla A4. Cantidades de ADN para PCR.
- Tabla A5. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer BOX, para bacterias Solubilizadoras de fósforo.
- Tabla A6. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer REP, para bacterias Solubilizadoras de fósforo.
- Tabla A7. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer ERIC, para bacterias Solubilizadoras de fósforo.
- Tabla A8. Matriz de Datos Genotípicos de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo Obtenidos de rep – PCR con los Primer BOX, REP y ERIC.
- Tabla A9. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de características fenotípicos de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo.
- Tabla A10. Grupos-Especie de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos.
- Tabla A11. Grupos-Especie de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos y Fenotípicos.
- Tabla A12. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas

en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer BOX, para bacterias Psicrófilas.

Tabla A13. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer REP, para bacterias Psicrófilas.

Tabla A14. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer ERIC, para bacterias Psicrófilas.

Tabla A15. Matriz de Datos Genotípicos de Bacterias Psicrófilas Obtenidos de rep – PCR con los Primer BOX, REP y ERIC.

Tabla A16. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de características fenotípicas de Bacterias Psicrófilas.

Tabla A17. Grupos-Especie de Bacterias Psicrófilas Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos.

Tabla A18. Grupos-Especie de Bacterias Psicrófilas Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos y Fenotípicos.

Tabla A19. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer BOX, para bacterias con posible capacidad biorremediadora de suelos.

Tabla A20. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer REP, para bacterias con posible capacidad biorremediadora de suelos.

Tabla A21. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer ERIC, para bacterias con posible capacidad biorremediadora de suelos.

Tabla A22. Matriz de Datos Genotípicos de Bacterias con posible capacidad

Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo Obtenidos de rep – PCR con los Primer BOX, REP y ERIC.

- Tabla A23. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de características fenotípicas de Bacterias con posible capacidad Bioremediadora de Suelos Contaminados con petróleo.
- Tabla A24. Grupos-Especie de Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos.
- Tabla A25. Grupos-Especie de Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos y Fenotípicos.
- Tabla A26. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer BOX, para actinomicetes productores de antibióticos.
- Tabla A27. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer ERIC, para actinomicetes productores de antibióticos.
- Tabla A28. Matriz de Datos Genotípicos de Actinomicetes Productores de Antibióticos Obtenidos de rep – PCR con los Primer BOX y ERIC.
- Tabla A29. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de características fenotípicas de Actinomicetes Productores de Antibióticos.
- Tabla A30. Grupos-Especie de Actinomicetes Productores de Antibióticos Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos.
- Tabla A31. Grupos-Especie de Actinomicetes Productores de Antibióticos Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos y Fenotípicos.

ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Figuras

- Figura B1. Dendrograma BOX – PCR de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo, similaridad al 80%
- Figura B2. Dendrograma REP – PCR de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo, similaridad al 80%
- Figura B3. Dendrograma ERIC – PCR de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo, similaridad al 80%
- Figura B4. Dendrograma completo rep - PCR de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo, similaridad al 80%.
- Figura B5. Dendrograma con características Genotípicas y Fenotípicas de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo.
- Figura B6. Dendrograma BOX – PCR de Bacterias Psicrófilas, similaridad al 80%
- Figura B7. Dendrograma REP – PCR de Bacterias Psicrófilas, similaridad al 80%
- Figura B8. Dendrograma ERIC – PCR de Bacterias Psicrófilas, similaridad al 80%
- Figura B9. Dendrograma completo rep - PCR de Bacterias Psicrófilas, similaridad al 80%.
- Figura B10. Dendrograma con Características Genotípicas y Fenotípicas de Bacterias Psicrófilas.
- Figura B11. Dendrograma BOX – PCR de Bacterias con posible capacidad

Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo, similaridad al 80%

Figura B12. Dendrograma REP – PCR de Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo, similaridad al 80%.

Figura B13. Dendrograma ERIC – PCR de Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo, similaridad al 80%

Figura B14. Dendrograma completo rep - PCR de Bacterias Biorremediadoras de Suelos Contaminados con Petróleo, similaridad al 80%

Figura B15. Dendrograma con Características Genotípicas y Fenotípicas de Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo.

Figura B16. Dendrograma BOX – PCR de Actinomicetes Productores de Antibióticos, similaridad al 80%.

Figura B17. Dendrograma ERIC – PCR de Actinomicetes Productores de Antibióticos, similaridad al 80%

Figura B18. Dendrograma completo rep - PCR de Actinomicetes Productores de Antibióticos, similaridad al 80%.

Figura B19. Dendrograma con Características Genotípicas y Fenotípicas de Actinomicetes Productores de Antibióticos.

ANEXO C. FIGURAS

- Figura C1 Tamaño y Posición de las Bandas de ADN
- Figura C2 Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (I).
- Figura C3 Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (II).
- Figura C4 Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer BOX (I).
- Figura C5 Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer BOX (II).
- Figura C6 Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer BOX (III).
- Figura C7 Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer BOX (IV).
- Figura C8 Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer REP (I).
- Figura C9 Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer REP (II).
- Figura C10 Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer REP (III).
- Figura C11 Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer ERIC (I).

Figura C12 Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer ERIC (II).

Figura C13 Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer ERIC (III).

ANEXO D. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Agar no Esporulante

Agar Gym

Agar Avena

Búfer de extracción de ADN

Búfer TE 1X

Búfer TBE 10X

ANEXO E. FOTOGRAFÍAS

RESUMEN

Ocho bacterias solubilizadoras de fósforo, siete bacterias psicrófilas, quince bacterias con posible capacidad biorremediadora de suelos contaminados con petróleo y quince actinomicetes productores de antibióticos, fueron utilizados para la caracterización fenotípica y molecular. Se realizaron tres procesos de derreplicación mediante rep – PCR, con los primers, BOX, REP y ERIC. A partir del conjunto de datos genotípicos se obtuvieron dendrogramas, que fueron analizados al 80% de similitud, se observó que en todos los grupos bacterianos, la mayoría de microorganismos formaron grupos-especie diferentes. La taxonomía numérica de datos fenotípicos acoplada a la taxonomía de datos genotípicos, robusteció los datos para la formación de los dendrogramas, ya que los grupos-especie de las bacterias psicrófilas, mantuvieron el número de grupos formado anteriormente, mientras que las bacterias solubilizadoras de fósforo, bacterias con posible capacidad biorremediadora de suelos y los actinomicetes productores de antibióticos, definieron de mejor manera los grupos-especie, y por ende aumentaron al ser analizados al 80%. Los resultados demuestran que la derreplicación mediante rep – PCR, permite identificar posibles especies diferentes de microorganismos con utilidad en biotecnología y de esta manera también contribuir al desarrollo de bioproductos específicos para diversas áreas como solubilización de fósforo, resistencia a condiciones extremas, biorremediación y producción de antibióticos.

SUMMARY

Eight phosphorus solubilizing bacteria, seven psychrophilic bacteria, fifteen bacteria with potential capacity in bioremediation of contaminated soils with petroleum and fifteen producing antibiotics actinomycetes were used for phenotypic and molecular characterization. Three processes of dereplication by rep - PCR with primers, BOX, REP and ERIC were used. From the set of genotypic data, dendrograms were obtained, which were analyzed using an 80% similarity cut – off point. The results showed that in all bacterial groups, the majority of microorganisms formed different group-species. The numerical taxonomy of phenotypic data coupled to the taxonomy of genotypic data strengthened the formation of dendrograms, since the groups of psychrophilic bacteria species, maintained the previously number of formed groups, whereas in the case of phosphorus solubilizing bacteria, bacteria with potential capacity in bioremediation of contaminated soils with petroleum and antibiotic-producing actinomycetes, there was a better definition of the group-species, and thus the number increased using an 80% similarity cut – off point. The results demonstrate that the dereplication by rep - PCR, allows the identification of possible different species of microorganism with utility in biotechnology and thus it also contributes to the development of specific bioproducts in diverse areas as phosphorus solubilization, resistance to extreme conditions, bioremediation and antibiotics production.

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACION

1.1. Tema de Investigación

Caracterización fenotípica y molecular de bacterias útiles en biotecnología.

1.2. Planteamiento del Problema

1.2.1. Contextualización

1.2.1.1. Contextualización Macro

Las bacterias son la forma de vida más antigua de la Tierra y quizá la más abundante. Estos microorganismos poblaron la tierra mucho antes que ningún otro grupo de seres vivos. Esas primeras bacterias habitaron los océanos primitivos del planeta cuando el ambiente aún era inhóspito, ya que carecía de oxígeno y con abundantes gases de una atmósfera reductora, temperaturas extremadamente elevadas y altos niveles de radiación ultravioleta procedente del Sol. En cambio, en la actualidad, los procariotes, y dentro de éstos, las bacterias, se encuentran en prácticamente todos los ecosistemas del planeta, desempeñando un papel clave en el equilibrio ecológico (Salazar *et al.*, 2009).

Las bacterias han desempeñado un rol importante en el desarrollo y avance científico relacionado al estudio de los seres vivos. Uno de los mejores ejemplos constituye el trabajo relacionado por Alexander Fleming, quien junto a su grupo de investigadores en la Escuela de Medicina Santa María, de la Universidad de Londres, descubrieron el poder bactericida de *Penicillium notatum*. Su investigación fue publicada en el British Journal of Experimental Pathology, en octubre de 1929, bajo el título "On the

antibacterial action cultures of *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*". En el artículo, Fleming describe cómo la penicilina es activa frente a algunos microorganismos y sugiere, teóricamente, la posibilidad de su uso terapéutico (González & Orero, 2007). Otros trabajos de gran importancia fueron los del bacteriólogo inglés Griffith, quien estudió a varias cepas de *Pneumococcus*, que causan la neumonía, aportando importante información sobre la herencia y rasgos estructurales y funcionales de un individuo. Esto revela la utilidad de los microorganismos en diversos hallazgos que marcaron importantes avances científicos en el siglo XX (Montaño *et al.*, 2010).

1.2.1.2. Contextualización Meso

En la búsqueda de organismos para contribuir en procesos técnicos o para producir metabolitos nuevos, un nuevo organismo puede ser ubicado dentro de un género bien estudiado, realizando predicciones de muchas de sus características genéticas, bioquímicas y fisiológicas (Glaze & Nikaido, 2007). Inicialmente existían dos reinos, que separaron a plantas y animales. En 1868 Ernest Haeckel, científico alemán, propuso un tercer reino específicamente para microorganismos, denominado como Protista. Aproximadamente un siglo después, en 1969, Robert Whittaker propuso un sistema de clasificación de cinco reinos. Su clasificación incluía Plantas (*Plantae*), Animales (*Animalia*), Fungi, Protista y Mónera (Staley *et al.*, 2007).

Esta situación cambió dramáticamente cuando Zuckerandl y Pauling señalaron que las moléculas pueden servir como documentos para la historia evolutiva. Las relaciones evolutivas ahora podrían deducirse de las diferencias observadas entre secuencias de macromoléculas homólogas. Carl Woese fue el primero en explotar al máximo el poder de la filogenia molecular para inferir las relaciones evolutivas entre los reinos. Eligió tal vez la única macromolécula óptima para el establecimiento de las relaciones evolutivas profundas, el ARN ribosomal 16S. Uno de los primeros y más espectaculares resultados de los estudios de Woese fue el descubrimiento

de un nuevo reino microbiano, las *Arqueas*, entonces llamados arqueobacterias. El carácter distintivo de la evolución de las Arqueas finalmente demostró que toda la vida conocida se pueden organizar en tres dominios principales: Eukarya, Archaea y Bacteria. El fruto de los esfuerzos de Woese, fue un árbol universal que describe las relaciones evolutivas de toda la vida (DeLong & Pace, 2001).

1.2.1.3. Contextualización Micro

La evolución histórica de la biotecnología está caracterizada por tres etapas. La primera se basó en prácticas empíricas con mínimo de conocimiento científico, esta época se remonta a los 7000 años antes de Cristo e incluye los métodos tradicionales de fermentación para producir alimentos y bebidas. La segunda etapa 1930 y 1940, el desarrollo industrial requirió de la aplicación de ciencia a gran escala, especialmente del conocimiento de los conocimientos microbiológicos. Una combinación de avances en la bioquímica y bioconversión así como biocatálisis dieron como resultado numerosos productos en la industria farmacéutica. La tercera se inicia en los años 1960 a 1970 cuando se inicia la manipulación del código genético, lo que dio la oportunidad a los científicos de producir combinaciones genéticas nuevas con aplicación industrial. (CONAP, 2004). Los estudios filogenéticos moleculares han revelado una gran variedad de nuevos grupos microbianos útiles (DeLong y Pace, 2001).

La biotecnología, está avanzando muy rápidamente en varios aspectos, entre ellos en la detección de nuevas relaciones entre las características genéticas y la mayor predisposición a ciertas enfermedades, así como en mejoras en el desarrollo de la producción agropecuaria y en asegurar la calidad de los alimentos. (Folle, 2005). De la biotecnología se derivan muchas aplicaciones. En la actualidad moléculas pequeñas derivadas de fuentes naturales juegan un papel clave en el bienestar humano, actuando como drogas o precursores con útiles propiedades farmacéuticas. Entre estos productos naturales, los antibióticos son particularmente importantes.

La capacidad de los microorganismos a evolucionar rápidamente su resistencia compromete la eficacia de los antibióticos, siendo necesario el continuo descubrimiento de productos naturales estructuralmente nuevos con propiedades antimicrobianas (Poulse *et al.*, 2011).

Por otro lado, la degradación microbiana de hidrocarburos aromáticos por bacterias, es otro punto importante que se está estudiando con el objetivo de desarrollar aplicaciones para la eliminación de compuestos tóxicos. Esfuerzos actuales se han dirigido a la manipulación genética de bacterias para mejorar su capacidad para degradar los contaminantes (Parrilli *et al.*, 2010).

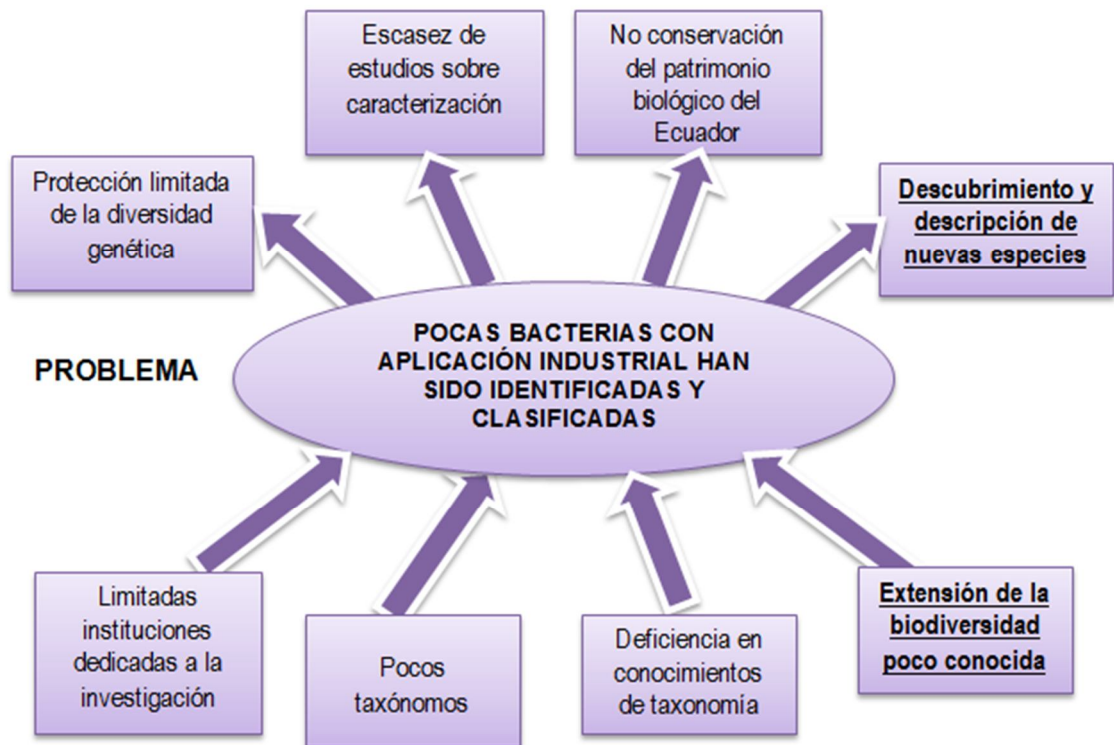
Los microorganismos constituyen la fuente natural de la biotecnología, esta es la era de un crecimiento explosivo en el análisis y manipulación de genomas microbianos, así como de la invención de nuevas formas en las cuales los microorganismos son utilizados (Glazer y Nikaido, 2007). En la actualidad la investigación de genes bacterianos que puedan ser útiles en otros organismos está tomando gran importancia, por ejemplo la identificación de genes de resistencia al frío a partir de bacterias nativas de la Antártida, los cuales pueden ser insertados en otros organismos que necesiten estas nuevas características por ejemplo las papas para resistir las heladas.

1.2.2. Análisis Crítico

1.2.2.1. Árbol de Problemas

(Ver página siguiente)

EFFECTOS



CAUSAS

Figura 1. Árbol de Problemas

Elaborado por: Lorena Núñez

1.2.2.2. Relación Causa – Efecto

El Ecuador es uno de los países más diversos del mundo al considerar la variedad y cantidad de especies que posee en relación a su tamaño. La posición ecuatorial, junto con la influencia del Océano Pacífico, la Cordillera de los Andes y la meseta Amazónica, da como resultado diferentes ecosistemas y climas. Sin embargo, poco se ha hecho para poder descubrir su verdadera riqueza, principalmente en lo que se refiere a microorganismos. Son pocas las instituciones dedicadas a investigaciones en este campo, por lo tanto se conoce muy poco sobre microorganismos benéficos, en especial bacterias, nativos del Ecuador que puedan ser útiles en procesos industriales, y se conoce aún menos sobre su taxonomía y relaciones evolutivas entre ellas.

Los resultados de esta investigación permitirán aportar con datos importantes para el descubrimiento y descripción de especies diferentes de bacterias nativas del Ecuador, que puedan ser útiles en biotecnología, además se podrá contribuir a la ampliación del conocimiento de la biodiversidad microbiana por medio de estudios filogenéticos y moleculares.

1.2.3. Prognosis

La no realización de esta investigación conllevará a no encontrar nuevas especies de bacterias nativas del Ecuador que puedan ser útiles en la industria, así como en procesos de producción de antibióticos, biorremediación y desarrollo de plantas con genes de resistencia a condiciones ambientales extremas como las heladas. Además no se podrá contribuir con información taxonómica sobre la diversidad bacteriana del Ecuador.

1.2.4. Formulación del Problema

¿Por qué pocas bacterias con aplicación industrial han sido investigadas y clasificadas?

1.2.5. Preguntas Directrices

- ¿Se puede determinar la pureza de bacterias aisladas con utilidad en biotecnología almacenadas como suspensiones de glicerol?
- ¿Qué método se utilizará para caracterizar molecularmente bacterias con utilidad en biotecnología?
- ¿Qué características se analizarán para el desarrollo de la caracterización fenotípica de las cepas bacterianas?
- ¿A partir de qué caracterizaciones moleculares y fenotípicas es posible describir las posibles nuevas especies de bacterias encontradas?

1.2.6. Delimitación

1.2.6.1. Delimitación Científica

Área:	Biotecnología
Sub-área:	Biotecnología microbiana
Sector:	Biología Molecular
Sub-sector:	Taxonomía

1.3. Justificación

Como se menciona en el documento *Política y Estrategia Nacional de Biodiversidad del Ecuador 2001 – 2010*, El Ecuador se encuentra entre los países biológicamente más ricos del planeta. La comunidad científica nacional e internacional considera al Ecuador como uno de los países megadiversos. Ser ricos en biodiversidad significa que el país cuenta con las más variadas formas de vida expresadas en su flora, fauna y microorganismos, en su diversidad genética y en su significativa abundancia de ecosistemas que se forman gracias a las particulares condiciones geográficas de ubicación relieve y clima.

De lo mencionado anteriormente, la biodiversidad microbiana es la menos estudiada y considerada en el Ecuador, debido a que son pocas las instituciones dedicadas a investigaciones en este campo. Por lo cual ésta investigación va enfocada al estudio de posibles especies microbianas diferentes entre sí, nativas del Ecuador, lo que permitirá enriquecer el patrimonio biológico del país. Así se podrá continuar con los nuevos retos de la biotecnología, de los cuales dependemos para sobrevivir y enfrentar los retos del futuro. Estos retos son gigantescos para la continuidad de la vida, en particular, para satisfacer la demanda de alimentos y medicamentos y resolver problemas ecológicos y de contaminación ambiental.

El presente estudio pretende aportar a la solución de esta problemática, este tipo de investigaciones complementadas con el estudio del material genético permitirá revelar la existencia de cepas bacterianas con características fenotípicas y moleculares similares. La importancia del desarrollo de esta investigación también radica en la estimación de que sólo se conoce el 3% de los microorganismos y que pocos se han estudiado con profundidad (Montaño *et al.*, 2010).

La caracterización fenotípica y molecular permitirá enriquecer la información sobre bacterias que pueden ser una fuente prolífica para la obtención de medicamentos, así como para procesos de biorremediación, e identificación de genes de importancia industrial. Las caracterizaciones de los organismos además son muy importantes para bancos de germoplasma debido a que tienen como objetivo preservar la diversidad de los recursos genéticos de las especies y corregir la uniformidad derivada de las prácticas de mejoramiento genético que han reducido la base genética de los cultivos y que causan la indefensión de las poblaciones ante el ataque de patógenos para el que no existe resistencia.

Los diversos beneficios que los microorganismos nos pueden brindar ligados a la aplicación de herramientas biotecnológicas contribuyen al desarrollo sostenible, las cuales al ser técnicamente factibles dentro del nivel de desarrollo técnico-científico de un país proveen beneficios tangibles al ser ambientalmente seguras, socioeconómica y culturalmente aceptables con el fin de promover el desarrollo sostenible a través del uso de recursos genéticos (Montaño *et al.*, 2010).

1.4. Objetivos

1.4.1. General

- Caracterizar fenotípica y molecularmente bacterias útiles en biotecnología

1.4.2. Específicos

- Determinar la pureza de bacterias aisladas con utilidad en biotecnología.
- Caracterizar molecular y fenotípicamente bacterias con utilidad en biotecnología.
- Identificar la diversidad biológica de cada uno de los grupos de bacterias estudiados.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes Investigativos

2.1.1. Importancia de los Microorganismos en la Biotecnología

El desarrollo de nuevos bioproductos usando los recursos genéticos de la flora y fauna, incluyendo la de los microorganismos, y de otros recursos biológicos, constituye un objetivo de la valorización de la biodiversidad. El aprovechamiento de la biodiversidad mediante la biotecnología, permite otorgar un valor económico intangible, con potencial de aumentar la productividad agrícola e industrial, de mejorar la salud y nutrición, y de restaurar y proteger el medio ambiente (Quezada *et al.*, 2005). La biotecnología moderna está relacionada a varios aspectos como biorremediación, descubrimiento de antibióticos, e identificación de genes útiles.

2.1.2. Principales Grupos de Microorganismos Útiles en Biotecnología

2.1.2.1. Bacterias Biorremediadoras

Muchos tóxicos son difíciles de degradar por la falta de microorganismos que reconozcan y transformen éstos compuestos. Es por ello que la biotecnología puede ampliar el rango de moléculas y lugares, donde la remediación puede utilizarse, usando microorganismos que reconozcan y degraden aquellos compuestos creados por el hombre (Di Paola & Vicién, 2010).

Se han identificado bacterias aerobias reconocidas por sus habilidades degradativas. Entre ellas se encuentran *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, y *Sphingomonas*. Estos microbios han sido a

menudo reportados por degradar pesticidas e hidrocarburos. Muchos de éstos compuestos pertenecen al grupo de los alcanos y compuestos poliaromáticos. Muchas de estas bacterias usan los contaminantes como a única fuente de carbono y energía (Vidali, 2001).

Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), son contaminantes importantes encontrados en aire, suelo y sedimentos. Los HPAs son productos de la combustión incompleta de materiales orgánicos, que resultan en parte de procesos de combustión natural, tal como ocurre en erupciones volcánicas, sin embargo, el mayor número son producto de actividades humanas. La degradación del naftaleno es el proceso más estudiado dentro de los HPAs. Cepas bacterianas capaces de degradar hidrocarburos aromáticos han sido aisladas principalmente del suelo, en donde las más comunes generalmente son bacterias gram – negativas, del género *Pseudomonas*. También se han reportado otros géneros bacterianos con capacidad biodegradadora. Entre estos tenemos a miembros de los géneros *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, and *Rhodococcus* (Mrozik *et al.*, 2002).

2.1.2.2. Bacterias Productoras de Antibióticos

En el caso de los antibióticos, la producción de compuestos antimicrobianos parece ser un fenómeno general en la mayoría de las bacterias. Especies de *Bacillus* producen un gran número de compuestos biológicos activos frente a bacterias, hongos, protozoos y virus. La prevalencia de resistencia a los antimicrobianos entre los principales agentes patógenos microbianos se está incrementando a un ritmo alarmante en todo el mundo. Las soluciones actuales implican el desarrollo de un enfoque más racional para el uso de antibióticos y el descubrimiento de nuevos antimicrobianos (Muhammad *et al.*, 2009). La respuesta a esta necesidad incluye un renovado interés por las bacterias, en ellas los actinomicetes, que han sido reconocidos como una fuente prolífica de productos naturales (Tabla 1), a pesar de que los actinomicetes se han estudiado ampliamente en el pasado, se estima que

sólo el 3% de productos naturales potenciales incluyendo los del género *Streptomyces*, han sido estudiados (Gontang *et al.*, 2010).

Tabla 1. Bacterias Productoras de Antibióticos

Antibiótico	Organismo productor	Organismos blanco	Sitio de acción	Grupo
Bacitracina	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacterias Gram +	Síntesis de la pared	Bacteria
Polimixina B	<i>Bacillus polymyxa</i>	Bacterias Gram +	Membrana celular	Bacteria
Anfotericina B	<i>Streptomyces nodosus</i>	Hongos	Membrana celular	Actinomicete
Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>	Bacterias Gram +	Síntesis proteica	Actinomicete
Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	Bacterias Gram + y -	Síntesis proteica	Actinomicete
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	Bacterias Gram -	Síntesis proteica	Actinomicete
Tetraciclina	<i>Streptomyces rimosus</i>	Bacterias Gram + y -	Síntesis proteica	Actinomicete
Vancomicina	<i>Streptomyces orientalis</i>	Bacterias Gram +	Síntesis proteica	Actinomicete
Gentamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>	Bacterias Gram + y -	Síntesis proteica	Bacteria
Rifampicina	<i>Streptomyces mediterranei</i>	<i>M. tuberculosis</i>	Síntesis proteica	Actinomicete

(ArgenBio, 2010)

2.1.2.3. Bacterias Solubilizadoras de Fósforo

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos. Las plantas deben absorberlo del suelo, donde se encuentra en muy baja concentración, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg kg⁻¹. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio

que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para los vegetales. Por lo tanto se considera, que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutrientes disponibles para las plantas (Fernández *et al.*, 2005).

Se han aislado de distintos suelos bacterias solubilizadoras de fosfato pertenecientes a los géneros *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus* y *Rhizobium*. Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato y no solo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales (Fernández *et al.*, 2005). También se incluyen algunas especies de *Streptomyces* que poseen la capacidad de disolver fosfatos insolubles dentro de los cuales podemos encontrar a *Streptomyces griseus* (Bobadilla & Rincón, 2008).

2.1.2.4. Bacterias con Genes de Importancia Industrial

En la actualidad la identificación de genes que brinden cierto tipo de resistencia a condiciones abióticas son también dependientes de la biotecnología microbiana, debido a que aumentan en gran medida la diversidad de genes que pueden ser incorporados en las plantas de cultivo y considerablemente reducir el tiempo necesario para la producción de nuevas variedades de plantas. Ahora es posible transferir genes foráneos en células vegetales (Glazer & Nikaido, 2007). Las plagas y las condiciones climáticas extremas, como es el caso de las heladas, son los elementos más devastadores de la agricultura. Por esta razón, la introducción de genes que provocan el desarrollo de resistencias, supone un menor uso de insecticidas en los campos, lo que ocasiona un menor impacto en el ecosistema y salud de las personas.

Se están desarrollando investigaciones sobre bacterias de la Antártida las cuales tienen como objetivo conocer el genoma de una bacteria psicrófila, resistente al frío, para ayudar a conocer cómo se adaptan a las bajas temperaturas. Los investigadores estudiarán cómo funcionan las enzimas para el metabolismo de esas formas de vida. Los estudios se centrarán en la microflora compuesta por bacterias psicrófilas, que sobreviven temperaturas entre cinco grados bajo cero y cinco grados. Los microorganismos de la Antártida adaptaron sus células y modificaron sus mecanismos de alimentación y biosíntesis para resistir las inclemencias climáticas. (Comunidad Virtual de la Sociedad Cubana de Bioingeniería, 2011).

Algunas de estas adaptaciones al frío de las bacterias psicrófilas son la producción de enzimas resistentes al frío, sistemas de transporte adaptados a bajas temperaturas, el aumento de la concentración de ácidos grasos en la cadena de fosfolípidos de la membrana celular, esta última, para que continúe el estado semifluido de la membrana y evitar la congelación (Sánchez & Corrales, 2006).

2.1.3. Principios de Taxonomía

La clasificación es la parte de la taxonomía relacionada con el agrupamiento de bacterias dentro de una taxa basado en características comunes. Inicialmente existían dos reinos, el de las plantas y de los animales. En 1868 Ernest Haeckel, científico alemán propuso un tercer reino específicamente para microorganismos el reino protista. Aproximadamente un siglo después, en 1969, Robert Whittaker propuso un sistema de clasificación de cinco reinos. Su clasificación incluía los reinos *Plantae*, *Animalia*, *Fungi*, *Protista* y *Monera*. (Staley *et al.*, 2007).

Los organismos fueron separados uno de otro en base a la nutrición y estructura celular. Por lo tanto, las plantas son eucariotes fotosintéticos, los hongos son heterótrofos que usan nutrientes disueltos, y los animales son heterótrofos que ingieren comida. Luego en 1990, Carl Woese y colegas

propusieron una nueva clasificación completa, el Árbol de la Vida. A diferencia de todas las clasificaciones previas esta nueva clasificación utiliza una aproximación filogenética molecular. El Árbol de la Vida se basa en análisis de secuencias de una macromolécula común que comparten todos los organismos, el ARN de la subunidad pequeña del ribosoma. Este ARNr fue usado para separar todos los organismos de la tierra en tres diferentes dominios, *Bacteria*, *Archea* y *Eucarya* (Staley *et al.*, 2007).

2.1.3.1. Taxonomía Bacteriana

La taxonomía consiste en la clasificación, identificación y nomenclatura de los microorganismos. Las primeras descripciones para la clasificación se basaban en escasas pruebas bioquímicas. En el siglo XIX, se propuso una nueva clasificación, pero luego, la mayoría de las cepas de referencia no estaban disponibles o no correspondían exactamente con las características descritas con antelación. A partir de 1980 se publicó la Lista Aprobada de Nombres Bacterianos en el *International Journal of Systematic Bacteriology*, se incluyeron solo las especies adecuadamente descritas y cuya cepa de referencia estuviera disponible. (Leiva, 2001). Carl Von Linné propuso un nuevo sistema de clasificación en el que de acuerdo a las reglas de la nomenclatura bacteriana la raíz del nombre de la especie u otro taxón debe dar una terminación latina, para que los nombres del género y de la especie concuerden (Staley *et al.*, 2007).

La primera letra del nombre del género debe ser mayúscula, el nombre de la especie debe ser en minúscula, y las dos deben estar en itálicas. Por ejemplo el género *Staphylococcus*, se deriva del griego *Staphyl* de *staphyle*, que significa racimo de uvas, y *coccus* también del griego que significa fruto, la *o* se utiliza para unir las dos palabras. El nombre de la especie *aureus*, viene del latín que significa dorado, la pigmentación de los miembros de esta especie. La terminación *us* del género y de la especie, es la terminación masculina del latín, para un sujeto (*Staphylococcus*, en este caso), y su

adjetivo *aureus*. Sucesivamente categorías taxonómicas más altas son familia, orden, clase, phylum, y dominio (Staley *et al.*, 2007).

2.1.3.2. Taxonomía Polifásica

La taxonomía polifásica, surgió hace 25 años y está destinada a la integración de los diferentes tipos de datos e información (fenotípica, genotípica y filogenética) sobre los microorganismos y, esencialmente, indica un tipo de consenso de la taxonomía. El término "taxonomía polifásica" fue acuñado por Colwell y se utiliza para la delimitación de los taxones en todos los niveles (Vandamme *et al.*, 1996).

Los análisis fenotípicos constituyen la base para una descripción formal de los taxones, de especies y subespecies hasta género y familia. Si bien los datos genotípicos se utilizan para asignar los taxones en un árbol filogenético y para dibujar las líneas fronterizas más importantes de los sistemas de clasificación, la consistencia fenotípica es necesaria para generar sistemas útiles de clasificación y por lo tanto puede influir en la profundidad de una línea jerárquica. (Vandamme *et al.*, 1996).

De forma general los métodos utilizados en la taxonomía generalmente se dividen en dos grupos: Métodos Genotípicos, y Métodos Fenotípicos. Los métodos genotípicos van dirigidos directamente al estudio de las moléculas de ADN y ARN, y los Métodos fenotípicos, son la expresión observable del genotipo, y depende de las condiciones ambientales. En la Tabla 2 se muestran varios de los métodos utilizados en taxonomía (Valverde, 2003).

Tabla 2. Técnicas Utilizadas en Taxonomía

Técnica	Fam ilia	Género	Especie	Cepa
Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP)				■
Análisis de fragmentos de restricción de baja frecuencia (LEREA)				■
Ribotipado				■
Amplificación de ADN (AFLP, AP - PCR, DAF, RAPD, rep - PCR, ARDRA)				■
Técnicas serológicas (anticuerpos monoclonales y policlonales)				■
Zimogramas (MLEE)				■
Perfiles de proteínas totales				■
Hibridación ADN - ADN			■	■
Contenido G+C			■	■
ADNt - PCR			■	■
Marcadores quimiotaxonómicos (poliaminas, quinonas)		■	■	■
Perfiles de ácidos grasos		■	■	■
Estructura de la pared celular	■	■	■	■
Fenotipo (clásico, API, BIOLOG...)	■	■	■	■
Secuenciación de ARNr	■	■	■	■
Sondas de ADN	■	■	■	■
Secuenciación de ADN	■	■	■	■

(Valverde, 2003)

2.1.3.3. Taxonomía Numérica

En 1963 Sokal y Sneath describieron una aplicación para la taxonomía, en la cual se usan tantas características como sea posible y a las cuales se les da un mismo peso (Gest, 1999). Es decir, que el metabolismo de una fuente de carbono es considerado tan importante como la coloración de Gram o la presencia de un flagelo. A cada característica si está presente se le asigna el valor (1) y si está ausente se le asigna el valor (0) y posteriormente la similitud entre cepas es luego comparada por un coeficiente de similitud (Staley *et al.*, 2007). En taxonomía, a los organismos o cepas en estudio se

los denomina OTU, que significa *Unidad Taxonómica Operacional* (Herrera, 2009).

Sneath en 1995 concluyó que “*La taxonomía numérica es el mayor avance en sistemática desde Darwin o tal vez Linneo. A estimulado muchas áreas nuevas de crecimiento, incluyendo filogenética numérica, taxonomía molecular, morfometría e identificación numérica*” (Gest, 1999).

2.1.3.3.1. Coeficiente de Jaccard.

El coeficiente de Jaccard S_{sj} , entre dos cepas, A y B, se define de la siguiente manera:

$$S_{sj} = \frac{a}{a + b + c}$$

Donde a representa el número de características positivas compartidas por las cepas A y B; b representa el número de características positivas para A y negativas para B; y c representa el número características positivas para B y negativas para A. Características negativas para las dos cepas A y B son consideradas irrelevantes debido a que habrían muchas características que no tengan relación con su similitud (Staley *et al.*, 2007).

2.1.3.3.2. Coeficiente de Simple Coincidencia.

El coeficiente de simple coincidencia se define como:

$$S_{sj} = \frac{a}{a + b + c + d}$$

Donde a es el número de características presentes en las dos cepas, b es el número de características que solo están presentes en la cepa A, c es el número de características sólo presentes en la cepa B, y d es el número de características que no se encuentran presentes en ninguna de las dos cepas

(Backhaus *et al.*, 2000). Para utilizar los coeficientes de similitud, se debe transformar los datos de las medidas en datos binarios.

Además de los dos coeficientes mencionados, también se pueden utilizar otros coeficientes de similitud, para determinar la similitud entre cepas. Como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3. Coeficientes de similitud

Coeficientes	Expresión de Similitud
Simple Matching (SM)	$\frac{a + d}{a + b + c + d}$
Rogers y Tanimoto (RT)	$\frac{a + d}{a + 2b + 2c + d}$
Anderberg (A)	$\frac{a}{a + 2(b + c)}$
Russel y Rao (RR)	$\frac{a}{a + b + c + d}$
Jaccard	$\frac{a + d}{a + b + c}$
Sorensen – Dice (SD)	$\frac{2a}{2a + b + c}$

(Moura, 1999)

2.1.4. Técnicas Moleculares Asociadas a Taxonomía Moderna

2.1.4.1. Aislamiento de ADN

El ADN para su extracción requiere ser separado de los componentes de membrana, proteínas residuales y polisacáridos. Para evitar la degradación del ADN es necesario utilizar material libre de ADNsas y manipulación cuidadosa. (Amaru *et al.*, 2008).

Los pasos fundamentales en la extracción de ADN son:

1) Homogeneización de la muestra: Permite la disgregación de la estructura tisular y celular para facilitar la salida de los ácidos nucleicos.

Dentro de los métodos para la homogenización podemos mencionar los físicos como congelación-descongelación, choque osmótico; los químicos como la utilización de detergentes (SDS) y también los enzimáticos como la lisozima, la proteinasa K, etc. El agregado de quelantes de magnesio, como el EDTA, a las soluciones de extracción contribuye también a la reducción de la integridad de las membranas (Universidad Nacional de La Plata, 2009)

2) Separación y Purificación: Permite la eliminación progresiva de proteínas y otros contaminantes celulares y la obtención de un material genético cada vez más limpio. Dentro de las metodologías utilizadas la más común es la extracción con mezclas de fenol-cloroformo, el primero se utiliza para la desnaturalización y solubilización de las proteínas y componentes celulares y el cloroformo permite la separación de las fases durante la centrifugación, además de también ser desnaturalizante (Universidad Nacional de La Plata, 2009).

3) Precipitación: Permite la obtención del ácido nucleico listo para ser almacenado o diluido a la concentración deseada para su utilización. Este paso se realiza mediante el agregado de 1 volumen de isopropanol o 2 a 3 volúmenes de etanol. (Universidad Nacional de La Plata, 2009).

4) Lavado: Se lava la pastilla de ADN obtenida de la etapa anterior con etanol al 70% para eliminar todas las sales que permanezcan en la solución. Las muestras se centrifugan, se elimina el etanol y se deja secar el ADN, hasta que no haya más trazas de alcohol (Falcón y Valera, 2007).

5) Recuperación: El ADN aislado se puede resuspender en búfer Tris tras ser secado completamente (Newsletter Microbial, 2009).

Posteriormente a la extracción del ácido nucleico de interés es necesario evaluar la cantidad y calidad del mismo (Universidad Nacional de La Plata, 2009).

2.1.4.2. Electroforesis

Esta técnica se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico. Las moléculas de ADN poseen una carga negativa uniforme por unidad de masa, lo que hace que su movilidad hacia el ánodo (+) solo venga determinada por el tamaño de la molécula (Luque & Herráez, 2002).

La separación de los fragmentos de ADN se realiza por electroforesis en geles de agarosa. El gel se prepara en distintas concentraciones en función del tamaño de los fragmentos de ADN que se quieren separar. Los fragmentos más pequeños, aproximadamente hasta 1000 pb se pueden separar en geles de poliacrilamida; para tamaños algo mayores hasta 20 kbp se usan geles de agarosa. Una vez separadas, las moléculas de ADN se visualizan normalmente por la fluorescencia de distintos compuestos que se unen a ellas. Aunque el más utilizado es el bromuro de etidio, va siendo sustituido por otros fluorocromos con mayor poder de detección o menor toxicidad (Luque & Herráez, 2002).

2.1.4.3. PCR - Reacción en Cadena de la Polimerasa

En 1985 Mullis, inventó un método para lograr la multiplicación in vitro de fragmentos definidos de ADN sin necesidad de recurrir a vectores y su replicación en bacterias. Esta técnica permite amplificar pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces. Su replicación es semiconservativa y los fragmentos se amplifican en forma exponencial. (Cortazar & Silva, 2004).

Para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos primers que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs), el tampón de reacción para la polimerasa, agua ultra pura para completar el volumen final de reacción, que normalmente oscila

entre 20 y 100 μ l, y como ingrediente final crucial para la reacción, la ADN polimerasa termoestable (Rodríguez & Barrera, 2004).

Los pasos del PCR son:

Desnaturalización: Mediante un calentamiento a 94°C durante por lo menos un minuto, el ADN de doble cadena logra que sus cadenas se separen o desnaturalicen (Rodríguez & Barrera, 2004).

Alineamiento: La ADN polimerasa, necesita del grupo OH- libre en el extremo 3' del primer ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a partir de donde iniciar la síntesis. Este punto constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria al molde. Mientras que un primer es complementario a la secuencia del extremo 5' de la región del ADN molde a amplificar, el otro es al extremo 3' de la misma, pero en la cadena opuesta. El alineamiento se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 72°C. Ambas cadenas originales del ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas. (Rodríguez & Barrera, 2004); (Newsletter Microbial, 2009).

Extensión: Con el ADN molde de cadena sencilla, excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleósidos monofosfatos en dirección 5'→3'. Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa 72°C para evitar alineamientos inespecíficos de los primers. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 min. para alargar 1000 nucleótidos. (Rodríguez & Barrera, 2004).

Los productos de reacción son separados por electroforesis en gel. Dependiendo de la cantidad producida y el tamaño del fragmento amplificado, los productos de reacción pueden ser visualizados directamente

por tinción con bromuro de etidio o de un protocolo de tinción de plata, o por medio de radioisótopos y autorradiografía (IPGRI & Cornell University, 2003).

2.1.5. Técnicas de Fingerprinting

2.1.5.1. REP - PCR

La amplificación entre elementos repetitivos de ADN mediante análisis de la reacción en cadena de la polimerasa PCR, o rep-PCR ('repetitive element-based PCR'), genera 'fingerprints', patrones de fragmentos de ADN, mediante la amplificación de las múltiples copias de los elementos repetitivos dispersos en el genoma molde. En los análisis rep-PCR, los primers utilizados corresponden a secuencias de regiones de ADN conservadas en bacterias, como la secuencia REP ('Repetitive Extragenic Palindromic Sequence'), las secuencias ERIC ('Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences'), y el elemento BOX. La naturaleza altamente conservada de estas secuencias ha permitido su utilización para el análisis de numerosos microorganismos (Jiménez, 2001).

Los primers o iniciadores son oligonucleótidos homólogos a las secuencias que están presentes en múltiples copias en el genoma de la bacteria (Johnson & O'Bryan, 1999), estos primers hibridan con secuencias de ADN o repetitivas. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN. Las secuencias palindrómicas repetitivas extragénicas REP poseen de 35-40pb, las secuencias de consenso intergénicas de enterobacterias repetitivas ERIC de 124-127pb, y el elemento BOX de 154 pb. Estas secuencias parecen estar situados en distintas posiciones intergénicas de todo el genoma (Versalovic et al. 1994).

La técnica de REP-PCR se caracteriza por su simplicidad, no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales; rapidez, menos de 24 h y su relativo bajo coste, una vez que se dispone de un termociclador. (Fernandez, 2005).

2.1.6. Filogenia

La filogenia es el estudio de la evolución y desarrollo de las especies. La comparación de secuencias de algunas macromoléculas, es la forma más precisa y confiable para inferir en las relaciones filogenéticas. Las técnicas del ADN recombinante ayudan a clasificar a los organismos de un modo más correcto, de acuerdo a su filogenia. Estos estudios se pueden hacer estudiando los ARNr 16S o 18S, porque son secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, y por eso se ven claramente las diferencias entre los distintos microorganismos y se pueden realizar árboles filogenéticos y esquemas evolutivos (Herrera, 2009).

2.1.6.1. Determinación del Parentesco Evolutivo

Los microbiólogos están utilizando una combinación de métodos denominada Taxonomía Polifásica, para diferenciar a las especies de procariotas en bases genéticas y fenotípicas. Se ha propuesto que un procariota cuya secuencia del ARNr 16S difiera en más de un 3% de la del resto de organismos, debe considerarse una nueva especie, esto es, la secuencia tiene una identidad menor del 97% con cualquier otra secuencia de la base de datos. En la delimitación de un género mediante criterios moleculares diferencias de más del 5 – 7%, en las secuencias 16S se han considerado como criterio para establecer un nuevo género (Brock, 2004).

2.1.6.2. Construcción de Árboles Filogenéticos

Un árbol filogenético es una representación gráfica de las relaciones evolutivas entre entidades que comparten un ancestro común. Estas entidades pueden ser genes, genomas, o cualquier unidad taxonómica operacional OTU (Herrera, 2009).

Los métodos para el cálculo de los árboles filogenéticos generalmente se pueden dividir en dos categorías. Estos son métodos basados en matrices de distancias, también conocidos como clustering o métodos algorítmicos por ejemplo, Neighbor - joining, Fitch-Margoliash, UPGMA; y métodos basados en datos discretos, también conocido como árbol de los métodos de búsqueda como máxima parsimonia, máxima verosimilitud y métodos bayesianos (Michu, 2007).

2.1.6.2.1. UPGMA

El método para el análisis filogenético UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages), es un algoritmo heurístico que fue definido por los Doctores Peter H. A. Sneath y Robert R. Sokal en el año de 1973.

Este método consiste en el cálculo de una matriz de distancias genéticas, en la cual se lleva a cabo la búsqueda de la distancia más pequeña que se haya generado entre especies, para así relacionar las dos especies más cercanas y agruparlas como una sola unidad taxonómica independiente. Una vez realizada esta operación, se procede a re calcular la ya mencionada matriz de distancias. Se calculan los promedios de la nueva unidad contra las restantes creando una nueva matriz y todo el proceso es repetido hasta que todas las especies se encuentren relacionadas a un único elemento conocido como el ancestro hipotético (Acero, 2007).

2.2. Fundamentación Filosófica

El presente trabajo tiene un sustento filosófico en la Dialéctica, por ser un tema eminentemente científico.

La biodiversidad es un componente sustantivo de la conformación del Ecuador, espacio privilegiado con diversidad de formas de vida; es parte integrante de las culturas nacionales, incide en las formas de organización y de existencia social, y constituye el sustento de la economía y producción del Ecuador. Debido a que la biodiversidad guarda una relación tan estrecha con las necesidades humanas, su conservación debería considerarse como un elemento estratégico de la seguridad nacional. La diversidad biológica ha sido y es utilizada para beneficio de la población ecuatoriana y ha permitido el desarrollo del país (Política y Estrategia Nacional de la Biodiversidad 2001 – 2010).

La difusión de información sobre biotecnología en el país es muy débil y se limita a personas involucradas directamente en la investigación científica o el manejo de la biotecnología. Ni los centros de investigación ni las instituciones tienen programas de difusión activa de información sobre la biotecnología hacia el público general por lo cual muchas veces la única fuente de información pública son artículos en la prensa que no siempre se basan en hechos científicos y mayormente son polemizados. (Wendt & Izquierdo, 2002)

2.3. Fundamentación Legal

Ley para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad

Del objeto de la ley: Art.1. La Ley para la Conservación y Uso Sustentable de la Biodiversidad tiene por objeto proteger, conservar, restaurar la biodiversidad y regular e impulsar su utilización sustentable; establece los principios generales y normas para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad y sus servicios, el acceso a los recursos genéticos, la

bioseguridad, la rehabilitación y restauración de ecosistemas degradados y la recuperación de especies amenazadas de extinción, y los mecanismos de protección de los derechos sobre la biodiversidad en materia administrativa, civil y penal.

2.4. Categorías Fundamentales

(Ver página siguiente)

CATEGORIZACIÓN DE VARIABLES

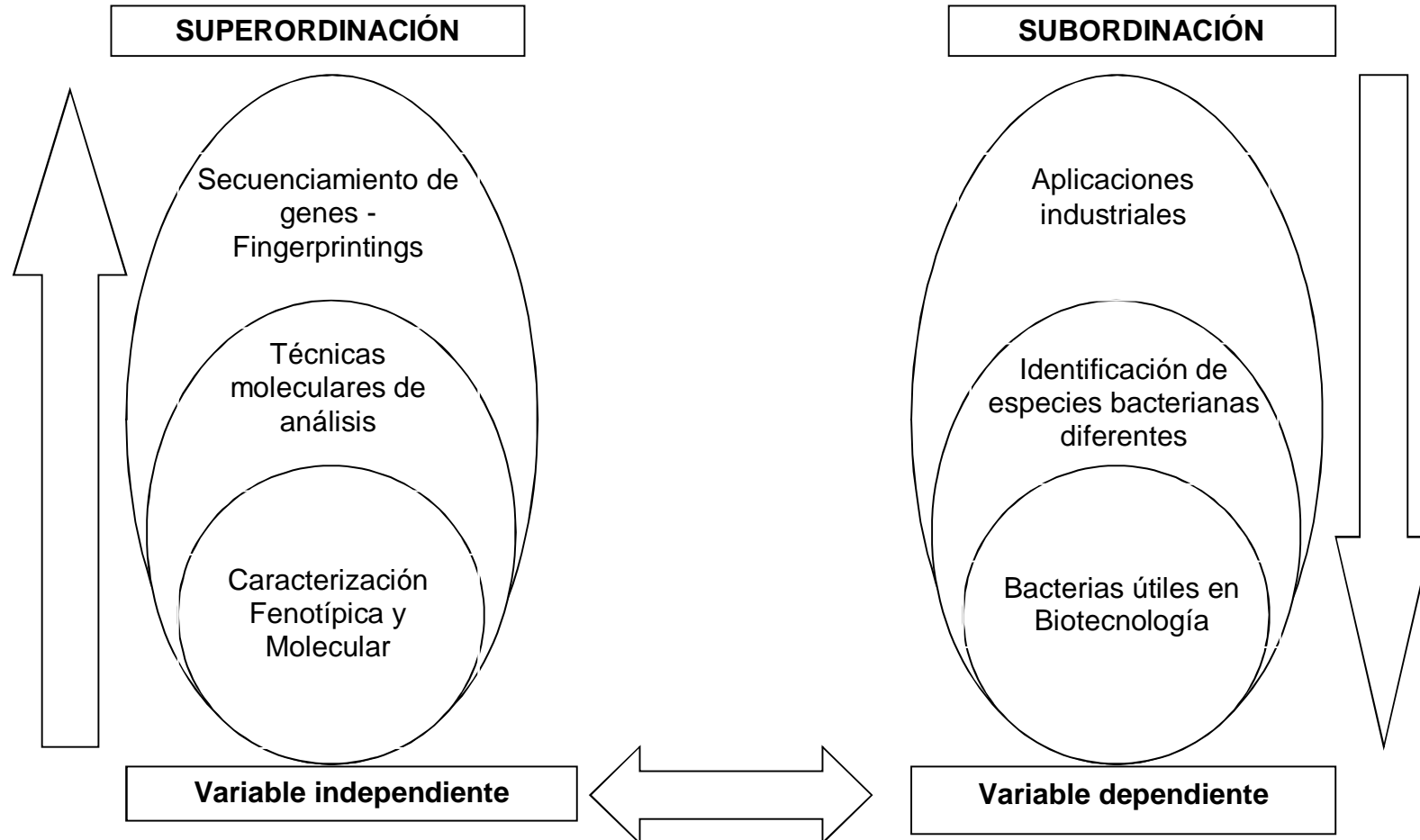


Figura 2. Organizador lógico de variables.

Elaborado por: Lorena Núñez.

2.5. Hipótesis

2.5.1. Hipótesis nula

- Dentro de las bacterias con importancia en biotecnología, no existe diversidad en cada grupo.

2.5.2. Hipótesis alternante

- Dentro de las bacterias con importancia en biotecnología, si existe diversidad en cada grupo.

2.6 Señalamiento de variables de las hipótesis

- Purificación de cepas de bacterias y actinomicetes.
- Caracterización fenotípica.
- Extracción y análisis de ADN.
- Caracterización Molecular
- Obtención de fingerprintings mediante rep – PCR con los primers BOX, REP y ERIC.
- Obtención de dendrogramas.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Enfoque

La presente investigación tiene un enfoque de carácter cuantitativo, debido a que se recogió y analizó datos numéricos sobre las variables en estudio, para determinar su relación.

3.2. Modalidad Básica de la Investigación

La investigación se sustentó en la modalidad experimental ya que se realizó en laboratorios, controlando y manipulando variables.

3.3. Nivel o Tipo de Investigación

El tipo de investigación que se utilizó en esta investigación fue exploratoria, permitió comprender el problema con la utilización de metodología adecuada.

3.4. Población y Muestra

La Tabla A1 (Anexo A) muestra los datos de los ciento veintinueve cultivos de microorganismos recibidos como suspensiones de células o esporas en glicerol al 20% (w/v), del Departamento de Ciencias Biológicas, de la Facultad de Recursos Naturales, de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo ESPOCH.

3.5. Operacionalización de Variables

(Ver página siguiente)

HIPOTESIS	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADORES	INDICES	INSTRUMENTOS
<ul style="list-style-type: none"> Dentro de las bacterias estudiadas no existe diversidad, por lo tanto no se describen nuevas especies 	Dependiente	Descubrimiento de nuevas especies de bacterias útiles en Biotecnología	<p>Biorremediación de sitios contaminados con petróleo.</p> <p>Producción de antibióticos</p> <p>Solubilización de fósforo</p> <p>Resistencia a condiciones extremas</p>	Publicación de bacterias y actinomicetes identificados para cada actividad.	<p>Calculadora</p> <p>Microsoft Excel.</p>
	Independiente	Características fenotípicas de bacterias	Características macroscópicas:	Coloración y morfología de las colonias. Micelio, esporas y producción de pigmento difusible. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0	Microsoft Excel.
			Características microscópicas:	Tinción de GRAM, esporas, cápsulas, tamaño y forma. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0 Tipo de morfología de la cadena de esporas. Tabla de morfología de las cadenas	Microscopio
		Características moleculares	Aislamiento de ADN genómico Cantidad, integridad y pureza del ADN genómico. Amplificación del gen ADNr 16S Secuenciamiento del gen ARNr 16S	Suspensiones de ADN genómico Electroforesis en gel de agarosa PCR. Rep - PCR	<p>Microcentrífuga</p> <p>Equipo de electroforesis</p> <p>Termociclador</p> <p>Software Phydit</p>

3.6. Recolección de Información

3.6.1. Determinación de la Pureza de los Cultivos de Bacterias y Actinomicetes

3.6.1.1. Recuperación, Purificación y Almacenamiento de Microorganismos.

Se recibieron nueve bacterias solubilizadoras de fósforo, veintiséis bacterias con posible capacidad biorremediadora, aisladas de suelos contaminados con petróleo, diecinueve actinomicetes con capacidad para producir antibióticos y setenta y cinco posibles bacterias psicrófilas, aisladas de muestras provenientes de la Antártida y del Chimborazo. De los stocks, se tomaron 25 µl de cada suspensión, los que fueron inoculados en cajas petri que contenían medio de cultivo. Para las bacterias no filamentosas se usó agar nutritivo, mientras que los actinomicetes fueron crecidos en agar extracto de malta y levadura (GYM), y cultivados mediante estría compuesta. Los platos se incubaron a 28°C por 5 días a excepción de las posibles bacterias psicrófilas, las mismas que fueron incubadas a 28°C y 4°C. Aquellos que luego del período de incubación presentaron características de cultivo puro, fueron etiquetados y posteriormente almacenados en tubos plásticos que contenían 1 mililitro de glicerol al 20% (w/v) y finalmente almacenados a -20°C en un congelador, para su preservación a largo plazo. Cultivos que presentaron contaminación, fueron replicados las veces necesarias hasta obtener cultivo puro.

3.6.1.2. Determinación de Bacterias Psicrófilas en las Bacterias de la Antártida y Chimborazo.

De las setenta y cinco bacterias recibidas como suspensiones de células en glicerol al 20% (w/v), para la identificación de bacterias psicrófilas, cincuenta fueron muestras procedentes de la Antártida y veinticinco del Chimborazo. Se tomaron 25 µl de cada suspensión y fueron inoculados en cajas petri que

contenían agar nutritivo y cultivados mediante estría compuesta, por duplicado. Las primeras réplicas se incubaron a 28°C por 5 días y las segundas réplicas se incubaron a 4°C por 5 días, posteriormente se evaluó el crecimiento luego del periodo de incubación (Tabla A2, Anexo A). Con 1 se representó crecimiento positivo, con 0 crecimiento negativo, y con FC ausencia de crecimiento a las dos temperaturas. Finalmente los cultivos recuperados fueron etiquetados y posteriormente almacenados en tubos plásticos que contenían 1 mililitro de glicerol al 20% (w/v) y almacenados a -20°C en un congelador, para su preservación a largo plazo. Aquellas bacterias que crecieron solamente a 4°C fueron consideradas como psicrófilas, mientras que aquellas que crecieron a las dos temperaturas se las ubico como psicrótrofas. Solamente las bacterias psicrófilas fueron tomadas en cuenta para estudios posteriores dentro de la presente investigación.

3.6.2. Caracterización Molecular

3.6.2.1. Extracción de ADN Genómico

Los cultivos puros de bacterias fueron crecidos directamente en cajas tripetri con agar nutritivo, mientras que los actinomicetes, sobre una membrana de celulosa previamente colocada sobre la superficie de agar no esporulante (Anexo D). De esta manera se impidió que el micelio del sustrato se adhiriera al agar, facilitando la transferencia de la biomasa para la extracción del ADN y así evitar que el agar sea un factor que interfiera en el experimento. Las cajas inoculadas se incubaron a 26°C por 4 días y en el caso de las psicrófilas a 4°C por 7 días. Una vez transcurrido éste tiempo, para el caso de todas las bacterias se colocó 400 µl de búfer de extracción (Anexo D) sobre el cultivo crecido en agar nutritivo, con un dispersor pequeño de vidrio se raspó la biomasa, con una micropipeta se colocó la biomasa extraída en un tubo de centrifugación estéril de 1.5 ml evitando el agar. Luego las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad (14000 rpm) por 15 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se colocó 400 µl de búfer de

extracción junto con aproximadamente 50 µl de esferas de vidrio (106 µm de diámetro, lavadas en ácido). Luego los tubos fueron batidos utilizando un vórtex a máxima velocidad por 2-3 minutos, y centrifugados a máxima velocidad (14000rpm) por 20 minutos. Se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un nuevo tubo estéril de 1.5 ml, tratando de evitar la biomasa y se añadió 200 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1;v/v). Las soluciones fueron mezcladas uniformemente, sin agitar vigorosamente para evitar la fragmentación del ADN presente en la parte acuosa de la solución. Los tubos se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 minutos, y se transfirieron 200 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de centrifugación de 1.5 ml. El ADN precipitó añadiendo 200 µl de etanol (100% frío, v/v), formando fibras blanquecinas. Los tubos con ADN se centrifugaron a máxima velocidad por 20 minutos, y luego de este tiempo se descartó el sobrenadante teniendo cuidado de no perder el ADN precipitado en la base del tubo. El ADN fue lavado con 500 µl de etanol (70%, frío), y centrifugado a máxima velocidad por 15 minutos, descartándose el sobrenadante. Este proceso se realizó 2 veces consecutivas. Los tubos con las muestras de ADN en su base, fueron colocados boca abajo y secados a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas. Finalmente, el ADN fue resuspendido usando 40 µl de búfer TE 1X (Anexo D).

En el caso de los actinomicetes se colocó 400 µl de búfer de extracción junto con aproximadamente 50 µl de esferas de vidrio (106 µm de diámetro, lavadas en ácido), en un tubo de centrifugación estéril de 1.5 ml. Aproximadamente 100 mg de biomasa se rasparon de las membranas y se colocaron en el tubo que contenía el búfer de extracción. Posteriormente las muestras se congelaron a -20°C por 24 horas. Luego, los tubos fueron descongelados a temperatura ambiente y batidos utilizando un vórtex a máxima velocidad por 10 minutos, y centrifugados a máxima velocidad (14000 rpm) por 20 minutos. Se transfirieron 200 µl del sobrenadante a un nuevo tubo estéril de 1.5 ml, tratando de evitar la biomasa y se añadió 200 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Las soluciones fueron mezcladas uniformemente, sin

agitar vigorosamente para evitar la fragmentación del ADN presente en la parte acuosa de la solución. Los tubos se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 minutos, y se transfirió 150 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de centrifugación de 1.5 ml. El ADN precipitó añadiendo 300 µl de etanol (100% frío), formando fibras blanquecinas. El ADN fue lavado y resuspendido, siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó en el caso de las bacterias.

3.6.2.2. Determinación de Cantidad, Integridad y Pureza del ADN Genómico.

La determinación de la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico, se realizó mediante electroforesis de geles de agarosa, visualizados en luz ultravioleta. Primeramente se preparó agarosa (1%, w/v) en búfer 0.5X TBE (Anexo D). La agarosa se fundió mediante el incremento de temperatura usando un reverbero eléctrico. Una vez fundida se añadió 1 µl de 10000X SYBRSafe por cada 10 ml de agarosa líquida y se procedió a agitar hasta que se obtuvo una coloración rosada. Toda la mezcla se vertió en una bandeja para electroforesis de 20 x 20 cm, y se colocó un peine de 40 dientes. Una vez que la agarosa solidificó, se colocó el gel en el tanque de electroforesis, asegurándose que los pozuelos formados se encuentren en el lado en donde se aplica la carga negativa del campo eléctrico. Se mezcló 7 µl de cada muestra con 3 µl de loading buffer (Invitrogen) (Figura C1 (1), Anexo C) y dicha mezcla se colocó en un pozuelo individual. Se utilizó también un marcador molecular de 1000 bp (Invitrogen). Una vez que todas las muestras fueron colocadas en los pozuelos se procedió a correr el gel a 100 V por 30 minutos. Una vez terminada la electroforesis, las bandas de ADN fueron visualizadas con la ayuda de luz ultravioleta de un transiluminador ULTRALUM, y fotografiadas mediante el uso de una cámara fotográfica digital CANON, de 6.2 megapíxeles, del equipo ULTRACAM. Las fotografías fueron transferidas a un computador en el que fueron editadas y grabadas en formato TIFF.

Se determinó que el ADN genómico íntegro fue aquel en el que se observó una banda visible a unos pocos milímetros del inicio del gel. Contaminaciones de carbohidratos o proteínas fueron observadas cuando un anillo blanco se formó en los pozuelos de cargado de las muestras. Finalmente, la cantidad de ADN se consideró como adecuada cuando bandas fueron claramente visibles en los geles.

3.6.2.3. rep-PCR

Las muestras de bacterias y actinomicetes que presentaron suficiente cantidad de ADN genómico, se utilizaron para obtener fingerprintings mediante la técnica molecular de rep-PCR, usando los primer BOX, REP Y ERIC (Tabla 4), en reacciones de PCR individuales para cada grupo de microorganismos estudiados. Aquellas muestras que no dieron positivo para la presencia de ADN no fueron consideradas para el presente estudio.

Tabla 4. Secuencia de primers usados en rep - PCR.

Secuencia Repetitiva	ID Primer	Secuencia (5' a 3')
BOX	BoxA1R1	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG
ERIC	E1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC
	E2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG
REP	Rep 1R1	iiiCGiGCiCATCiGGC
	Rep 21	iCGiCGTATCiGGCCTAC

(Rodríguez, 2004)

La Tabla 5 muestra los volúmenes de cada uno de los reactivos para realizar PCR con el primer BOX.

Tabla 5. Mezcla típica para 25 μ l de reacción de rep-PCR usando el primer BOX.

Ingrediente	Cantidad
Agua destilada	Hasta 25 μ l
10X Taq búfer	2.5 μ l
12.5 mM dNTPs	0.5 μ l
50 mM MgCl ₂	0.75 μ l
20 mM Primer Box	1 μ l
ADN genómico	0.5 μ l ¹
Taq polimerasa	1unidad

(Rodríguez, 2004)

¹ El volumen de ADN genómico añadido a cada tubo fue variable y estuvo en función de la intensidad de la banda de ADN visualizada en los geles de agarosa.

Los ingredientes se mezclaron en función del número de muestras, y se realizó una solución master (master mix). Se colocaron alícuotas de 24.5 μ l, en tubos plásticos de 200 μ l para PCR. Posteriormente, se colocó 0.5 μ l de ADN genómico en cada tubo para así completar los 25 μ l de la reacción. Finalmente los tubos se ubicaron en el termobloque de un termociclador (TECNE, TC412). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una fase que consistió de un ciclo a 95°C por 10 minutos, seguida de una fase estacionaria a 80°C. En ésta etapa se añadió 1 unidad de *Taq* polimerasa por tubo de reacción. Una segunda fase a 95°C por 2 minutos para activar la enzima (proceso recomendado por el fabricante de la *Taq* polimerasa). La tercera fase correspondió al desarrollo de 30 ciclos, cada uno compuesto por una etapa de desnaturalización a 94°C por 2 minutos, una de alineamiento a 47°C por 2 minutos y una etapa final de alargamiento a 70°C por 4 minutos. La fase final se realizó a una temperatura de 70°C por 20 minutos. Una vez concluida la amplificación de los fragmentos mediante PCR, los tubos fueron almacenados a 4°C.

La Tabla 6 muestra los volúmenes de cada uno de los reactivos para realizar PCR con el primer REP.

Tabla 6. Mezcla típica para 25 μ l de reacción de rep-PCR usando el primer REP.

Ingrediente	Cantidad
Agua destilada	Hasta 25 μ l
10X Taq búfer	2.5 μ l
12.5 mM dNTPs	0.5 μ l
50 mM MgCl ₂	0.75 μ l
20 mM Primer Rep 1	0.75 μ l
20 mM Primer Rep 2	0.75 μ l
ADN genómico	0.5 μ l ²
Taq polimerasa	1 unidad

(Rodríguez, 2004)

² Igual que en el caso de BOX

La solución master (master mix) y la preparación de los tubos de 200 μ l, se realizó igual que en el caso de BOX. Finalmente los tubos se ubicaron en el termobloque de un termociclador (TECNE, TC412). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una fase que consistió de un ciclo a 95°C por 10 minutos, seguida de una fase estacionaria a 80°C. En ésta etapa se añadió 1 unidad de *Taq* polimerasa por tubo de reacción. Una segunda fase a 95°C por 2 minutos para activar la enzima (proceso recomendado por el fabricante de la *Taq* polimerasa). La tercera fase correspondió al desarrollo de 30 ciclos, cada uno compuesto por una etapa de desnaturalización a 90°C por 30 segundos, una de alineamiento a 40°C por 1 minuto y una etapa final de alargamiento a 65°C por 8 minutos. La fase final se realizó a una temperatura de 72°C por 10 minutos. Una vez concluida la amplificación de los fragmentos mediante PCR, los tubos fueron almacenados a 4°C.

La Tabla 7 muestra los volúmenes de cada uno de los reactivos para realizar PCR con el primer ERIC.

Tabla 7. Mezcla típica para 25 μ l de reacción de rep-PCR usando el primer ERIC.

Ingrediente	Cantidad
Agua destilada	Hasta 25 μ l
10X Taq búfer	2.5 μ l
12.5 mM dNTPs	0.5 μ l
50 mM MgCl ₂	0.75 μ l
20 mM Primer Eric 1	0.75 μ l
20 mM Primer Eric 2	0.75 μ l
ADN genómico	0.5 μ l ³
Taq polimerasa	1 unidad

(Rodríguez, 2004)

³ Igual que en el caso de BOX

La solución master (master mix) y la preparación de los tubos de 200 μ l, se realizó igual que en el caso de BOX. Finalmente los tubos se ubicaron en el termobloque de un termociclador (TECNE, TC412). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una fase que consistió de un ciclo a 94°C por 15 minutos, seguida de una fase estacionaria a 80°C. En ésta etapa se añadió 1 unidad de *Taq* polimerasa por tubo de reacción. Una segunda fase a 94°C por 2 minutos para activar la enzima. La tercera fase correspondió al desarrollo de 30 ciclos, cada uno compuesto por una etapa de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, una de alineamiento a 45°C por 1 minuto y una etapa final de alargamiento a 65°C por 8 minutos. La fase final se realizó a una temperatura de 72°C por 10 minutos. Una vez concluida la amplificación de los fragmentos mediante PCR, los tubos fueron almacenados a 4°C.

Los patrones de fingerprinting se consiguieron mediante la separación de los fragmentos obtenidos por PCR, usando un gel de agarosa (1.25%, w/v), con un peine de 20 dientes. Se mezcló 15 μ l de cada muestra con 5 μ l de loading buffer (Invitrogen), se usó también un marcador molecular de 100 bp (Figura C1 (2), Anexo C). La electroforesis se realizó a 70 V durante cuatro horas. Una vez terminada la electroforesis, las bandas de ADN se visualizaron con la ayuda de luz ultravioleta de un transiluminador ULTRALUM, y fueron fotografiadas mediante el uso de una cámara fotográfica digital CANON, de 6.2 megapíxeles, del equipo ULTRACAM. Las fotografías se transfirieron a un computador en donde fueron editadas y grabadas en formato TIFF.

3.6.3. Caracterización Fenotípica

3.6.3.1. Caracterización Macroscópica

Los cultivos puros obtenidos fueron caracterizados de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias. La Figura 3, muestra las diferentes morfologías consideradas. La caracterización para las bacterias se realizó en cultivos previamente crecidos en agar nutritivo e incubados a 28°C y a 4°C en el caso de las bacterias psicrófilas y en medio GYM (Anexo D) a 28°C para los actinomicetes, en estos últimos también se determinó la presencia o ausencia de micelio aéreo.

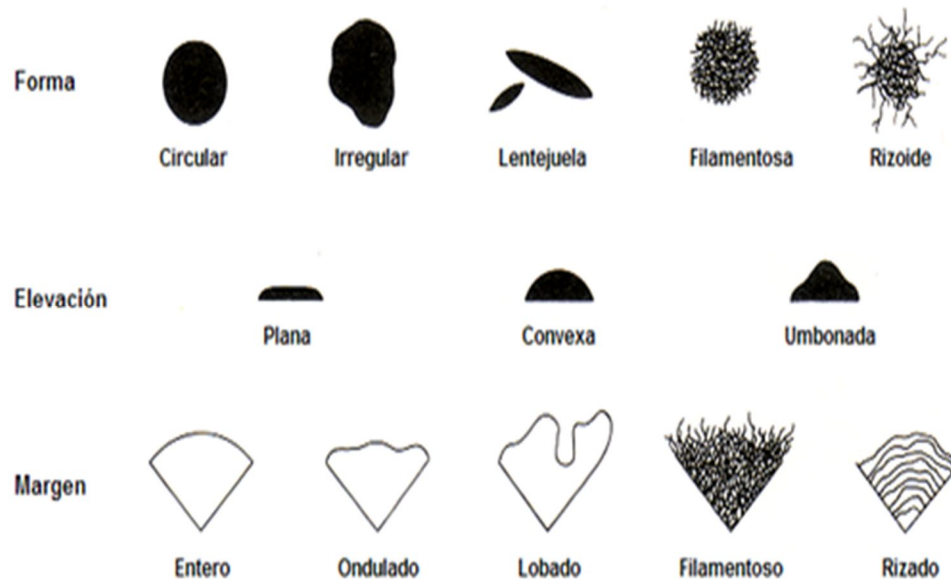


Figura 3. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma elevación y margen.

3.6.3.2. Caracterización Microscópica de Bacterias

De los cultivos puros de bacterias se prepararon frotis para ser observados bajo el microscopio. Los frotis se prepararon colocando una gota de agua destilada en el centro de un portaobjetos, luego con un asa de transferencia estéril se transfirió una pequeña cantidad de cultivo y se mezcló con el agua destilada. El portaobjetos se secó al ambiente y finalmente se fijaron al calor con la ayuda de un mechero.

3.6.3.3. Tinción de Gram

El frotis de cada bacteria fue teñido con violeta de cristal por 1 minuto, y se procedió a lavar con agua destilada. Posteriormente se cubrió con solución de lugol por 1 minuto y nuevamente se lavó con agua. Seguidamente se cubrió el frotis con alcohol yodado por 5 minutos y se procedió a lavar con agua. Finalmente se colocó safranina por 5 minutos y se lavó con agua destilada. Los portaobjetos teñidos se secaron al ambiente para luego ser observados bajo el microscopio con el lente de inmersión 100X. Aquellas

células teñidas de morado fueron identificadas como Gram positivas, mientras que aquellas que presentaron color rojo fueron consideradas como Gram negativas.

3.6.3.4. Tinción de Cápsulas

Se prepararon frotis que fueron teñidos con cristal violeta por 2 minutos, luego se lavó el exceso del colorante con una solución de sulfato de cobre al 20% (w/v), y finalmente con agua destilada. Cada frotis se secó al ambiente para proceder a observarlos bajo el microscopio con el lente de inmersión 100X. La presencia de cápsulas se determinó por la presencia de una capa transparente que rodeaba a la célula bacteriana, que se encontraba teñida de morado.

3.6.3.5. Tinción de Endosporas

Se preparó frotis de cada bacteria y se fijó al calor sobre la llama de un mechero, se colocaron los portaobjetos sobre una rejilla con agua hirviendo y fueron teñidos con verde malaquita por 10 minutos, evitando que se evapore el colorante, luego se lavaron con agua destilada y se añadió safranina por 3 minutos para dar contraste, luego se lavaron los portaobjetos con agua destilada y fueron secados a temperatura ambiente, las placas se observaron al microscopio con el lente de mayor aumento. Se determinó la presencia de endosporas al notar esporas teñidas de verde, en el centro de la célula bacteriana teñida de color rojo, o en partes cercanas al extremo de la misma.

3.6.3.6. Caracterización Microscópica de Actinomicetes

En el caso de los actinomicetes se determinó la morfología de las cadenas de esporas en los cultivos que presentaron micelio aéreo. Para ello se colocó un cubreobjetos estéril sobre el cultivo con la ayuda de una pinza estéril. Luego el cubreobjetos con el micelio adherido se colocó en un

portaobjetos de manera que el micelio quede en contacto con el portaobjetos. Se determinó el tipo de estructura (Tabla 8) usando un microscopio con el lente de inmersión 100X.

Tabla 8. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas.

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

(Philips, 1994)

3.7. Procesamiento y Análisis

3.7.1. Dereplicación de Cultivos de Microbios Mediante rep - PCR

Luego de la realización de rep – PCR utilizando los primer BOX, REP y ERIC para cada grupo de microorganismos, se procedió a estandarizar las fotografías en blanco y negro, obtenidas con electroforesis en geles de agarosa, es decir, que se invirtieron y balancearon los colores para una mejor visualización y todas se recortaron a una altura uniforme. Cada

fingerprinting fue etiquetado, de acuerdo a la bacteria a la que correspondía. Con *M* se representó al marcador loading buffer (Invitrogen) utilizado, con (-) al control negativo y con *pr* a pruebas no vinculadas a esta investigación.

Posteriormente se analizaron las fotografías, y para ello se construyó un patrón de bandas con 60 posiciones, el cual fue superpuesto a cada fingerprinting obtenido (Figura C1 (3), Anexo C), de esta manera se determinó la presencia o ausencia de bandas de ADN, en función del patrón. Este proceso se realizó en las tres pruebas de PCR. Aquellos microorganismos que presentaron menos de cinco bandas, fueron descartados para los análisis.

Mediante la comparación de bandas se elaboró una matriz de código binario, representando con 1 la presencia de la banda en una posición determinada y con 0 la ausencia de la misma. La presencia se determinó al observar una coincidencia entre la banda y la posición correspondiente del patrón. Las matrices fueron elaboradas de forma individual según el primer utilizado en la dereplicación. También se elaboró una matriz completa en la cual se recopiló la información de los tres mecanismos de rep – PCR, pero en el caso de aquellos microorganismos que fueron eliminados de uno o dos procesos de rep – PCR, se colocó *nd* en las posiciones de las bandas de ADN, para no afectar los análisis.

Las matrices fueron transformadas para su análisis en el programa PFE (Programmer's File Editor). Posteriormente la información fue procesada con el software estadístico NTSys, en el cual se calcularon los porcentajes de similitud entre cada uno de los grupos de bacterias y actinomicetes estudiados, para ello se utilizó el coeficiente de simple coincidencia S_{SM} . Los porcentajes calculados fueron utilizados para construir dendrogramas, mediante el uso del algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) del mismo programa. Luego de haber obtenido los dendrogramas para cada grupo de bacterias y actinomicetes, se identificó los grupos especies basados en un coeficiente de similitud del 80%.

3.7.2. Caracterización fenotípica

Con los resultados obtenidos en las pruebas fenotípicas de color, forma, borde y elevación de las colonias en el caso de las bacterias, así como las características del micelio aéreo y de sustrato y de las cadenas de esporas en el caso de los actinomicetes, se construyó una matriz de datos en código binario, representando con 1 la presencia de la característica y con 0 la ausencia de la misma.

3.7.3. Análisis completo

Una vez realizadas las matrices de código binario tanto de dereplicación usando rep – PCR con los tres primers (BOX, REP y ERIC) y de la caracterización fenotípica, se juntaron todos los datos en una sola matriz, la cual fue procesada y analizada de la misma manera que en la dereplicación de Cultivos de Microbios Mediante rep-PCR. Aquellos que presentaron un 80% de similitud fueron ubicados en una misma taxonomía. Mientras que aquellos que presentaron un porcentaje menor se ubicaron en taxonomías diferentes.

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de los Resultados.

4.1.1. Determinación de Bacterias Psicrófilas

Del total de setenta y cinco bacterias utilizadas, solo siete se identificaron como bacterias psicrófilas, correspondiendo a los códigos DCB-A 2188, DCB-A 2189, DCB-A 2196, DCB-A 2198, DCB-A 2210, DCB-A 2215 y DCB-A 2217, todas procedentes de la colección de la Antártida. El resto de bacterias fueron descartadas por ser consideradas bacterias psicrótrofas o por ausencia de crecimiento.

4.1.2. Caracterización Molecular

La caracterización molecular se realizó solamente con cincuenta y seis microorganismos. No se continuó con toda la colección recibida, debido a que, de las bacterias provenientes de la Antártida y Chimborazo, sólo se continuó con las psicrófilas, así mismo en el caso de las bacterias con posible capacidad biorremediadora, solo se usaron aquellas que crecieron y presentaron características de cultivo puro, luego de varias repeticiones. La caracterización molecular se realizó con nueve bacterias solubilizadoras de fósforo, siete bacterias psicrófilas, veintiún bacterias con posible capacidad biorremediadora y diecinueve actinomicetes con capacidad para producir antibióticos (Tabla A3, Anexo A).

4.1.2.1. Determinación de Cantidad, Integridad y Pureza del ADN Genómico.

Luego de correr los geles de agarosa, mediante electroforesis, se determinó que de los cincuenta y seis microorganismos, solamente cinco no

presentaron bandas de ADN genómico y por lo tanto fueron excluidos de los estudios posteriores. Estas correspondieron al grupo de bacterias con posible capacidad biorremediadora, cuyos códigos son AX13, AX15, AX18, AX40 y AX67. Las fotografías de los geles y su identificación se muestran en las Figuras C2 y C3 (Anexo C).

En los dos geles es posible observar, una banda bien definida mucho antes del marcador de 12216 nt. Eso demuestra que el ADN fue fragmentado a un tamaño adecuado para PCR, así mismo se puede observar una gran cantidad de ARN en las muestras de ADN, obtenidas de los actinomicetes (Figura C2, Anexo C), esa tendencia no se observa en el resto de microorganismos (Figura C3, Anexo C).

En lo referente a la pureza, algunas muestras presentaron contaminaciones de carbohidratos y proteínas, ya que se pudo visualizar zonas oscuras en los bordes de los pozuelos, donde se había colocado la muestra para analizar. Si bien es cierto que las bandas fueron uniformes, la cantidad de ADN fue variable debido a la intensidad de las mismas, mientras más oscura la banda, mayor cantidad de ADN, y por lo tanto en bandas más débiles, menor cantidad. Por ello para obtener los fingerprintings mediante PCR, se decidió colocar volúmenes de ADN genómico de acuerdo a la intensidad de la banda, tal como se muestra en la Tabla A4 (Anexo A).

4.1.2.2. rep-PCR

En las Figuras C4, C5, C6 y C7 (Anexo C), se observan los patrones de fingerprinting que se obtuvieron mediante PCR, con el primer BOX. De la Figura C4 se descartaron las bacterias SP 1659 y DCB-A 2198, de la Figura C5 la bacteria AX 50 y de la Figura C7, los actinomicetes DCB-A 225, DCB-A 274, DCB-A 414 y DCB-A 497.

En las Figuras C8, C9 y C10 (Anexo C), se observan los fingerprintings obtenidos con el primer REP. De la Figura C8 se descartó la SP 1659, de la

Figura C9, las bacterias AX 14 y AX 50 y de la figura C10 se descartaron todos los actinomicetes.

En las Figuras C11, C12 y C13 (Anexo C), se observan los fingerprintings obtenidos con el primer ERIC. De la Figura C11, se descartaron las bacterias SP 1659, SP 1661a, SP 1661c, SP 1647 y SP 1648, mientras que de la Figura C12, la bacteria AX 50, finalmente de la Figura C13, el actinomicetes DCB-A 464.

En resumen, las bacterias que fueron descartadas de los tres análisis por no presentar bandas fueron AX 50 y SP 1659. También fueron descartados de los tres análisis los actinomicetes DCB-A 225, DCB-A 274, DCB-A 414 y DCB-A 497, por no presentar un buen bandeo con el primer REP.

4.1.2.3. Taxonomía Numérica de Datos Genotípicos y Fenotípicos

Bacterias Solubilizadoras de Fósforo

Las Tablas A5, A6, A7, A8 y A9 (Anexo A), muestran las matrices de código binario de BOX, REP, ERIC, matriz completa de datos genotípicos y matriz de datos fenotípicos.

Las Figuras B1, B2 y B3 (Anexo B), muestran los dendrogramas correspondientes a los fingerprintings obtenidos con BOX, REP y ERIC. El dendrograma completo se observa en la Figura B4 (Anexo B), donde claramente se puede observar un grupo formado por tres miembros, al realizar un corte al 80%, el resto de bacterias forman grupos-especie individuales (Tabla A10, Anexo A). Al revisar el dendrograma de los datos completos, incluyendo características fenotípicas (Figura B5, Anexo B), se observa claramente que del grupo de tres individuos obtenido de datos genotípicos, la bacteria SP 1661c fue separada y solamente SP 1647 y SP 1648 continuaron en el mismo grupo-especie, al compartir una similaridad mayor del 80%, estos resultados soportan la posibilidad de tener siete posibles especies diferentes de bacterias solubilizadoras de fósforo (Tabla

A11, Anexo A). Esto muestra una reducción del 12,5%, respecto al número inicial de bacterias caracterizadas.

Bacterias Psicrófilas

Las Tablas A12, A13, A14, A15 y A16 (Anexo A), muestran las matrices de código binario de BOX, REP, ERIC, matriz completa de datos genotípicos y matriz de datos fenotípicos.

Las Figuras B6, B7 y B8 (Anexo B), muestran los dendrogramas correspondientes a los fingerprintings obtenidos con BOX, REP y ERIC. El dendrograma completo se observa en la Figura B9 (Anexo B), donde claramente se puede observar que todos los miembros del grupo forman grupos-especie individuales, al realizar un corte al 80% (Tabla A17, Anexo A). Al revisar el dendrograma completo, incluyendo características fenotípicas (Figura B10, Anexo B), se observa que los grupos-especie obtenidos de datos genotípicos se mantienen, a una similaridad del 80%, estos resultados soportan la posibilidad de que todas las bacterias del grupo corresponden a posibles especies diferentes de bacterias psicrófilas (Tabla A18, Anexo A).

Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de suelos contaminados con petróleo.

Las Tablas A19, A20, A21, A22 y A23 (Anexo A), muestran las matrices de código binario de BOX, REP, ERIC, matriz completa de datos genotípicos y matriz de datos fenotípicos.

En las Figuras B11, B12 y B13 (Anexo B), se muestra los dendrogramas correspondientes a los fingerprintings obtenidos con BOX, REP y ERIC. El dendrograma completo se observa en la Figura B14 (Anexo B), donde claramente se puede observar la formación de un grupo-especie con tres miembros y otro grupo-especie con cuatro miembros, al realizar un corte al

80%, el resto de bacterias forman grupos-especie individuales (Tabla A24, Anexo A). Al revisar el dendrograma completo, incluyendo características fenotípicas (Figura B15, Anexo B), se observa que del grupo de tres miembros obtenido de datos genotípicos, la bacteria AX19 fue separada y solamente AX53 y AX76 continuaron en el mismo grupo-especie, al compartir una similaridad mayor del 80%, el resto de grupos-especie obtenidos se mantuvieron al mismo porcentaje de similaridad, estos resultados soportan la posibilidad de tener once posibles nuevas especies de bacterias con posible capacidad biorremediadora (Tabla A25, Anexo A). Esto muestra una reducción del 26,6%, respecto al número inicial de bacterias caracterizadas.

Actinomicetes Productores de Antibióticos

Las Tablas A26, A27, A28 y A29 (Anexo A), muestran las matrices de código binario de BOX, ERIC, matriz completa de datos genotípicos y matriz de datos fenotípicos.

En las Figuras B16 y B17 (Anexo B), se muestra los dendrogramas correspondientes a los fingerprintings obtenidos con BOX y ERIC. El dendrograma completo se observa en la Figura B18 (Anexo B), donde se observa la formación de dos grupos-especie con dos miembros cada uno, al realizar un corte al 80%, el resto de actinomicetes forman grupos-especie individuales (Tabla A30, Anexo A). Al revisar el dendrograma completo, que incluye características fenotípicas (Figura B19, Anexo B), se observa que uno de los grupos con dos miembros, formado con los actinomicetes DBA-A 405 y DCB-A 460 obtenido de datos genotípicos, fue separado al 80% de similaridad, el resto de grupos-especie obtenidos se mantuvo, estos resultados soportan la posibilidad de tener catorce posibles nuevas especies de actinomicetes con capacidad para producir antibióticos (Tabla A31, Anexo A). Esto muestra una reducción del 6,6%, respecto al número inicial de actinomicetes caracterizados.

4.2. Interpretación de Datos

4.2.1. Determinación de la Pureza de los Cultivos de Microorganismos

Cabe destacar que los microorganismos utilizados en el presente estudio, proceden de investigaciones previas, en las cuales se determinó su actividad biotecnológica, es decir, que de dichas investigaciones se seleccionaron a los mejores representantes de bacterias solubilizadoras de fósforo (Guzman, 2011), bacterias con posible capacidad biorremediadora (Vizueté, 2011) y actinomicetes productores de antibióticos (Vinueza, 2010), en el cuanto a las bacterias psicrófilas, estas se determinaron mediante evaluaciones de temperaturas.

Del total de ciento veintinueve cultivos microbianos recibidos inicialmente para la investigación, no se logró recuperar todos los microorganismos, esto debido a factores como alto grado de contaminación o por falta de crecimiento. El problema de la contaminación se presentó principalmente en el grupo de las bacterias con posible capacidad biorremediadora. Esto pudo ocurrir debido a que al momento de ser almacenados o transportados en investigaciones previas, posiblemente sufrieron contaminaciones, las cuales se evidenciaron al tratar de recuperarlos en este estudio. El problema de la ausencia de crecimiento, se observó en la determinación de bacterias psicrófilas. Esto pudo deberse, a que las células posiblemente perdieron viabilidad, por varias causas como: el glicerol no fue un crioprotector adecuado para todas las bacterias de este grupo, se formaron agujas de agua que rompieron las células, o se produjo un estrés osmótico, que disminuyó el agua a niveles que provocaron la muerte celular (Morales *et al.*, 2003).

4.2.2. Caracterización Genotípica y Fenotípica

El ADN obtenido de cada grupo de bacterias y actinomicetes, no presentó problemas para su extracción, logrado obtener en la mayoría de ellos la banda de ADN deseada. Sin embargo, se observó la presencia de

carbohidratos, proteínas y ARN en los pozuelos donde se adicionaron las muestras, esto indica que durante el proceso de extracción no se separó completamente el ADN de la biomasa. En cuanto a las bandas de ADN obtenidas, estas no fueron uniformes en todos los microorganismos, ya que algunos presentaron bandas muy marcadas y otros en cambio bandas débiles, notándose de esta manera diferencias en la concentración de ADN genómico. Por este motivo fue necesario variar las concentraciones para las pruebas de PCR, en función de cada microorganismo.

En las pruebas de derreplicación mediante PCR, ciertos microorganismos no presentaron un bandeo adecuado, por lo cual fueron eliminados de algunos análisis, estas pruebas pudieron verse afectadas por la presencia de proteínas, carbohidratos y ARN en la muestra de ADN genómico añadido, o también porque las secuencias de los primers utilizados no se encontraban presentes en el ADN molde y por lo tanto no se pudieron realizar las copias de los fragmentos. Las temperaturas de las diferentes fases de PCR también juegan un papel esencial, en especial la de la fase de alineamiento, por lo tanto aquellos microorganismos que no presentaron más de cuatro bandas, podrían necesitar una variación de las condiciones de reacción, para mejorar los fingerprintings, o se debería realizar una nueva extracción de ADN genómico, con mejor calidad y sin presencia de biomasa. Se debe tener muy en cuenta que PCR es una prueba extremadamente sensible, en la que se debe considerar y controlar muchos aspectos, para un buen resultado (Eguiarte, *et al.*, 2007).

En cuanto a la caracterización fenotípica, a pesar de que las pruebas realizadas fueron pocas, aportaron datos importantes al estudio. Sin embargo para obtener una mayor consistencia en los resultados, se debería realizar un mayor número de pruebas morfológicas (flagelos, cuerpos de inclusión, dimensiones), fisiológicas (temperatura, pH, concentración de sales) y bioquímicas (fuentes de carbono y nitrógeno, resistencia a antibióticos, enzimas), esto permitiría tener información más veraz y real que contribuya a la definición de las taxas (Vandame *et al.*, 1996).

4.2.3. Diversidad Biológica de los Grupos Bacterianos

Los dendrogramas con datos genotípicos y los que incluían datos fenotípicos, permitieron conocer los grupos-especie formados. La inclusión de las características fenotípicas, dio mayor robustez a los resultados, es así que las bacterias psicrófilas mantuvieron los mismos grupos-especie formados tanto con datos genotípicos, como al incluir los fenotípicos, a un 80% de similitud. En el caso de las bacterias solubilizadoras de fósforo, bacterias con posible capacidad biorremediadora y actinomicetes productores de antibióticos, los grupos-especie se definieron de mejor manera al considerar de una similitud del 80%. En los tres casos el número de grupos aumentó a este porcentaje.

La diversidad de cada grupo fue determinada, de tal manera, que existieron reducciones respecto al número inicial de bacterias caracterizadas. En las bacterias solubilizadoras de fósforo, hubo una reducción del 12,5%, en las bacterias biorremediadoras, existió una reducción del 26,6%, y en los actinomicetes una reducción del 6,6%. En las bacterias psicrófilas, no existió reducción, ya que todas las bacterias formaron grupos-especie individuales.

Al final del estudio, de los cuarenta y cinco microorganismos, se obtuvo treinta y nueve grupos-especie. Si consideramos que el 10% de estos corresponden a posibles nuevas especies, se tendría que cuatro bacterias, con aplicaciones biotecnológicas, posiblemente aún no han sido descritas.

4.2.4. Discusión General del Trabajo Investigativo

El presente trabajo investigativo trató de aportar datos importantes para la identificación y descubrimiento de especies bacterianas diferentes, con importancia en diferentes campos biotecnológicos como, solubilización de fósforo, resistencia al frío, posible capacidad biorremediadora de suelos contaminados con petróleo y producción de antibióticos. En investigaciones previas se definieron los grupos bacterianos para este trabajo, con lo cual se

está dando continuidad a investigaciones de gran trascendencia e importancia industrial y biotecnológica para el Ecuador.

La aplicación de pruebas fenotípicas y principalmente moleculares con ADN bacteriano, utilizando la derreplicación por medio de rep-PCR, mostró ser una técnica bastante adecuada para la caracterización de varios grupos de microorganismos, ya que con los datos aquí obtenidos se pudo conocer cuáles son los grupos-especie diferentes, para cada grupo de bacterias. Es muy probable que dentro de estos grupos existan individuos nuevos, esperando ser analizados y descritos taxonómicamente.

El alto número de grupos-especie obtenidos, evidencia una alta diversidad biológica presente en todos los grupos de microorganismos, y probablemente muchos de ellos corresponden a especies aún no descritas, este hecho tendría mayor relevancia en las bacterias psicrófilas, ya que todas son diferentes al 80% de similaridad, y además provienen de ambientes extremos, lo cual indicaría la posibilidad de que estas presenten vías metabólicas diferentes, desarrolladas a partir de su adaptación a diversas condiciones de estrés biológicos, como bajas temperaturas.

Es necesario recalcar la importancia de este tipo de estudios, debido a que sirven como base para aportar con información hacia el desarrollo de posibles técnicas para identificar microorganismos y de esta manera reducir la utilización de recursos, al descartar aquellos que sean similares y centrarse únicamente en los de mayor prioridad para estudios posteriores, como la identificación molecular con el secuenciamiento de ARN ribosomal 16S.

Finalmente, la posibilidad de descubrir nuevos microorganismos, abre muchas puertas hacia el desarrollo biotecnológico del país, ya que no solo se está descubriendo la biodiversidad microbiológica presente en las diferentes regiones y climas, sino que también se está aportando al avance

científico en el descubrimiento y desarrollo de aplicaciones biotecnológicas y nuevas vías metabólicas que sean amigables con la naturaleza.

4.3. Verificación de hipótesis

4.3.1. Hipótesis nula

- Dentro de las bacterias con importancia en biotecnología, no existe diversidad en cada grupo.

4.3.2. Hipótesis alternante

- Dentro de las bacterias con importancia en biotecnología, si existe diversidad en cada grupo.

Luego de analizar los resultados, de características genotípicas y fenotípicas de los grupos de microorganismos estudiados, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternante, afirmando que todos los grupos presentan alta diversidad biológica, ya que el número de grupos-especie formados indica que posiblemente existe más de una especie nueva en cada caso.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Cuarenta y cinco bacterias, fueron utilizadas para determinar la diversidad existente entre ellas, distribuidas en ocho fueron bacterias solubilizadoras de fósforo, siete bacterias psicrófilas, quince bacterias con posible capacidad biorremediadora y quince actinomicetes productores de antibióticos.
- Once bacterias fueron descartadas de los análisis, cinco de ellos debido a la una mala calidad del ADN y seis debido a un inadecuado bandeado en la derreplicación mediante rep – PCR.
- Del análisis polifásico de datos genotípicos y fenotípicos para cada grupo, se obtuvo que, para las bacterias solubilizadoras de fósforo probablemente existen siete grupos-especie, para las bacterias psicrófilas siete grupos-especie, para las bacterias con posible capacidad biorremediadora once grupos-especie y para los actinomicetes productores de antibióticos catorce grupos-especie.
- Los datos genotípicos y fenotípicos evidenciaron coherencia entre sí, obteniéndose mayor robustez en los dendrogramas obtenidos del análisis de bandas de los fingerprintings.
- La diversidad encontrada en cada grupo fue increíblemente alta al 80% de similaridad.

5.2. Recomendaciones

- Realizar un mayor número de pruebas fenotípicas, para una mejor caracterización y correlación con los datos moleculares, lo cual permitirá tener información más real y veraz.
- Determinar la secuencia del ARN ribosomal 16S, de los microorganismos identificados como diferentes en este estudio, con el fin de caracterizarlos taxonómicamente.
- Comparar las secuencias del ARN ribosomal 16S de las cepas con los datos del GENBANK, para determinar si corresponden a especies aun no descritas.
- Identificar la naturaleza química de los metabolitos producidos por cada cepa, y aplicarlos a nivel industrial en varios campos biotecnológicos como solubilización de fósforo, resistencia a bajas temperaturas, biorremediación y producción de antibióticos.

CAPÍTULO VI PROPUESTA

6.1. Datos Informativos

6.1.1. Título

Identificación de la similaridad entre microorganismos útiles en biotecnología, mediante caracterizaciones fenotípicas y genotípicas.

6.1.2. Instituciones Ejecutoras

Universidad Técnica de Ambato – Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

6.1.3. Beneficiarios

Universidad Técnica de Ambato

Empresas y organismos estatales relacionados a la aplicación de bacterias en diversos campos biotecnológicos.

6.1.4. Ubicación

UTA. Avda. Los Chasquis, entre Río Guayllabamba y Río Payamino. Ambato.

6.1.5. Tiempo Estimado para la Ejecución

Seis meses

6.1.6. Equipo Técnico Responsable

Dr. Carlos Rodríguez Ph.D

Lorena Núñez

6.2. Antecedentes de la Propuesta

La caracterización es un proceso que permite identificar si los microorganismos en estudio se encuentran cercanamente relacionados o si son microorganismos totalmente diferentes. Se basa en el estudio de características fenotípicas, moleculares, o relacionando las dos a la vez. La presente propuesta se basa en la investigación "*Caracterización Fenotípica y Molecular de Bacterias Útiles en Biotecnología*", en la cual se realizaron varias pruebas moleculares por rep - PCR y también ciertos estudios fenotípicos, demostrando que la aplicación de las dos permite identificar claramente la cercanía de microorganismos por medio de la obtención de fingerprintings y dendrogramas. Mediante la caracterización molecular, se pueden encontrar posibles nuevas especies que presenten grandes beneficios en diferentes campos de la biotecnología. La investigación antes mencionada demostró que la mayoría de los grupos de microorganismos estudiados correspondían a grupos totalmente diferentes, lo cual demuestra la gran diversidad microbiana existente en el Ecuador.

6.3. Justificación

La investigación "*Caracterización Fenotípica y Molecular de Bacterias Útiles en Biotecnología*", demostró que es posible identificar bacterias y actinomicetes con utilidad en solubilización de fósforo, resistencia al frío, biorremediación y producción de antibióticos, sin presentar mayores problemas, es por ello, que la metodología que fue utilizada, también puede ser aplicada para otros grupos de microorganismos con actividad biotecnológica como producción de enzimas, vitaminas o reducción de metales pesados, garantizando la obtención de resultados confiables, que

permitan identificar similitudes y también posibles especies que aún no han sido descritas.

6.4 Objetivos

6.4.1. Objetivo General

- Identificar similitudes entre microorganismos útiles en biotecnología.

6.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar las características fenotípicas de los microorganismos en estudio.
- Caracterizar molecularmente los cultivos utilizando rep – PCR.
- Identificar posibles nuevas especies de microorganismos basándose en un 80% de similitud.

6.5. Análisis de Factibilidad

El estudio “Derreplicación molecular de grupos bacterianos con actividad preliminar demostrada en producción de enzimas, vitaminas y reducción de metales pesados” es factible, ya que se basa en los resultados alcanzados con la investigación “*Caracterización Fenotípica y Molecular de Bacterias Útiles en Biotecnología*”, con lo cual se garantiza el éxito de la propuesta por medio del cumplimiento de los objetivos planteados y mediante el seguimiento de la metodología descrita. Esto permitirá seguir descubriendo posibles nuevas especies, para aplicarlas en nuevas investigaciones y reducir su costo, gracias a la disminución considerable de microorganismos similares entre sí.

6.6. Fundamentación

La investigación “*Caracterización Fenotípica y Molecular de Bacterias Útiles en Biotecnología*”, es la fundamentación científica que permite la formulación de esta propuesta.

6.7. Metodología – Modelo Operativo

6.7.1. Caracterización Molecular

6.7.1.1. Extracción de ADN Genómico

Los cultivos puros de bacterias serán crecidos directamente en cajas tripetri que contengan agar nutritivo, mientras que los actinomicetes sobre una membrana de celulosa previamente colocada sobre la superficie de agar no esporulante. De esta manera se impedirá que el micelio del sustrato se adhiera al agar, facilitando la transferencia de la biomasa para la extracción del ADN. Las cajas inoculadas se incubarán a 26°C por 4 días. Una vez transcurrido éste tiempo, para el caso de todas las bacterias se colocará 1000 µl de búfer de extracción sobre el cultivo crecido en agar nutritivo, con un dispersor pequeño de vidrio se raspará la biomasa, con una micropipeta se colocará la biomasa extraída en un tubo de centrifugación estéril de 1.5 ml evitando el agar. Luego las muestras serán centrifugadas a máxima velocidad (14000 rpm) por 15 minutos. Posteriormente se extraerá el sobrenadante y se colocará 400 µl de búfer de extracción junto con aproximadamente 50µl de esferas de vidrio (106µm de diámetro, lavadas en ácido) en el tubo que contiene la biomasa. Luego los tubos serán batidos utilizando un vórtex a máxima velocidad por 2-3 minutos, y centrifugados a máxima velocidad (14000rpm) por 20 minutos. Se transferirán 300 µl del sobrenadante a un nuevo tubo estéril de 1.5 ml, tratando de evitar la biomasa y se añadirá 200µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Las soluciones serán mezcladas uniformemente, sin agitar vigorosamente para evitar la fragmentación del ADN presente en la parte

acuosa de la solución. Los tubos se centrifugarán a máxima velocidad durante 15 minutos, y serán transferidos 200 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de centrifugación de 1.5 ml. El ADN precipitará añadiendo 200 µl de etanol (100% frío), formando fibras blanquecinas. Los tubos con ADN se centrifugarán a máxima velocidad por 20 minutos, y luego de este tiempo se descartará el sobrenadante teniendo cuidado de no perder el ADN precipitado en la base del tubo. El ADN será lavado con 500µl de etanol (70%, frío), y centrifugado a máxima velocidad por 15 minutos, descartándose el sobrenadante. Este proceso se realizará 2 veces consecutivas. Los tubos con las muestras de ADN en su base, serán colocados boca abajo y secados a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas, o hasta que el olor a etanol desaparezca. Finalmente, el ADN será resuspendido usando 40µl de búfer TE 1X.

En el caso de los actinomicetes se colocará 400µl de búfer de extracción junto con aproximadamente 50µl de esferas de vidrio (106µm de diámetro, lavadas en ácido), en un tubo de centrifugación estéril de 1.5 ml. Aproximadamente 100mg de biomasa se rasparán de las membranas y se colocarán en el tubo que contendrá el búfer de extracción. Posteriormente las muestras se congelarán a -20°C por 24 horas. Luego, los tubos serán descongelados a temperatura ambiente y serán batidos utilizando un vórtex a máxima velocidad por 10 minutos, y centrifugados a máxima velocidad (14000 rpm) por 20 minutos. Se transferirán 200 µl del sobrenadante a un nuevo tubo estéril de 1.5 ml, tratando de evitar la biomasa y se añadirá 200 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Las soluciones serán mezcladas uniformemente, sin agitar vigorosamente para evitar la fragmentación del ADN presente en la parte acuosa de la solución. Los tubos se centrifugarán a máxima velocidad durante 15 minutos, y serán transferidos 150 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de centrifugación de 1.5 ml. El ADN precipitará añadiendo 300 µl de etanol (100% frío), formando fibras blanquecinas. El ADN será lavado y resuspendido siguiendo el mismo procedimiento a ser utilizado en el caso de las bacterias.

6.7.1.2. Determinación de Cantidad, Integridad y Pureza del ADN Genómico.

La determinación de la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico, se realizará mediante electroforesis de geles de agarosa, visualizados en luz ultravioleta. Primeramente se preparará agarosa (1% w/v) en búfer 0.5X TBE (Anexo D). La agarosa se fundirá mediante el incremento de temperatura usando un reverbero eléctrico. Una vez fundida se añadirá 1µl de 10000X SYBR Safe por cada 10ml de agarosa líquida y se procederá a agitar hasta que se obtenga una coloración rosada. Toda la mezcla se verterá en una bandeja para electroforesis de 20 x 20 cm, y se colocará un peine de 40 dientes. Una vez que la agarosa se solidifique, se procederá a colocar el gel en el tanque de electroforesis, asegurándose que los pozuelos formados se encuentren en el lado en donde se aplica la carga negativa del campo eléctrico. Se mezclará 7 µl de cada muestra con 3 µl de loading buffer (Invitrogen) y se colocará dicha mezcla en un pozuelo individual. Se utilizará también un marcador molecular de 1000 bp (Invitrogen). Una vez que todas las muestras sean colocadas en los pozuelos se procederá a correr el gel a 100V por 30 minutos. Una vez terminada la electroforesis, las bandas de ADN serán visualizadas con la ayuda de luz ultravioleta de un transiluminador ULTRALUM, y fotografiadas mediante el uso de una cámara fotográfica digital CANON, de 6.2 megapíxeles, del equipo ULTRACAM. Las fotografías serán transferidas a un computador en donde serán editadas y grabadas en formato TIFF.

Se determinará que el ADN genómico íntegro será aquel en que se observe una banda visible a unos pocos milímetros del inicio del gel. Contaminaciones de carbohidratos o proteínas serán observadas si un anillo blanco se forma en los pozuelos de cargado de las muestras. Finalmente, la cantidad de ADN será considerada como adecuada cuando bandas blancas sean claramente visibles en los geles.

6.7.1.3. rep-PCR

Las muestras de bacterias y actinomicetes que presenten suficiente cantidad de ADN genómico, se utilizarán para obtener fingerprintings mediante la técnica molecular de rep-PCR, usando el primer BOX, REP Y ERIC, para cada grupo de microorganismos estudiados. Aquellas muestras que no den positivo para la presencia de ADN no serán consideradas para el estudio. La cantidad de reactivos para realizar PCR con el primer BOX se detallan en la Tabla 5.

Los ingredientes se mezclarán en función del número de muestras, y se realizará una solución master (master mix). Se colocarán alícuotas de 24.5 µl en tubos plásticos para PCR de 200 µl. Posteriormente, se colocará 0.5 µl de ADN genómico en cada tubo para así completar los 25 µl de la reacción. Finalmente los tubos serán ubicados en el termobloque de un termociclador (TECNE, TC412). Las condiciones de PCR serán las siguientes: una fase de un ciclo a 95°C por 10 minutos, seguida de una fase estacionaria a 80°C. En ésta etapa se añadirá 1 unidad de *Taq* polimerasa por tubo de reacción. Una segunda fase a 95°C por 2 minutos para activar la enzima (proceso recomendado por el fabricante de la *Taq* polimerasa). La tercera fase corresponde al desarrollo de 30 ciclos, cada uno compuesto por una etapa de desnaturalización a 94°C por 2 minutos, una de alineamiento a 47°C por 2 minutos y una etapa final de alargamiento a 70°C por 4 minutos. La fase final se realizará a una temperatura de 70°C por 20 minutos. Una vez concluida la amplificación de los fragmentos mediante PCR, los tubos se almacenarán a 4°C.

Posteriormente se realizará rep – PCR con el primer REP. La cantidad de reactivos para realizar PCR con el primer REP se detallan en la Tabla 6.

Se realizará el mismo procedimiento descrito para el primer BOX. Las condiciones de PCR serán las siguientes: una fase de un ciclo a 95°C por 10 minutos, seguida de una fase estacionaria a 80°C. En ésta etapa se añadirá

1 unidad de *Taq* polimerasa por tubo de reacción. Una segunda fase a 95°C por 2 minutos para activar la enzima (proceso recomendado por el fabricante de la *Taq* polimerasa). La tercera fase corresponde al desarrollo de 30 ciclos, cada uno compuesto por una etapa de desnaturalización a 90°C por 30 segundos, una de alineamiento a 40°C por 1 minuto y una etapa final de alargamiento a 65°C por 8 minutos. La fase final se realizará a una temperatura de 72°C por 10 minutos. Una vez concluida la amplificación de los fragmentos mediante PCR, los tubos se almacenarán a 4°C.

Finalmente se realizará rep – PCR usando el primer ERIC. La cantidad de reactivos para realizar PCR con el primer ERIC se detallan en la Tabla 7.

Se seguirá el mismo procedimiento inicial utilizado con el primer BOX. Las condiciones de este PCR serán las siguientes: una fase de un ciclo a 94°C por 15 minutos, seguida de una fase estacionaria a 80°C. En ésta etapa se añadirá 1 unidad de *Taq* polimerasa por tubo de reacción. Una segunda fase a 94°C por 2 minutos para activar la enzima. La tercera fase corresponde al desarrollo de 30 ciclos, cada uno compuesto por una etapa de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, una de alineamiento a 45°C por 1 minuto y una etapa final de alargamiento a 65°C por 8 minutos. La fase final se realizará a una temperatura de 72°C por 10 minutos. Una vez concluida la amplificación de los fragmentos mediante PCR, los tubos serán almacenados a 4°C.

Los patrones de fingerprinting se conseguirán mediante la separación de los fragmentos obtenidos por PCR, usando un gel de agarosa (1.25% w/v). La electroforesis será realizada a 70V durante cuatro horas. Una vez terminada la electroforesis, las bandas de ADN se visualizarán con la ayuda de luz ultravioleta de un transiluminador ULTRALUM, y serán fotografiadas mediante el uso de una cámara fotográfica digital CANON, de 6.2 millones de megapíxeles, del equipo ULTRACAM. Las fotografías serán transferidas a un computador en donde serán editadas y grabadas en formato TIFF.

6.7.2. Caracterización Fenotípica

6.7.2.1. Caracterización Macroscópica

Los cultivos puros obtenidos se caracterizarán de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias (Figura 3). La caracterización para las bacterias se realizará en cultivos crecidos en agar nutritivo e incubados a 28°C y en medio GYM (Anexo D) a 28°C para los actinomicetes, en estos últimos también se determinará la presencia o ausencia de micelio aéreo.

6.7.2.2. Caracterización Microscópica de Bacterias

De los cultivos puros de bacterias se prepararán frotis para ser observados bajo el microscopio. Se colocará una gota de agua destilada en el centro de un portaobjetos, luego con un asa de transferencia estéril se transferirá una pequeña cantidad de cultivo y se mezclará con el agua destilada. El portaobjetos se debe secar al ambiente y finalmente se fijar al calor con la ayuda de un mechero.

6.7.2.3. Tinción de Gram

El frotis de cada bacteria se debe teñir con violeta de cristal por 1 minuto, luego se procederá a lavar con agua destilada. Posteriormente se cubrirá con solución de lugol por 1 minuto y nuevamente se lavará un agua. Seguidamente se cubre el frotis con alcohol yodado por 5 minutos y se procede a lavar con agua. Finalmente se coloca safranina por 5 minutos. Los portaobjetos teñidos se deben secar al ambiente para luego ser observados bajo el microscopio con el lente de inmersión 100X. Aquellas células teñidas de morado serán identificadas como Gram positivas, mientras que aquellas que presenten color rojo serán consideradas como Gram negativas.

6.7.2.4. Tinción de Cápsulas

Se prepararán frotis para teñirlos con cristal violeta por 2 minutos, luego se lavará el exceso del colorante con una solución de sulfato de cobre al 20% (w/v), y finalmente con agua destilada. Cada frotis se debe secar al ambiente para proceder a observarlos bajo el microscopio con el lente de inmersión 100X. La presencia de cápsulas se determina por la presencia de una capa transparente que rodea a la célula bacteriana que se encuentra teñida de morado.

6.7.2.5. Tinción de Endosporas

Igualmente se preparará un frotis de cada bacteria y se fijará al calor sobre la llama de un mechero, los portaobjetos serán ubicados sobre una rejilla con agua hirviendo y serán teñidos con verde malaquita por 10 minutos, evitando que se evapore el colorante, luego se lavará con agua destilada y se añadirá safranina por 3 minutos para dar contraste, luego se lavarán los portaobjetos con agua destilada y serán secados a temperatura ambiente, las placas se observarán al microscopio con el lente de mayor aumento. La presencia de endosporas se determinará al notar esporas en el centro de la célula bacteriana o en partes cercanas al extremo de la misma.

6.7.2.6. Caracterización Microscópica de Actinomicetes

En el caso de los actinomicetes se determinará la morfología de las cadenas de esporas en los cultivos que presenten micelio aéreo. Para ello se colocará un cubreobjetos estéril sobre el cultivo con la ayuda de una pinza estéril. Luego el cubreobjetos con el micelio adherido será colocado en un portaobjetos de manera que el micelio quede en contacto con el portaobjetos. Se determinará el tipo de estructura (Tabla 6) usando un microscopio con el lente de inmersión 100X.

6.8. Administración

INDICADORES A MEJORAR	SITUACIÓN ACTUAL	RESULTADOS ESPERADOS	ACTIVIDADES	REPOSNABLES
<p>Derreplicación molecular de grupos bacterianos.</p> <p>Identificación de nuevas especies bacterianas con actividad preliminar demostrada en producción de enzimas, vitaminas y reducción de metales pesados.</p>	<p>Identificación de nuevas especies bacterianas con actividad biotecnológica demostrada.</p>	<p>Derreplicación de bacterias</p> <p>Reducción del número de bacterias en estudio.</p> <p>Identificación de especies diferentes por taxonomía.</p>	<p>Caracterización macroscópica y microscópica de los cultivos</p> <p>Taxonomía numérica de datos genotípicos y fenotípicos</p> <p>Análisis de dendrogramas al 80% de similaridad.</p>	<p>Docente</p> <p>Investigador</p>

Elaborado por: Lorena Núñez

6.9. Previsión de la Evaluación

PREGUNTAS BÁSICAS	EXPLICACIÓN
¿Quiénes solicitan evaluar?	Docente Investigador
¿Por qué evaluar?	Porque es un proceso factible que se basa en investigaciones previas.
¿Para qué evaluar?	Para identificar posibles nuevos grupos bacterianos con utilidad en biotecnología.
¿Qué evaluar?	Dendrogramas de rep-PCR
¿Quién evalúa?	Docente - Estudiante
¿Cuándo evaluar?	Al finalizar los tres procesos mediante rep-PCR
¿Cómo evaluar?	Elaborando matrices de código binario
¿Con qué evaluar?	Con el programa PHYDITH

Elaborado por: Lorena Núñez

BIBLIOGRAFÍA

ACERO, S. 2007. *Algoritmo para Análisis Filogenético: UPGMA*. División de Ingenierías. Departamento de Ingeniería de Sistemas. Universidad del Norte Barranquilla - Colombia.

AMARU, R.; PEÑALOZA, R.; MIGUEZ, H.; TORRES, G. & CUEVAS, H. 2008. *Método para la Extracción Simultánea de RNA y DNA para Diagnóstico Molecular*. Unidad de Biología Celular, Departamento de Ciencias Funcionales, Facultad de Medicina, UMSA, La Paz - Bolivia. **53**: 39-42.

ARGENBIO 2010. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Microorganismos productores de antibióticos.

BACKHAUS, K.; ERICHSON, B.; PLINKE, W.; WEIBER. 2000. *Multivariate analysis methods. An application-oriented introduction*. Springer - Berlin.

BOBADILLA, C. & RINCÓN, S. 2008. *Aislamiento y Producción de Bacterias Fosfato Solubilizadoras a partir de Compost Obtenido en Residuos de Plaza*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia

BROCK. 2010. *Biología de los Microorganismos*. Décima Edición. Southern Illinois University Carbondale. PEARSON. Prentice Hall.

COMUNIDAD VIRTUAL DE LA SOCIEDAD CUBANA DE BIOINGENIERÍA, 2011. Estudiarán microorganismos resistentes al frío en la Antártida. Disponible en: <http://portalinfomed.sld.cu/socbio>

CONAP. 2004. *Biotecnología y Biodiversidad: consideraciones para elaborar el Marco Nacional de Bioseguridad. “Desarrollo del Marco Nacional de Bioseguridad para Guatemala”*, GEF & PNUMA-UNEP. **1**:44.

CORTAZAR, A & SILVA, E. 2004. *Métodos Físico-Químicos En Biotecnología. PCR.* Universidad Nacional Autónoma De México Instituto De Biotecnología. 9-16, 29.

DELONG, E. & PACE, N. 2001. *Environmental Diversity of Bacteria and Archaea. Molecular, Cellular, and Developmental Biology.* Monterey Bay Aquarium Research Institute. University of Colorado, Boulder, Colorado - USA Syst. 470-478.

DI PAOLA, M. & VICIÉN, C. 2010. *Biorremediación: vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación.* CEUR – CONICET. 6-7.

EGUIARTE, L.; SOUZA, V & AGUIRRE, X. 2007. *Ecología Molecular.* Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento. y Uso de la Biodiversidad. Primera Edición. México. 517 – 532.

FALCÓN. L & VALERA, A. 2007. *Las herramientas moleculares. Extracción de ácidos nucleicos.* 501-506.

FERNANDEZ, F. 2005. *Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas.* Departamento de Microbiología y Epidemiología Infecciosa. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla - España. 1-5.

FERNÁNDEZ, L.; ZALBA, P.; GÓMEZ, M. & SAGARDOY, M. 2005. *Bacterias Solubilizadoras de Fosfato Inorgánico Aisladas de Suelos de la Región Sojera.* Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. 31-32.

FOLLE, C. 2005. *Avances en biotecnología. Reflexiones éticas y aplicaciones empresariales.* Revista de Antiguos Alumnos del IEEM. 2005. 98-100.

GEST, H. 1999. Bacterial classification and taxonomy: a 'primer' for the new millennium. 26:3.

GLAZER, A. & NIKAIDO, H. 2007. *Microbial Biotechnology. Fundamentals of applied microbiology.* Second Edition. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. 1-57

GONTANG, E.; GAUDENCIO, S.; FENICAL, W., & JENSEN, P. 2010. *Sequence-Based Analysis of Secondary-Metabolite Biosynthesis in Marine Actinobacteria.* American Society for Microbiology. Center for Marine Biotechnology and Biomedicine, Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego, La Jolla, California. 2487–2499

GONZÁLEZ, J. & ORERO, A. 2007. *La penicilina llega a España: 10 de marzo de 1944, una fecha histórica.* Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Sociedad Española de Quimioterapia. **20 (4)**. 446-450.

GUZMÁN, E. 2012. *Aislamiento y Caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cuatro suelos de la provincia de Chimborazo.* Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Recursos Naturales. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Riobamba – Ecuador.

HERRERA, M. 2009. *Filogenia Bacteriana Mediante el Análisis del RNA 16S.* Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla - México. 1-10.

IPGRI & CORNELL UNIVERSITY, 2003. *Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity DNA-based technologies.* PCR-based technologies PCR basics. 3-11.

JIMÉNEZ, M. 2001. *Caracterización Molecular de Razas Patogénicas de Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris y Análisis de su Diversidad Genética.* Universidad de Córdoba. Instituto de Agricultura Sostenible. Córdoba - España. 123-132.

JOHNSON, J. & O'BRYAN, T. 2000. *Improved Repetitive-Element PCR Fingerprinting for Resolving Pathogenic and Nonpathogenic Phylogenetic Groups within Escherichia coli.* University of Minnesota. **7(2):** 265–273.

LEIVA, T. 2001. Taxonomía, Clasificación y nomenclatura de las Bacterias.

LUQUE, J. & HERRÁEZ, Á. 2002. *Biología Molecular e Ingeniería Genética.* Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de Alcalá. Editorial Elsevier España S.A. Madrid – España. 117 – 160.

MICHU, E. 2007. *A short guide to phylogeny reconstruction* Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic. Plant Soil Environ. 442–446.

MONTAÑO, N.; SANDOVAL, A.; CAMARGO, S. & SÁNCHEZ, J. 2010. Los microorganismos: pequeños gigantes. Ciencia y Cultura Elementos. 15-23

MORALES, Y.; DUQUEZ, E.; RODRÍGUEZ, O.; DE LA TORRE, J.; MARTÍNEZ, R.; PÉREZ, R & MUÑOZ, J. 2010. *Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos.* Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Instituto de Ciencias (IC), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). **14 (2).** 13 - 20

MOURA, J.; BOSCO, J. & CUNHA, L. 1999. Comparison of Similarity Coefficients Based on Raps Markers in the Common Bean. Genetics and Molecular Biology, 22, 3, 427-432.

MROZIK, A.; PIOTROWSKA, Z. & LABUZEK, S. 2002. *Bacterial Degradation and Biorremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.* Department of Biochemistry - Department of Microbiology. University of Silesia. 15-20

MUHAMMAD, S.; AHMAD, S. & HAMEED, A. 2009. *Antibiotic production by Thermophilic bacillus specie sat-4.* Microbiology Research Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, **22:** 339-345.

NEWSLETTER MICROBIAL, 2009. *La Extracción y Purificación del ADN para el Análisis por PCR. Mitos y Realidades. 3.*

PARRILLI, E.; PAPA, R.; TUTINO, M. & SANNIA, G. 2010. *Engineering of a psychrophilic bacterium for the bioremediation of aromatic compounds.* Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica; Università di Napoli Federico II. Rome, Italy. 213-216.

POLÍTICA Y ESTRATEGIA NACIONAL DE BIODIVERSIDAD DEL ECUADOR. 2001 – 2010. 3-4, 5-7

POULSE, M.; CHAN, D.; CLARDY, J. & CURRIE, C. 2011. *Chemical Analyses of Wasp-Associated Streptomyces Bacteria Reveal a Prolific Potential for Natural Products Discovery.* Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison. 213-215.

QUEZADA, F.; ROCA, W.; SZAUER, M.; GÓMEZ, J & LÓPEZ, R. 2005. *Bioteología para el uso sostenible de la biodiversidad. Capacidades locales y mercados potenciales.* CAF – CEPAL Caracas – Venezuela. 13-16

RODRÍGUEZ, C. 2004. *Molecular and Phenotypic Characterization of Members of the Family Streptomycetae.* Ph. D. Thesis, University of Newcastle.

RODRÍGUEZ, I. & BARRERA, H. 2004. *La Reacción En Cadena De La Polimerasa A Dos Décadas De Su Invención.* **3:** 323- 329.

SALAZAR, M.; AGUILERA, P.; MALDONADO, P.: ARCE, M. & LEÓN, G. 2009. *Microbios: el universo invisible.* Primera edición. Editorial Terracota. 8-10

SÁNCHEZ, L & CORRALES, L. 2006. Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. **3:** 109 - 113

STALEY, J.; GUNSALUS, R.; LORY, S. & PERRY, J. 2007. *Microbial Life,* Second Edition. SINAUER ASSOCIATES INC. 486 – 489.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, 2009. *Bioquímica III: Trabajo Práctico Nro 4. Extracción de RNA y DNA bacteriano.* Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 1-4.

VALVERDE, A. 2003. Taxonomía Polifásica de Poblaciones de Microorganismos que Establecen simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.

VANDAMME, P.; Pot, B.; Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K. & Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **60(2):**407.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T. & LUPSKI, J. 1991. *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.* Institute for Molecular Genetics and Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine USA. **19 (24):** 6823 -683.

VIDALI, M. 2001. *Bioremediation. An overview. Dipartimento di Chimica Inorganica, Metallorganica, e Analitica. Università di Padova Via Loredan, Padova, Italy. 73 (7): 1163–1172.*

VINUEZA, A. 2010. *Determinación de la relación entre la caracterización fenotípica y genotípica de actinomicetes como mecanismos de derreplicación de microorganismos útiles en biotecnología. FCIAL. Universidad Técnica de Ambato. Ambato – Ecuador.*

VIZUETE, A. 2011. *Determinación de la capacidad biodegradadora de hidrocarburos de bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo. FCIAL. Universidad Técnica de Ambato. Ambato – Ecuador.*

WENDT, J. & IZQUIERDO, J. 2002. *Manejo y gestión de la biotecnología agrícola apropiada para pequeños productores: estudio de caso Ecuador. Fundación REDBIO Internacional. Santiago – Chile. 48-50.*

ANEXOS

ANEXO A

**DATOS
EXPERIMENTALES**

Tabla A1. Datos de Origen de los Microorganismos.

G	Código	Muestra	Sitio de Recolección	Provincia	Medio de Aislamiento	Antibiótico en Medio	T (°C)	pH (inc)	Referencia
Solubilizadoras de P	SP 1647	Suelo	Tunshi	Chimborazo	Medio Selectivo para solubilizadores	Nistatin 75 ug/ml	28	7	Guzman, 2011
	SP 1648	Suelo	Tunshi	Chimborazo	Medio Selectivo para solubilizadores	Nistatin 75 ug/ml	28	7	Guzman, 2011
	SP 1653	Suelo	Tunshi	Chimborazo	Medio Selectivo para solubilizadores	Nistatin 75 ug/ml	28	7	Guzman, 2011
	SP 1659	Suelo	Tunshi	Chimborazo	Medio Selectivo para solubilizadores	Nistatin 75 ug/ml	28	7	Guzman, 2011
	SP 1687	Suelo	Cañi	Chimborazo	Medio Selectivo para solubilizadores	Nistatin 75 ug/ml	28	7	Guzman, 2011
	SP 1739	Suelo	Cañi	Chimborazo	Medio Selectivo para solubilizadores	Nistatin 75 ug/ml	28	7	Guzman, 2011
	SP 1740	Suelo	Cañi	Chimborazo	Medio Selectivo para solubilizadores	Nistatin 75 ug/ml	28	7	Guzman, 2011
	SP 1661 a	Suelo	Tunshi	Chimborazo	Medio Selectivo para solubilizadores	Nistatin 75 ug/ml	28	7	Guzman, 2011
	SP 1661 c	Suelo	Tunshi	Chimborazo	Medio Selectivo para solubilizadores	Nistatin 75 ug/ml	28	7	Guzman, 2011
Antártida	DCB-A 2186	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2187	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2188	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2189	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2190	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2191	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2192	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2193	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2194	Arena	Isla Greenwich Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2195	Arena	Isla Greenwich Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2196	Arena	Isla Greenwich Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2197	Arena	Isla Greenwich Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2198	Sedimento	Isla Greenwich Deshielo Graciar Quito	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2199	Sedimento	Isla Greenwich Deshielo Graciar Quito	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2200	Sedimento	Isla Greenwich Deshielo Graciar Quito	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2201	Arena	Isla Greenwich Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2202	Arena	Isla Greenwich Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2203	Arena	Isla Greenwich Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2204	Arena	Isla Greenwich Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2205	Suelo	Isla Greenwich Meseta Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2206	Suelo	Isla Greenwich Meseta Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
DCB-A 2207	Suelo	Isla Greenwich Meseta Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012	
DCB-A 2208	Suelo	Isla Greenwich Meseta Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012	
DCB-A 2209	Suelo	Isla Greenwich Meseta Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012	
DCB-A 2210	Suelo	Isla Greenwich Meseta Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012	
DCB-A 2211	Suelo	Isla Greenwich Meseta Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012	

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A1. Continuación

G	Código	Muestra	Sitio de Recolección	Provincia	Medio de Aislamiento	Antibiótico en Medio	T (°C)	pH (inc)	Referencia
Antártida	DCB-A 2212	Suelo	Isla Greenwich Meseta Punta Ambato	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2213	Suelo	Isla Barrientos Suelo bajo musgo	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2214	Suelo	Isla Barrientos Suelo bajo musgo	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2215	Arena	Isla Barrientos Playa Posterior Elefantes Marinos	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2216	Arena	Isla Barrientos Playa Posterior Elefantes Marinos	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2217	Arena	Isla Barrientos Playa Posterior Elefantes Marinos	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2218	Arena	Isla Barrientos Playa Posterior Elefantes Marinos	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2219	Arena	Isla Barrientos Playa Posterior Elefantes Marinos	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2220	Suelo	Isla Greenwich cerca de la Estación Pedro Vicente Maldonado	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2221	Suelo	Isla Greenwich cerca de la Estación Pedro Vicente Maldonado	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2222	Suelo	Isla Greenwich Rio Culebra Suelo Bajo Musgo	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2223	Suelo	Isla Greenwich Rio Culebra Suelo Bajo Musgo	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2224	Suelo	Isla Greenwich Rio Culebra Suelo Bajo Musgo	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2225	Suelo	Isla Greenwich Rio Culebra Suelo Bajo Musgo	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2226	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2227	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2228	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2229	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2230	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
	DCB-A 2231	Suelo	Isla Greenwich Cerro Puyango	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012
DCB-A 2232	Suelo	Isla Greenwich cerca de la Estación Pedro Vicente Maldonado	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012	
DCB-A 2233	Suelo	Isla Greenwich cerca de la Estación Pedro Vicente Maldonado	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012	
DCB-A 2234	Suelo	Isla Greenwich cerca de la Estación Pedro Vicente Maldonado	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012	
DCB-A 2235	Suelo	Isla Greenwich cerca de la Estación Pedro Vicente Maldonado	Antártida	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2012	
Chimborazo 1 y 2	DCB 2321	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2013
	DCB 2322	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2014
	DCB 2323	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2015
	DCB 2324	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2016
	DCB 2325	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2017
	DCB 2326	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2018
	DCB 2327	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2019
	DCB 2328	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2020
	DCB 2329	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2021
	DCB 2330	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2022
	DCB 2331	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2023

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A1. Continuación

G	Código	Muestra	Sitio de Recolección	Provincia	Medio de Aislamiento	Antibiótico en Medio	T (°C)	pH (inc)	Referencia
Chimborazo 1 y 2	DCB 2332	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2024
	DCB 2333	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2025
	DCB 2334	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2026
	DCB 2335	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2027
	DCB 2336	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2028
	DCB 2337	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2029
	DCB 2338	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2030
	DCB 2339	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2031
	DCB 2340	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2032
	DCB 2341	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2033
	DCB 2342	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2034
	DCB 2348	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2035
	DCB 2355	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2036
DCB 2357	Suelo	Volcán Chimborazo	Chimborazo	Agar Nutritivo	Nistatin 75 ug/ml	4	7,2	Rodríguez, 2037	
Posibles Biorremediadores de Suelos Contaminados con Petróleo	AX 7	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 12	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 13	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 14	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 15	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 18	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 19	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 23	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 31	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 40	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 41	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX42	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 43	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 44	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 50	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 53	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 54	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2011
	AX 58	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2012
AX 64	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2013	
AX 67	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2014	
AX 72	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2015	

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A1. Continuación

G	Código	Muestra	Sitio de Recolección	Provincia	Medio de Aislamiento	Antibiótico en Medio	T (°C)	pH (inc)	Referencia
Posibles Biorremed.	AX 76	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2016
	AX 78	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2017
	AX 81	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2018
	AX 87	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2019
	AX 88	Suelo	Campo Sacha	Orellana	Agar Extracto de Suelo contaminado con hidrocarburos	Nistatin 75 ug/ml	28	6,5	Vizuet, 2020
Productores de antibióticos	DCB-A 225	Suelo	Campus ESPOCH	Chimborazo	Agar Glucosa Extracto de Malta Extracto de Levadura	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	5	Vinueza, 2010
	DCB-A 274	Sedimentos	Laguna Colta	Chimborazo	Agar Glucosa Extracto de Malta Extracto de Levadura	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	5	Vinueza, 2010
	DCB-A 497	Suelo ladera	Laguna de Colta	Chimborazo	Agar Acido Húmico	Nistatin 75 ug/ml	26	7	Vinueza, 2010
	DCB-A 414	Sedimentos	Laguna de Colta	Chimborazo	Agar Acido Húmico	Nistatin 75 ug/ml	26	5,5	Vinueza, 2010
	DCB-A 431	Sedimentos	Laguna de Colta	Chimborazo	Agar Glucosa Extracto de Malta Extracto de Levadura	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	7	Vinueza, 2010
	DCB-A 440	Sedimentos	Laguna de Colta	Chimborazo	Agar Glucosa Extracto de Malta Extracto de Levadura	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	7	Vinueza, 2010
	DCB-A 460	Sedimentos	Laguna de Colta	Chimborazo	Agar Glucosa Extracto de Malta Extracto de Levadura	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	5,5	Vinueza, 2010
	DCB-A 464	Suelo ladera	Laguna de Colta	Chimborazo	Agar Glucosa Extracto de Malta Extracto de Levadura	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	5,5	Vinueza, 2010
	DCB-A 483	Suelo ladera	Laguna de Colta	Chimborazo	Agar Glucosa Extracto de Malta Extracto de Levadura	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	5,5	Vinueza, 2010
	DCB-A 221	Suelo	Campus ESPOCH	Chimborazo	Agar Czapeck	Nistatin 75 ug/ml	26	5	Vinueza, 2010
	DCB-A 287	Sedimentos	Laguna Colta	Chimborazo	Agar Bennett	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	5	Vinueza, 2010
	DCB-A 310	Sedimentos	Laguna Colta	Chimborazo	Agar Bennett	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	5	Vinueza, 2010
	DCB-A 332	Suelo	Ambato	Tungurahua	Agar Almidón Caseína	Nistatin 75 ug/ml	26	5,5	Vinueza, 2010
	DCB-A 279	Sedimentos	Laguna Colta	Chimborazo	Agar Glucosa Extracto de Malta Extracto de Levadura	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	5	Vinueza, 2010
	DCB-A 399	Sedimentos	Lago San Pablo	Imbabura	Agar Bennett	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	5,5	Vinueza, 2010
DCB-A 405	Sedimentos	Laguna de Colta	Chimborazo	Agar Glucosa Extracto de Malta Extracto de Levadura	Nistatin 75 ug/ml, rifampicina 5 ug/ml	26	5,5	Vinueza, 2010	
DCB-A 452	Sedimentos	Laguna de Colta	Chimborazo	Agar Almidón Caseína	Nistatin 75 ug/ml	26	7	Vinueza, 2010	
DCB-A 270	Suelo	Guayllabamba	Chimborazo	Agar Almidón Caseína	Nistatin 75 ug/ml	26	5	Vinueza, 2010	
DCB-A 408	Sedimentos	Laguna de Colta	Chimborazo	Agar Almidón Caseína	Nistatin 75 ug/ml	26	5,5	Vinueza, 2010	

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A2. Determinación de Bacterias Psicrófilas.

Origen	CÓDIGO	4° C	28° C	Origen	CÓDIGO	4° C	28° C	
Antártida	DCB-A 2186	1	1+	Antártida	DCB-A 2224	1	1	
	DCB-A 2187	1	1		DCB-A 2225	1	1	
	DCB-A 2188	1	0		DCB-A 2226	1	1	
	DCB-A 2189	1	0		DCB-A 2227	1	1	
	DCB-A 2190	1	1		DCB-A 2228	1	1	
	DCB-A 2191	1	1		DCB-A 2229	1	1	
	DCB-A 2192	1	1		DCB-A 2230	FC	FC	
	DCB-A 2193	1	1		DCB-A 2231	1	1	
	DCB-A 2194	FC	FC		DCB-A 2232	FC	FC	
	DCB-A 2195	1	1		DCB-A 2233	FC	FC	
	DCB-A 2196	1	0		DCB-A 2234	FC	FC	
	DCB-A 2197	1	1		DCB-A 2235	1	1	
	DCB-A 2198	1	0		Chimborazo 1	DCB 2321	1	1
	DCB-A 2199	1	1			DCB 2322	1	1
	DCB-A 2200	FC	FC	DCB 2323		0	1	
	DCB-A 2201	1	1	DCB 2324		1	1	
	DCB-A 2202	1	1	DCB 2325		0	1	
	DCB-A 2203	1	1	DCB 2326		FC	FC	
	DCB-A 2204	1	1	DCB 2327		1	1	
	DCB-A 2205	1	1	DCB 2328		0	1	
	DCB-A 2206	1	1	DCB 2329		FC	FC	
	DCB-A 2207	1	1	DCB 2330		1	1	
	DCB-A 2208	1	1	DCB 2331		0	1	
DCB-A 2209	1	1	DCB 2332	FC		FC		
DCB-A 2210	1	0	DCB 2333	FC		FC		
DCB-A 2211	1	1	DCB 2334	0		1		
DCB-A 2212	1	1	DCB 2335	FC		FC		
DCB-A 2213	1	1	DCB 2336	FC		FC		
DCB-A 2214	1	1	DCB 2337	FC		FC		
DCB-A 2215	1	0	DCB 2338	0		1		
DCB-A 2216	1	1	DCB 2339	FC		FC		
DCB-A 2217	1	0	DCB 2340	1		1		
DCB-A 2218	1	1	DCB 2341	FC	FC			
DCB-A 2219	1	1	DCB 2342	FC	FC			
DCB-A 2220	1	1	DCB 2348	1	1			
DCB-A 2221	1	1	DCB 2355	1	1			
DCB-A 2222	1	1	DCB 2356	FC	FC			
DCB-A 2223	1	1	DCB 2357	1	1			
				Chimb 2				

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

1: Crecimiento positivo
 0: Crecimiento negativo
 FC: Ausencia de crecimiento
 : Bacterias Psicrófilas



Tabla A3. Microorganismos Caracterizados.

ID Bacterias Solubilizadoras de Fósforo	ID Bacterias Psicrófilas	ID Bacterias Biorremediadoras	ID Actinomicetes Productores de Antibióticos
SP 1647	DCB-A 2188	AX 12	DCB-A 221
SP 1648	DCB-A 2189	AX13	DCB-A 225
SP 1653	DCB-A 2196	AX 14	DCB-A 270
SP 1659	DCB-A 2198	AX 15	DCB-A 274
SP 1661a	DCB-A 2210	AX 18	DCB-A 279
SP 1661c	DCB-A 2215	AX 19	DCB-A 287
SP 1687	DCB-A 2217	AX 31	DCB-A 310
SP 1739		AX 40	DCB-A 332
SP 1740		AX 42	DCB-A 399
		AX 44	DCB-A 405
		AX 50	DCB-A 408
		AX 53	DCB-A 414
		AX 58	DCB-A 431
		AX 64	DCB-A 440
		AX 67	DCB-A 452
		AX 72	DCB-A 460
		AX 76	DCB-A 464
		AX 78	DCB-A 483
		AX 81	DCB-A 497
		AX 87	
		AX 88	

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A4. Cantidades de ADN para PCR.

Bacterias Solubilizadoras de Fósforo	ADN (μl)	Bacterias Psicrófilas	ADN (μl)	Bacterias Biorremediadoras	ADN (μl)	Actinomicetes Productores de Antibióticos	ADN (μl)
SP 1647	0,5	DCB-A 2188	2	AX 12	1	DCB-A 221	1
SP 1648	0,5	DCB-A 2189	2	AX 14	0,5	DCB-A 270	1
SP 1653	0,5	DCB-A 2196	2	AX 19	0,5	DCB-A 279	1
SP 1661a	1	DCB-A 2198	0,5	AX 31	2	DCB-A 287	1
SP 1661c	0,5	DCB-A 2210	0,5	AX 42	0,5	DCB-A 310	1
SP 1687	0,5	DCB-A 2215	0,5	AX 44	0,5	DCB-A 332	1
SP 1739	1	DCB-A 2217	0,5	AX 53	0,5	DCB-A 399	1
SP 1740	0,5			AX 58	1	DCB-A 405	1
				AX 64	0,5	DCB-A 408	1
				AX 72	2	DCB-A 431	1
				AX 76	1	DCB-A 440	1
				AX 78	2	DCB-A 452	1
				AX 81	1	DCB-A 460	1
				AX 87	0,5	DCB-A 464	1
				AX 88	2	DCB-A 483	1

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A5. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer BOX, para bacterias Solubilizadoras de fósforo.

Posición	SP 1661 c	SP 1661 a	SP 1647	SP 1740	SP 1648	SP 1687	SP 1739	SP 1653
14	1	0	1	0	1	0	0	0
15	1	1	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	1	0	0	0
18	0	0	0	0	0	1	1	0
19	1	1	1	0	1	0	0	0
21	0	0	1	0	1	0	1	1
22	1	0	1	1	1	0	0	0
23	0	1	0	0	0	1	1	1
24	1	0	1	1	1	0	0	1
25	0	1	0	0	0	1	1	0
26	0	1	1	1	0	1	1	1
27	1	0	0	0	1	0	0	0
28	1	1	1	0	1	1	1	0
29	1	1	1	1	1	1	1	1
30	0	0	0	0	0	1	0	0
31	1	1	1	1	1	0	1	1
32	0	1	0	1	0	1	0	1
33	1	0	1	1	1	0	1	1
34	0	1	1	0	0	0	1	0
35	1	0	1	1	1	0	0	1
36	1	0	0	1	0	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	0	0
38	1	1	1	0	1	0	1	1
39	0	0	0	1	0	1	0	1
40	0	1	0	0	0	0	0	0
41	0	1	0	0	0	1	0	0
42	0	1	0	1	0	0	1	1
43	0	0	1	1	0	0	0	0
44	0	1	0	0	0	1	1	1
45	0	1	0	0	0	0	1	1
46	0	0	1	0	0	0	0	0
47	0	0	0	1	0	0	1	0
49	0	0	0	1	0	1	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A6. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer REP, para bacterias Solubilizadoras de fósforo.

Posición	SP 1661 c	SP 1661 a	SP 1647	SP 1740	SP 1648	SP 1687	SP 1739	SP 1653
7	0	0	0	1	0	0	0	0
11	0	1	0	0	0	0	0	0
14	0	1	0	0	0	1	1	1
15	0	0	0	0	1	1	1	0
16	1	0	1	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	1	0
18	1	0	0	0	0	0	0	1
19	0	0	0	0	0	0	0	1
20	0	0	1	1	1	0	0	0
21	0	0	1	1	1	1	0	1
22	1	0	1	1	1	1	1	0
23	1	0	0	1	0	0	0	0
24	0	1	0	0	0	0	0	1
25	0	0	0	0	0	0	1	1
26	0	0	1	1	1	0	1	0
27	1	0	1	0	1	1	0	0
28	0	0	0	1	0	1	1	1
29	0	1	1	1	1	0	0	1
30	0	0	0	0	0	1	0	0
31	0	1	0	0	0	1	0	1
32	0	0	1	1	1	0	0	1
33	0	1	0	1	0	0	0	1
34	0	0	1	0	0	0	1	0
35	0	1	0	1	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	1	1	0
37	0	1	0	1	0	0	1	0
38	0	0	0	0	0	1	1	0
39	0	1	0	1	0	1	0	0
40	0	1	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	1	0	0	1	1
43	0	1	0	0	0	0	1	0
44	0	0	0	0	0	0	0	1
45	0	1	0	0	0	0	1	0
49	0	0	0	0	0	0	1	0
51	0	1	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	1	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A7. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer ERIC, para bacterias Solubilizadoras de fósforo.

Posición	SP 1740	SP 1687	SP 1739	SP 1653
20	0	0	1	0
21	1	0	1	0
22	1	0	0	1
23	0	0	1	1
24	1	0	0	0
25	1	0	1	1
26	0	0	1	0
27	1	0	1	1
28	1	0	0	0
29	1	0	1	0
30	1	0	0	1
31	0	0	1	0
32	1	0	0	1
33	1	1	0	0
34	0	1	0	0
35	0	0	1	1
37	0	1	0	0
38	0	0	0	1
39	0	1	1	0
40	0	0	1	1
41	0	1	0	0
42	1	0	1	0
43	0	0	1	0
44	0	1	0	0
48	1	0	0	0
50	0	0	1	0
51	1	1	1	0
59	0	1	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A8. Matriz de Datos Genotípicos de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo Obtenidos de rep – PCR con los Primer BOX, REP y ERIC.

Posición	SP 1661 c	SP 1661 a	SP 1647	SP 1740	SP 1648	SP 1687	SP 1739	SP 1653
7	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1	0	1	0	1	0	0	0
15	1	1	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	1	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	1	1	0
19	1	1	1	0	1	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	1	0	1	0	1	1
22	1	0	1	1	1	0	0	0
23	0	1	0	0	0	1	1	1
24	1	0	1	1	1	0	0	1
25	0	1	0	0	0	1	1	0
26	0	1	1	1	0	1	1	1
27	1	0	0	0	1	0	0	0
28	1	1	1	0	1	1	1	0
29	1	1	1	1	1	1	1	1
30	0	0	0	0	0	1	0	0
31	1	1	1	1	1	0	1	1
32	0	1	0	1	0	1	0	1
33	1	0	1	1	1	0	1	1
34	0	1	1	0	0	0	1	0
35	1	0	1	1	1	0	0	1
36	1	0	0	1	0	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	0	0
38	1	1	1	0	1	0	1	1
39	0	0	0	1	0	1	0	1
40	0	1	0	0	0	0	0	0
41	0	1	0	0	0	1	0	0
42	0	1	0	1	0	0	1	1
43	0	0	1	1	0	0	0	0
44	0	1	0	0	0	1	1	1
45	0	1	0	0	0	0	1	1
46	0	0	1	0	0	0	0	0
47	0	0	0	1	0	0	1	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	1	0	1	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	1	0	0	0	0
11	0	1	0	0	0	0	0	0
14	0	1	0	0	0	1	1	1
15	0	0	0	0	1	1	1	0
16	1	0	1	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	1	0
18	1	0	0	0	0	0	0	1
19	0	0	0	0	0	0	0	1
20	0	0	1	1	1	0	0	0
21	0	0	1	1	1	1	0	1
22	1	0	1	1	1	1	1	0
23	1	0	0	1	0	0	0	0
24	0	1	0	0	0	0	0	1
25	0	0	0	0	0	0	1	1
26	0	0	1	1	1	0	1	0
27	1	0	1	0	1	1	0	0
28	0	0	0	1	0	1	1	1
29	0	1	1	1	1	0	0	1
30	0	0	0	0	0	1	0	0
31	0	1	0	0	0	1	0	1
32	0	0	1	1	1	0	0	1

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A8. Continuación

Posición	SP 1661 c	SP 1661 a	SP 1647	SP 1740	SP 1648	SP 1687	SP 1739	SP 1653
33	0	1	0	1	0	0	0	1
34	0	0	1	0	0	0	1	0
35	0	1	0	1	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	1	1	0
37	0	1	0	1	0	0	1	0
38	0	0	0	0	0	1	1	0
39	0	1	0	1	0	1	0	0
40	0	1	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	1	0	0	1	1
42	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	1	0	0	0	0	1	0
44	0	0	0	0	0	0	0	1
45	0	1	0	0	0	0	1	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	1	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	1	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	1	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0
7	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
11	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
14	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
15	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
16	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
17	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
18	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
19	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
20	nd	nd	nd	0	nd	0	1	0
21	nd	nd	nd	1	nd	0	1	0
22	nd	nd	nd	1	nd	0	0	1
23	nd	nd	nd	0	nd	0	1	1
24	nd	nd	nd	1	nd	0	0	0
25	nd	nd	nd	1	nd	0	1	1
26	nd	nd	nd	0	nd	0	1	0
27	nd	nd	nd	1	nd	0	1	1
28	nd	nd	nd	1	nd	0	0	0
29	nd	nd	nd	1	nd	0	1	0
30	nd	nd	nd	1	nd	0	0	1
31	nd	nd	nd	0	nd	0	1	0
32	nd	nd	nd	1	nd	0	0	1
33	nd	nd	nd	1	nd	1	0	0
34	nd	nd	nd	0	nd	1	0	0
35	nd	nd	nd	0	nd	0	1	1
36	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
37	nd	nd	nd	0	nd	1	0	0
38	nd	nd	nd	0	nd	0	0	1
39	nd	nd	nd	0	nd	1	1	0
40	nd	nd	nd	0	nd	0	1	1
41	nd	nd	nd	0	nd	1	0	0
42	nd	nd	nd	1	nd	0	1	0
43	nd	nd	nd	0	nd	0	1	0
44	nd	nd	nd	0	nd	1	0	0
45	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
46	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
47	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
48	nd	nd	nd	1	nd	0	0	0
49	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
50	nd	nd	nd	0	nd	0	1	0
51	nd	nd	nd	1	nd	1	1	0
52	nd	nd	nd	0	nd	0	0	0
59	nd	nd	nd	0	nd	1	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A9. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de características fenotípicas de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo.

Característica		SP 1661 c	SP 1661 a	SP 1647	SP 1740	SP 1648	SP 1687	SP 1739	SP 1653
ID									
Color de la colonia	Amarillo	0	1	0	0	0	1	0	1
	Blanco	0	0	1	0	0	0	0	0
	Crema	1	0	0	1	1	0	1	0
Forma de la colonia	Circular	1	1	1	1	1	1	0	1
	Irregular	0	0	0	0	0	0	1	0
Elevación de colonia	Plana	0	1	1	1	1	0	1	1
	Convexa	1	0	0	0	0	1	0	0
Borde de la colonia	Entero	1	0	1	1	1	1	0	1
	Ondulado	0	1	0	0	0	0	1	0
Forma	Bacilos	0	1	1	1	1	1	1	1
	Cocos	1	0	0	0	0	0	0	0
Tinción de Gram	G+	1	0	0	0	0	1	1	0
	G-	0	1	1	1	1	0	0	1
Cápsulas	Presencia	0	1	1	1	0	1	0	1
Endosporas	Presencia	0	0	0	0	0	0	1	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A10. Grupos-Especie de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos.

# de Grupos de ADN formados	ID Bacteria
1	SP 1647
	SP 1648
	SP 1661c
2	SP 1740
3	SP 1653
4	SP 1661a
5	SP 1687
6	SP 1739

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Tabla A11. Grupos-Especie de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos y Fenotípicos.

# de Grupos formados	ID Bacteria
1	SP 1661c
2	SP 1647 SP1648
3	SP 1740
4	SP 1653
5	SP 1661a
6	SP 1687
7	SP 1739

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Tabla A12. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer BOX, para bacterias Psicrófilas.

Posición	DCB-A 2188	DCB-A 2189	DCB-A 2196	DCB-A 2210	DCB-A 2215	DCB-A 2217
18	0	1	0	0	0	0
19	0	0	1	0	0	0
20	0	1	0	1	0	1
21	0	0	1	0	0	1
22	1	0	0	0	1	0
23	0	0	0	1	0	0
24	1	1	1	0	0	0
25	1	0	0	0	1	0
26	0	0	0	0	1	0
27	1	1	1	0	0	0
28	1	1	0	1	1	1
29	1	0	0	1	1	0
30	1	1	1	0	0	0
31	0	1	1	1	1	0
32	1	0	1	0	0	1
33	0	1	0	0	1	1
34	0	1	1	0	0	1
35	1	0	0	0	1	0
36	1	1	1	1	1	0
37	1	1	1	1	0	0
38	0	0	0	0	0	1
39	1	0	0	1	0	0
40	0	1	0	0	0	0
41	0	1	1	0	0	1
42	1	0	1	1	0	0
43	0	1	1	0	1	0
44	1	0	1	0	0	1
45	0	1	0	1	1	0
46	0	1	1	0	0	0
47	1	0	0	0	1	0
48	0	1	1	0	0	0
49	0	1	0	1	0	0
50	0	0	0	1	1	0
51	0	1	0	1	0	1
52	0	0	0	0	1	0
53	0	0	0	0	0	1

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A13. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer REP, para bacterias Psicrófilas.

Posición	DCB-A 2188	DCB-A 2189	DCB-A 2196	DCB-A 2198	DCB-A 2210	DCB-A 2215	DCB-A 2217
13	0	1	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	1	0
15	1	0	0	0	0	0	0
16	0	1	0	0	0	1	0
17	1	1	0	0	0	0	0
18	1	0	0	0	0	1	0
19	0	1	0	0	0	0	0
20	0	1	1	0	0	0	0
21	0	0	1	1	1	1	1
22	0	0	0	1	1	0	1
23	0	1	1	0	0	1	0
24	1	0	1	0	0	0	0
25	1	1	0	1	0	1	0
26	0	0	1	0	0	0	0
27	1	1	0	0	0	0	0
28	0	0	1	0	0	1	0
29	1	1	0	1	0	0	0
30	1	0	0	0	0	1	1
31	0	0	1	0	0	0	1
32	1	0	0	0	0	0	0
33	1	1	0	0	0	1	0
34	0	0	0	0	0	0	1
35	1	0	1	0	1	0	0
36	1	0	0	0	1	0	0
37	1	1	0	1	0	1	1
38	1	0	0	0	0	0	0
39	1	0	0	1	0	1	0
40	0	0	0	1	0	0	0
41	1	0	0	0	0	0	0
42	0	0	1	0	1	1	0
43	1	0	1	1	0	0	1
44	0	1	0	1	1	0	0
45	0	0	0	0	0	0	1
46	1	1	1	0	1	0	0
47	1	0	0	0	0	0	1
48	0	0	1	0	1	1	0
50	1	0	0	0	0	0	0
57	1	0	0	0	0	0	0
59	1	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A14. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer ERIC, para bacterias Psicrófilas.

Posición	DCB-A 2188	DCB-A 2189	DCB-A 2196	DCB-A 2198	DCB-A 2210	DCB-A 2215	DCB-A 2217
10	0	1	0	0	0	0	0
11	0	1	0	0	0	1	0
12	0	1	0	0	0	0	0
14	1	0	0	0	1	0	0
18	1	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	1	0	0	0
20	0	1	0	0	1	1	0
21	0	1	0	0	0	0	0
22	0	0	0	1	0	0	0
23	1	0	0	0	1	1	0
24	1	1	0	0	1	0	1
25	0	1	0	0	0	0	0
26	0	0	0	1	1	1	0
27	0	1	1	0	0	1	1
28	1	1	0	0	0	0	0
29	0	1	1	0	0	0	0
30	1	0	0	1	0	0	1
31	0	1	0	0	0	1	0
32	0	0	1	1	0	0	1
33	0	0	1	0	1	1	0
34	1	0	1	0	0	0	0
35	1	0	0	1	0	1	0
36	0	0	0	1	1	0	0
37	1	1	1	0	0	1	0
38	0	0	1	0	0	0	0
39	1	0	1	1	0	1	1
41	0	0	1	1	0	0	0
42	1	0	0	0	1	0	0
43	0	0	1	0	1	0	1
44	1	1	1	1	0	1	0
45	0	0	0	1	1	0	1
46	0	1	1	1	1	0	1
47	0	0	0	1	1	0	1
48	1	1	1	0	0	0	0
50	0	0	0	1	0	0	1
51	0	0	0	1	0	0	0
52	0	0	0	1	0	0	0
53	0	0	0	1	0	0	1
55	0	0	1	0	0	0	1
56	0	0	0	1	0	0	1
57	0	0	0	0	0	0	1
58	0	0	0	1	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A15. Matriz de Datos Genotípicos de Bacterias Psicrófilas Obtenidos de rep – PCR con los Primer BOX, REP y ERIC.

Posición	DCB-A 2188	DCB-A 2189	DCB-A 2196	DCB-A 2198	DCB-A 2210	DCB-A 2215	DCB-A 2217
10	0	0	0	nd	0	0	0
11	0	0	0	nd	0	0	0
12	0	0	0	nd	0	0	0
13	0	0	0	nd	0	0	0
14	0	0	0	nd	0	0	0
15	0	0	0	nd	0	0	0
16	0	0	0	nd	0	0	0
17	0	0	0	nd	0	0	0
18	0	1	0	nd	0	0	0
19	0	0	1	nd	0	0	0
20	0	1	0	nd	1	0	1
21	0	0	1	nd	0	0	1
22	1	0	0	nd	0	1	0
23	0	0	0	nd	1	0	0
24	1	1	1	nd	0	0	0
25	1	0	0	nd	0	1	0
26	0	0	0	nd	0	1	0
27	1	1	1	nd	0	0	0
28	1	1	0	nd	1	1	1
29	1	0	0	nd	1	1	0
30	1	1	1	nd	0	0	0
31	0	1	1	nd	1	1	0
32	1	0	1	nd	0	0	1
33	0	1	0	nd	0	1	1
34	0	1	1	nd	0	0	1
35	1	0	0	nd	0	1	0
36	1	1	1	nd	1	1	0
37	1	1	1	nd	1	0	0
38	0	0	0	nd	0	0	1
39	1	0	0	nd	1	0	0
40	0	1	0	nd	0	0	0
41	0	1	1	nd	0	0	1
42	1	0	1	nd	1	0	0
43	0	1	1	nd	0	1	0
44	1	0	1	nd	0	0	1
45	0	1	0	nd	1	1	0
46	0	1	1	nd	0	0	0
47	1	0	0	nd	0	1	0
48	0	1	1	nd	0	0	0
49	0	1	0	nd	1	0	0
50	0	0	0	nd	1	1	0
51	0	1	0	nd	1	0	1
52	0	0	0	nd	0	1	0
53	0	0	0	nd	0	0	1
55	0	0	0	nd	0	0	0
56	0	0	0	nd	0	0	0
57	0	0	0	nd	0	0	0
58	0	0	0	nd	0	0	0
59	0	0	0	nd	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
13	0	1	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	1	0
15	1	0	0	0	0	0	0
16	0	1	0	0	0	1	0
17	1	1	0	0	0	0	0
18	1	0	0	0	0	1	0
19	0	1	0	0	0	0	0
20	0	1	1	0	0	0	0
21	0	0	1	1	1	1	1
22	0	0	0	1	1	0	1
23	0	1	1	0	0	1	0
24	1	0	1	0	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A15. Continuación.

Posición	DCB-A 2188	DCB-A 2189	DCB-A 2196	DCB-A 2198	DCB-A 2210	DCB-A 2215	DCB-A 2217
25	1	1	0	1	0	1	0
26	0	0	1	0	0	0	0
27	1	1	0	0	0	0	0
28	0	0	1	0	0	1	0
29	1	1	0	1	0	0	0
30	1	0	0	0	0	1	1
31	0	0	1	0	0	0	1
32	1	0	0	0	0	0	0
33	1	1	0	0	0	1	0
34	0	0	0	0	0	0	1
35	1	0	1	0	1	0	0
36	1	0	0	0	1	0	0
37	1	1	0	1	0	1	1
38	1	0	0	0	0	0	0
39	1	0	0	1	0	1	0
40	0	0	0	1	0	0	0
41	1	0	0	0	0	0	0
42	0	0	1	0	1	1	0
43	1	0	1	1	0	0	1
44	0	1	0	1	1	0	0
45	0	0	0	0	0	0	1
46	1	1	1	0	1	0	0
47	1	0	0	0	0	0	1
48	0	0	1	0	1	1	0
49	0	0	0	0	0	0	0
50	1	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0
57	1	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	0
59	1	0	0	0	0	0	0
10	0	1	0	0	0	0	0
11	0	1	0	0	0	1	0
12	0	1	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0
14	1	0	0	0	1	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0
18	1	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	1	0	0	0
20	0	1	0	0	1	1	0
21	0	1	0	0	0	0	0
22	0	0	0	1	0	0	0
23	1	0	0	0	1	1	0
24	1	1	0	0	1	0	1
25	0	1	0	0	0	0	0
26	0	0	0	1	1	1	0
27	0	1	1	0	0	1	1
28	1	1	0	0	0	0	0
29	0	1	1	0	0	0	0
30	1	0	0	1	0	0	1
31	0	1	0	0	0	1	0
32	0	0	1	1	0	0	1
33	0	0	1	0	1	1	0
34	1	0	1	0	0	0	0
35	1	0	0	1	0	1	0
36	0	0	0	1	1	0	0
37	1	1	1	0	0	1	0
38	0	0	1	0	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A15. Continuación.

Posición	DCB-A 2188	DCB-A 2189	DCB-A 2196	DCB-A 2198	DCB-A 2210	DCB-A 2215	DCB-A 2217
39	1	0	1	1	0	1	1
40	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	1	1	0	0	0
42	1	0	0	0	1	0	0
43	0	0	1	0	1	0	1
44	1	1	1	1	0	1	0
45	0	0	0	1	1	0	1
46	0	1	1	1	1	0	1
47	0	0	0	1	1	0	1
48	1	1	1	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	1	0	0	1
51	0	0	0	1	0	0	0
52	0	0	0	1	0	0	0
53	0	0	0	1	0	0	1
55	0	0	1	0	0	0	1
56	0	0	0	1	0	0	1
57	0	0	0	0	0	0	1
58	0	0	0	1	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A16. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de características fenotípicas de Bacterias Psicrófilas.

Característica ID		DCB-A 2188	DCB-A 2189	DCB-A 2196	DCB-A 2198	DCB-A 2210	DCB-A 2215	DCB-A 2217
Color de la colonia	Amarillo	1	1	1	1	0	0	0
	Tomate	0	0	0	0	1	1	1
Forma de la colonia	Circular	1	1	1	1	1	1	1
Elevación de la colonia	Plana	1	0	1	0	1	0	0
	Convexa	0	1	0	1	0	1	0
	Umbonada	0	0	0	0	0	0	1
Borde de la colonia	Entero	1	1	1	1	1	1	0
	Ondulado	0	0	0	0	0	0	1
Forma	Bacilos	0	0	1	1	1	1	1
	Cocos	1	1	0	0	0	0	0
Tinción de Gram	G+	1	1	1	1	1	1	1
	G-	0	0	0	0	0	0	0
Cápsulas	Presencia	0	0	1	0	1	1	1
Endosporas	Presencia	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A17. Grupos-Especie de Bacterias Psicrófilas Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos.

# de Grupos de ADN formados	ID Bacteria
1	DCB-A 2188
2	DCB-A 2189
3	DCB-A 2196
4	DCB-A 2198
5	DCB-A 2210
6	DCB-A 2215
7	DCB-A 2217

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Tabla A18. Grupos-Especie de Bacterias Psicrófilas Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos y Fenotípicos.

# de Grupos formados	ID Bacteria
1	DCB-A 2188
2	DCB-A 2189
3	DCB-A 2196
4	DCB-A 2198
5	DCB-A 2210
6	DCB-A 2215
7	DCB-A 2217

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Tabla A19. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer BOX, para bacterias con posible capacidad biorremediadora de suelos.

Posición	AX 19	AX 42	AX 58	AX 72	AX 76	AX 78	AX 31	AX 44	AX 81	AX 88	AX 64	AX 53	AX 14	AX 12	AX 87
15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
18	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
21	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
22	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
23	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
24	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
25	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
26	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
27	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
28	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
29	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
30	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
31	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
32	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
33	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
34	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
35	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
36	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
37	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
38	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
39	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0
40	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
41	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
42	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
43	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
44	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
45	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
46	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
48	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
49	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
50	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A20. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer REP, para bacterias con posible capacidad biorremediadora de suelos.

Posición	AX 19	AX 42	AX 58	AX 72	AX 76	AX 78	AX 31	AX 44	AX 81	AX 88	AX 64	AX 53	AX 12	AX 87
6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
11	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
21	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
27	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
28	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
29	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
30	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1
31	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
32	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0
33	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
35	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
36	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
37	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
38	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
39	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
40	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1
41	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
43	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
44	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
45	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
46	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
49	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A21. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer ERIC, para bacterias con posible capacidad biorremediadora de suelos.

Posición	AX 19	AX 42	AX 58	AX 72	AX 76	AX 78	AX 31	AX 44	AX 81	AX 88	AX 64	AX 53	AX 14	AX 12	AX 87
4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
12	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
13	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
16	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
17	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
18	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
19	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
20	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
21	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
23	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
24	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
27	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1
28	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
29	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
30	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
31	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
32	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
33	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
34	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1
35	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1
36	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
38	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
39	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
40	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
41	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
42	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
43	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
44	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
45	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0
46	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
47	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
48	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0
49	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
50	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
51	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
52	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
54	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
55	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
57	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A22. Matriz de Datos Genotípicos de Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo Obtenidos de rep – PCR con los Primer BOX, REP y ERIC.

Posición	AX 19	AX 42	AX 58	AX 72	AX 76	AX 78	AX 31	AX 44	AX 81	AX 88	AX 64	AX 53	AX 14	AX 12	AX 87
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
21	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
22	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
23	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
24	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
25	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
26	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
27	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
28	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
29	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
30	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
31	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
32	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
33	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
34	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
35	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
36	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
37	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
38	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
39	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0
40	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
41	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
42	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
43	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
44	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
45	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
46	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
48	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
49	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
50	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A22. Continuación

Posición	AX 19	AX 42	AX 58	AX 72	AX 76	AX 78	AX 31	AX 44	AX 81	AX 88	AX 64	AX 53	AX 14	AX 12	AX 87
6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	nd	1	0
10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	1	0
11	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
12	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	nd	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	1	0
15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	nd	0	0
17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
18	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	nd	0	0
19	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
20	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	nd	0	0
21	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
23	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
25	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	nd	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	nd	1	0
27	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	nd	0	1
28	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	nd	0	0
29	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	1
30	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	nd	1	1
31	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	nd	1	0
32	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	nd	0	0
33	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	nd	0	0
34	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	nd	0	1
35	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	nd	1	0
36	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	nd	0	0
37	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	nd	1	1
38	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	nd	0	0
39	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	nd	0	0
40	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	nd	1	1
41	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	nd	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	nd	0	1
43	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	nd	1	0
44	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	nd	0	0
45	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	nd	0	0
46	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
47	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
48	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	nd	0	0
49	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
52	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
54	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0
4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A22. Continuación

Posición	AX 19	AX 42	AX 58	AX 72	AX 76	AX 78	AX 31	AX 44	AX 81	AX 88	AX 64	AX 53	AX 14	AX 12	AX 87
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
12	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
13	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
16	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
17	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
18	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
19	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
20	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
21	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
23	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
24	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
27	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
28	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
29	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
30	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
31	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
32	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
33	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
34	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1
35	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1
36	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
38	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
39	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
40	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
41	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
42	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
43	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
44	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
45	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0
46	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
47	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
48	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0
49	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
50	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
51	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
52	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
54	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
55	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
57	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A23. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de características fenotípicas de Bacterias con posible capacidad Bioremediadora de Suelos Contaminados con petróleo.

Característica		AX 19	AX 42	AX 58	AX 72	AX 76	AX 78	AX 31	AX 44	AX 81	AX 88	AX 64	AX 53	AX 14	AX 12	AX 87
Color de la colonia	Amarillo	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
	Blanco	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
	Crema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tomate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Forma colonia	Irregular	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	Circular	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Elevación de la colonia	Convexa	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
	Plana	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
Borde de la colonia	Entero	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
	Lobado	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	Ondulado	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
Forma	Cocos	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bacilos	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Tinción de Gram	G+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	G-	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Cápsulas	Presencia	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
Endosporas	Presencia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A24. Grupos-Especie de Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos.

# de Grupos de ADN formados	ID Bacteria
1	AX 19
	AX 53
	AX 76
2	AX 81
3	AX 42
5	AX 72
6	AX 14
7	AX 12
	AX 64
	AX 78
	AX 88
8	AX 31
9	AX 87
10	AX 58

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Tabla A25. Grupos-Especie de Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos y Fenotípicos.

# de Grupos formados	ID Bacteria
1	AX 19
2	AX 53 AX 76
3	AX 81
4	AX 42
5	AX44
6	AX 72
7	AX 14
8	AX 12 AX 64 AX 78 AX 88
9	AX 31
10	AX 87
11	AX 58

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Tabla A26. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer BOX, para actinomicetes productores de antibióticos.

Posición	431	440	460	464	483	221	287	310	332	279	399	405	452	270	408
6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
12	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
13	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
14	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
15	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
16	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
17	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
18	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
19	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
20	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
21	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0
22	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
23	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
24	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
25	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
26	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
27	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
28	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
29	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
30	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
31	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
32	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
34	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
35	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
36	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
37	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
38	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
40	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
45	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
46	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A27. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de bandas en los fingerprintings de rep-PCR, con el primer ERIC, para actinomicetes productores de antibióticos.

Posición	431	440	460	483	221	287	310	332	279	399	405	452	270	408
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
16	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
18	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
20	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
21	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
22	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
23	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
24	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
25	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
26	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
27	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
28	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0
29	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
30	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
31	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
32	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
34	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
35	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
36	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
38	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
39	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
40	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
42	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
43	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
44	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
45	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
48	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
49	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
50	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
53	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A28. Matriz de Datos Genotípicos de Actinomicetes Productores de Antibióticos Obtenidos de rep – PCR con los Primer BOX y ERIC.

Posición	431	440	460	464	483	221	287	310	332	279	399	405	452	270	408
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
12	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
13	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
14	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
15	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
16	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
17	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
18	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
19	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
20	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
21	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0
22	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
23	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
24	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
25	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
26	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
27	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
28	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
29	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
30	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
31	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
32	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
34	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
35	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
36	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
37	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
38	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
40	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
45	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
46	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
10	0	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
11	0	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
12	0	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
13	0	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
14	0	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	nd	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	nd	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
18	0	0	0	nd	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	1	nd	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
20	0	0	1	nd	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A28. Continuación

Posición	431	440	460	464	483	221	287	310	332	279	399	405	452	270	408
21	0	0	0	nd	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
22	0	1	1	nd	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
23	0	1	1	nd	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
24	1	0	1	nd	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
25	0	1	0	nd	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
26	1	0	0	nd	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
27	1	0	0	nd	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
28	0	1	1	nd	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0
29	0	0	1	nd	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
30	1	0	0	nd	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
31	0	0	1	nd	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
32	0	0	1	nd	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	1	nd	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
34	1	0	0	nd	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
35	1	0	1	nd	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
36	1	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
37	0	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	nd	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
39	0	1	0	nd	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
40	0	0	0	nd	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
41	0	0	0	nd	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
42	0	1	0	nd	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
43	0	0	1	nd	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
44	0	0	0	nd	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
45	0	0	0	nd	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
46	0	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	nd	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
49	0	0	0	nd	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
50	0	0	0	nd	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	nd	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	nd	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
53	1	0	0	nd	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
54	0	0	0	nd	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
56	0	0	0	nd	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	1	nd	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A29. Matriz basada en la interpretación de presencia o ausencia de características fenotípicas de Actinomicetes Productores de Antibióticos.

Característica		DCB- A 431	DCB- A 440	DCB -A 460	DCB- A 464	DCB -A 483	DCB- A 221	DCB -A 287	DCB -A 310	DCB- A 332	DCB -A 279	DCB -A 399	DCB -A 405	DCB -A 452	DCB -A 270	DCB- A 408
Micelio aéreo	Blanco	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
	Gris	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	Verde	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Micelio de sustrato	Gris	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Café	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
	Beige	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
	Crema	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Rosado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pigmento	Presencia	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Cadena de esporas	Incompleta	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Recta	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
	Espiral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Tabla A30. Grupos-Especie de Actinomicetes Productores de Antibióticos Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos.

# de Grupos de ADN formados	ID Actinomicete
1	DCB-A 431
2	DCB-A 405 DCB-A 460
3	DCB-A 483
4	DCB-A 332 DCB-A 440
5	DCB-A 279
6	DCB-A 270
7	DCB-A 221
8	DCB-A 452
9	DCB-A 464
10	DCB-A 408
11	DCB-A 310
12	DCB-A 287
13	DCB-A 399

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Tabla A31. Grupos-Especie de Actinomicetes Productores de Antibióticos Obtenidos a Partir de Datos Genotípicos y Fenotípicos.

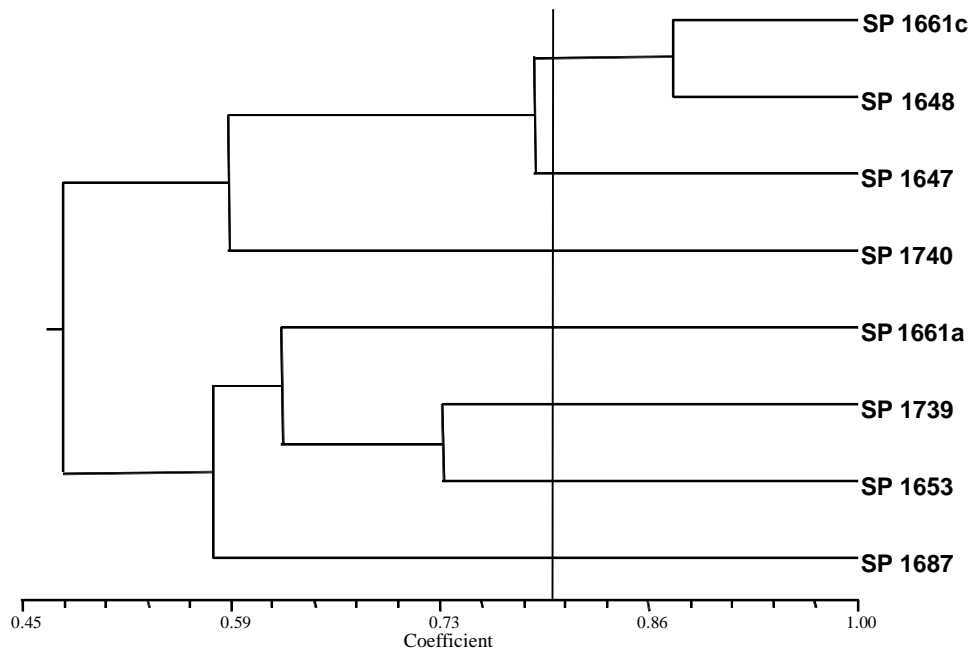
# de Grupos formados	ID Actinomicete
1	DCB-A 431
2	DCB-A 405 DCB-A 460
3	DCB-A 483
4	DCB-A 332
5	DCB-A 440
6	DCB-A 279
7	DCB-A 270
8	DCB-A 221
9	DCB-A 452
10	DCB-A 464
11	DCB-A 408
12	DCB-A 310
13	DCB-A 287
14	DCB-A 399

Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

ANEXO B

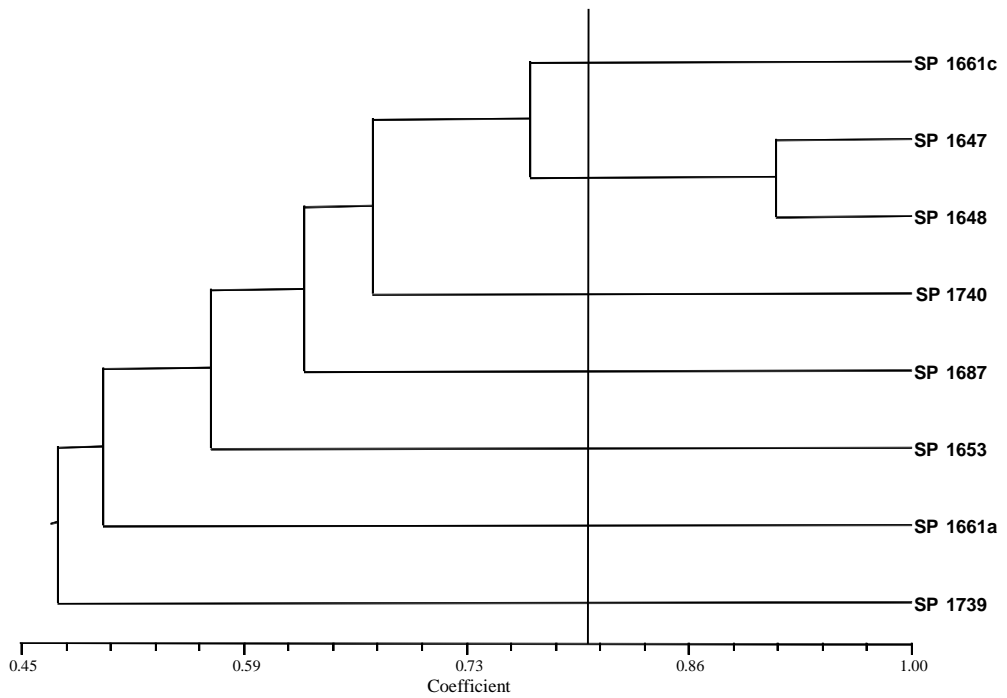
ANÁLISIS DE RESULTADOS

Figura B1. Dendrograma BOX – PCR de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo, similitud al 80%



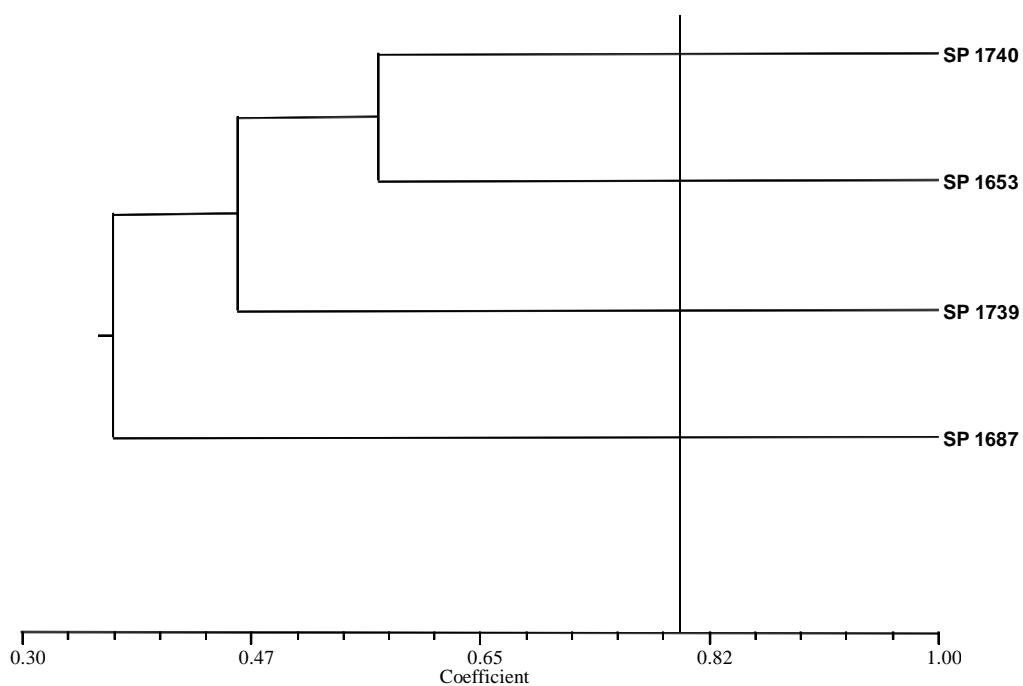
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura B2. Dendrograma REP – PCR de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo, similitud al 80%



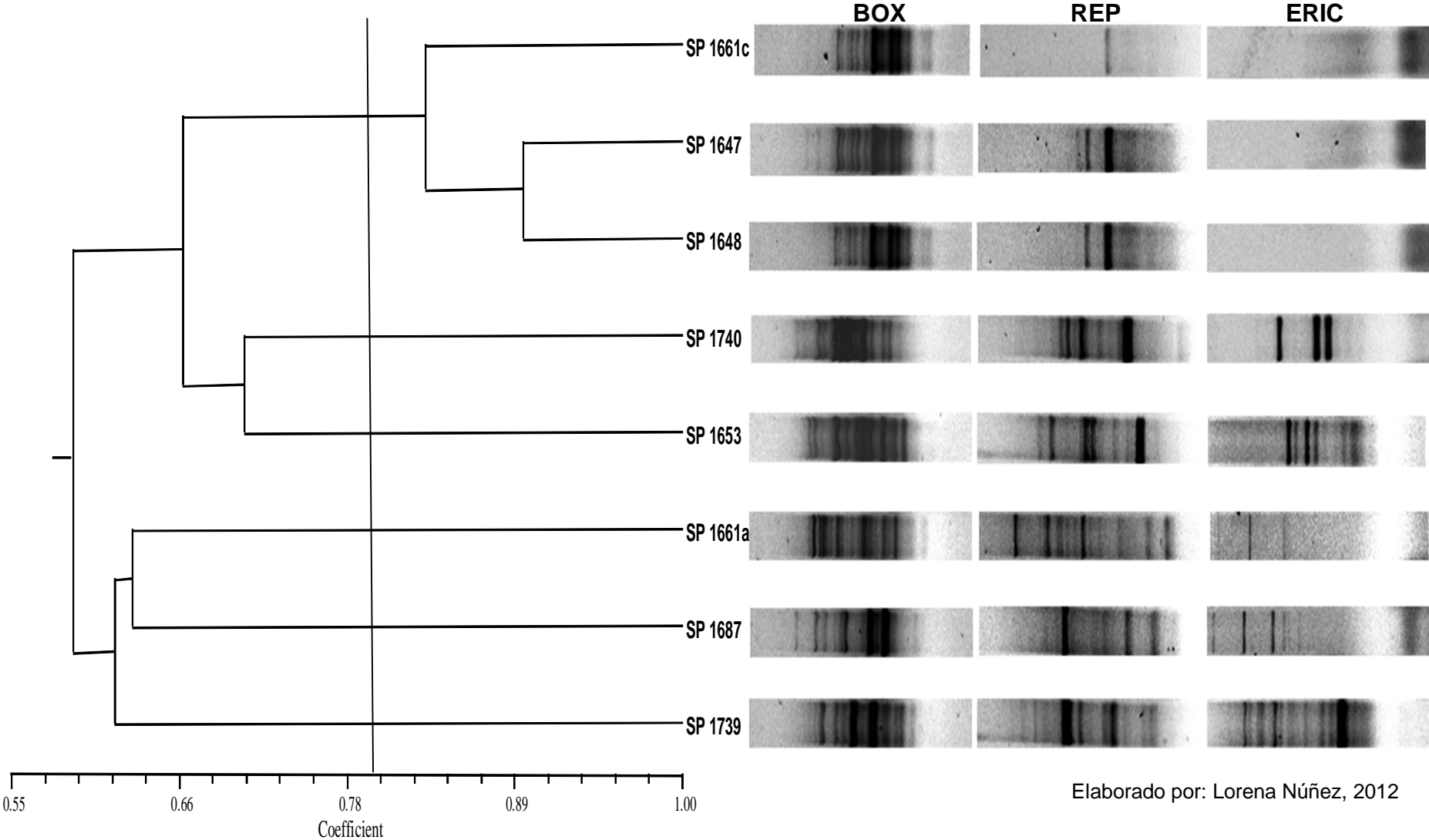
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura B3. Dendrograma ERIC – PCR de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo, similitud al 80%



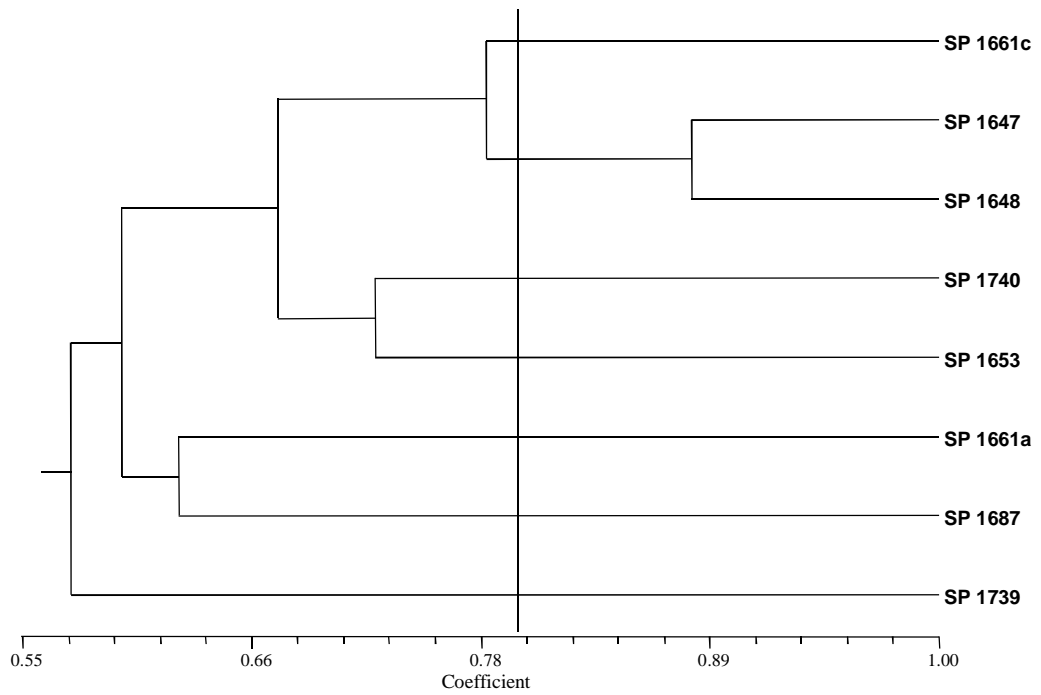
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura B4. Dendrograma completo rep - PCR de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo, similaridad al 80%.



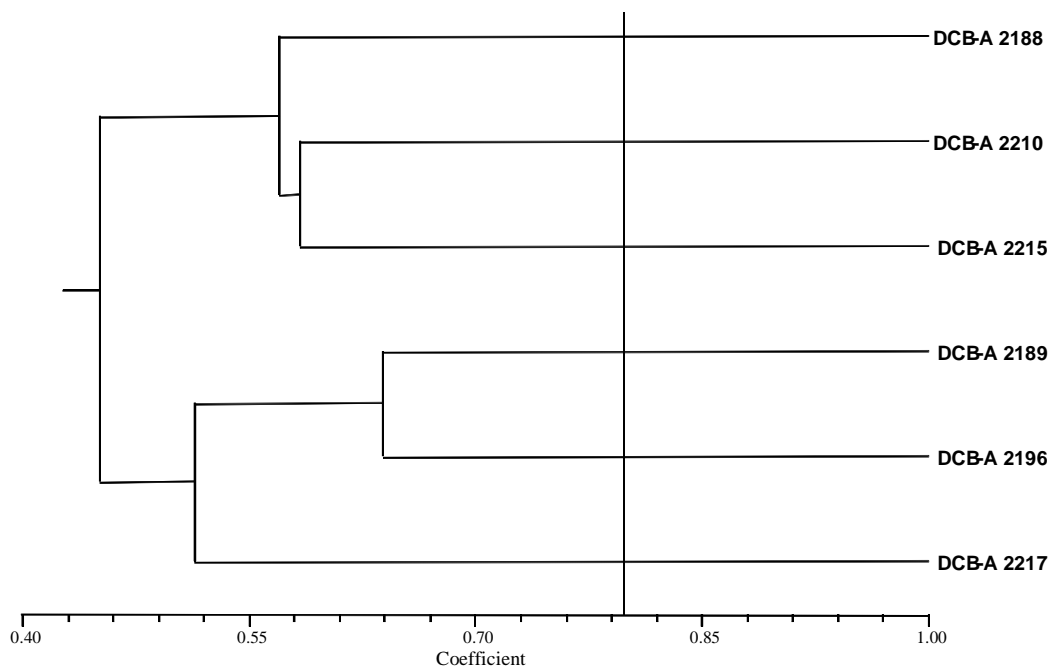
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Figura B5. Dendrograma con características Genotípicas y Fenotípicas de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo.



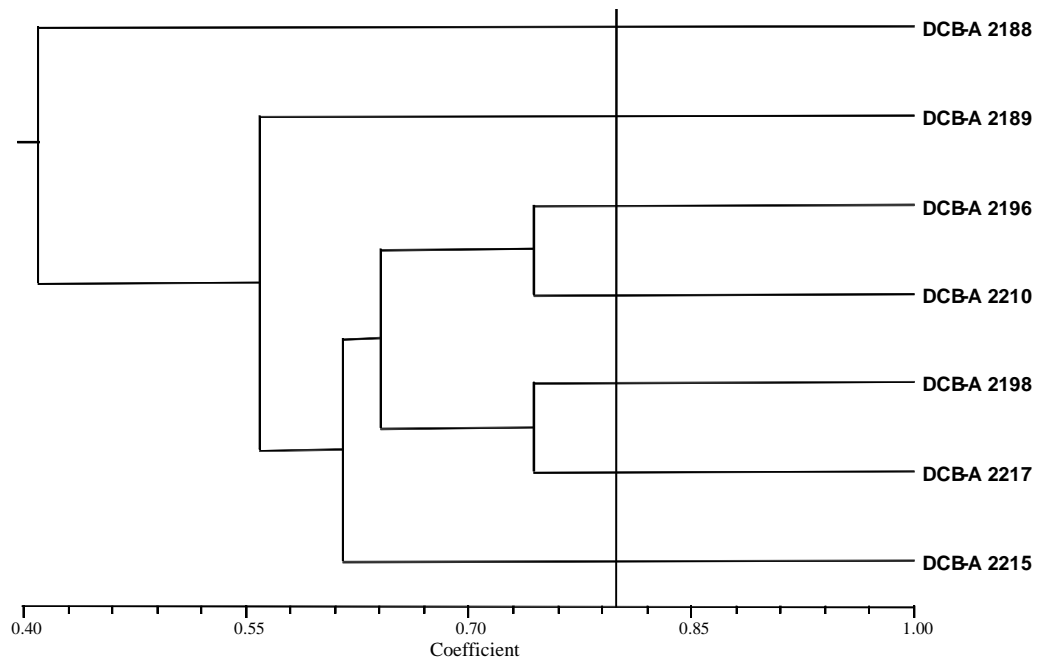
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Figura B6. Dendrograma BOX – PCR de Bacterias Psicrófilas, similitud al 80%



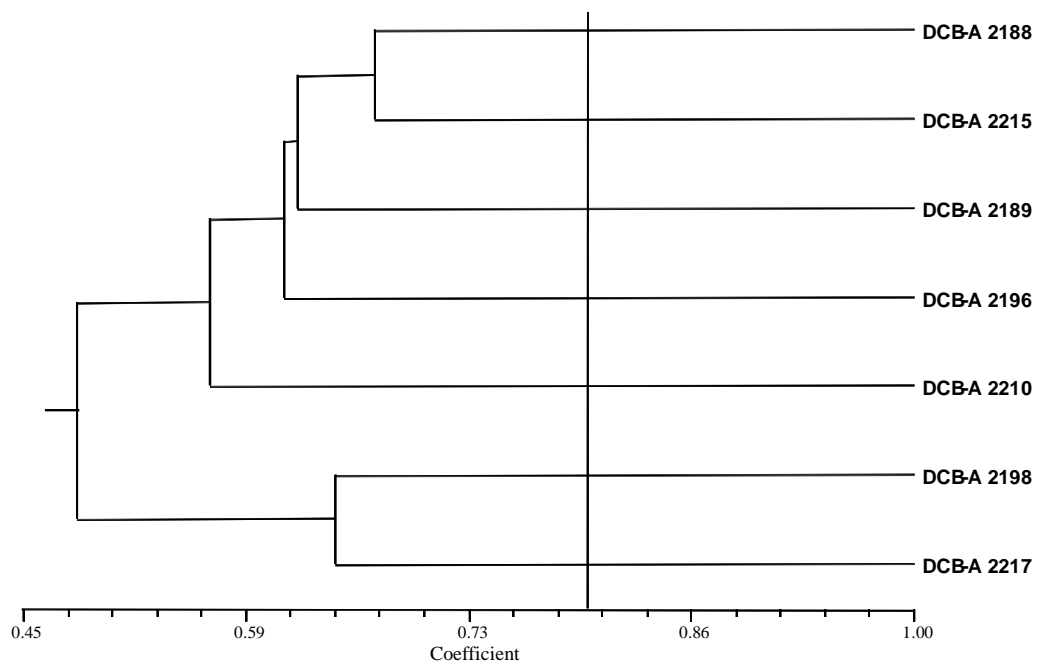
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Figura B7. Dendrograma REP – PCR de Bacterias Psicrófilas, similaridad al 80%.



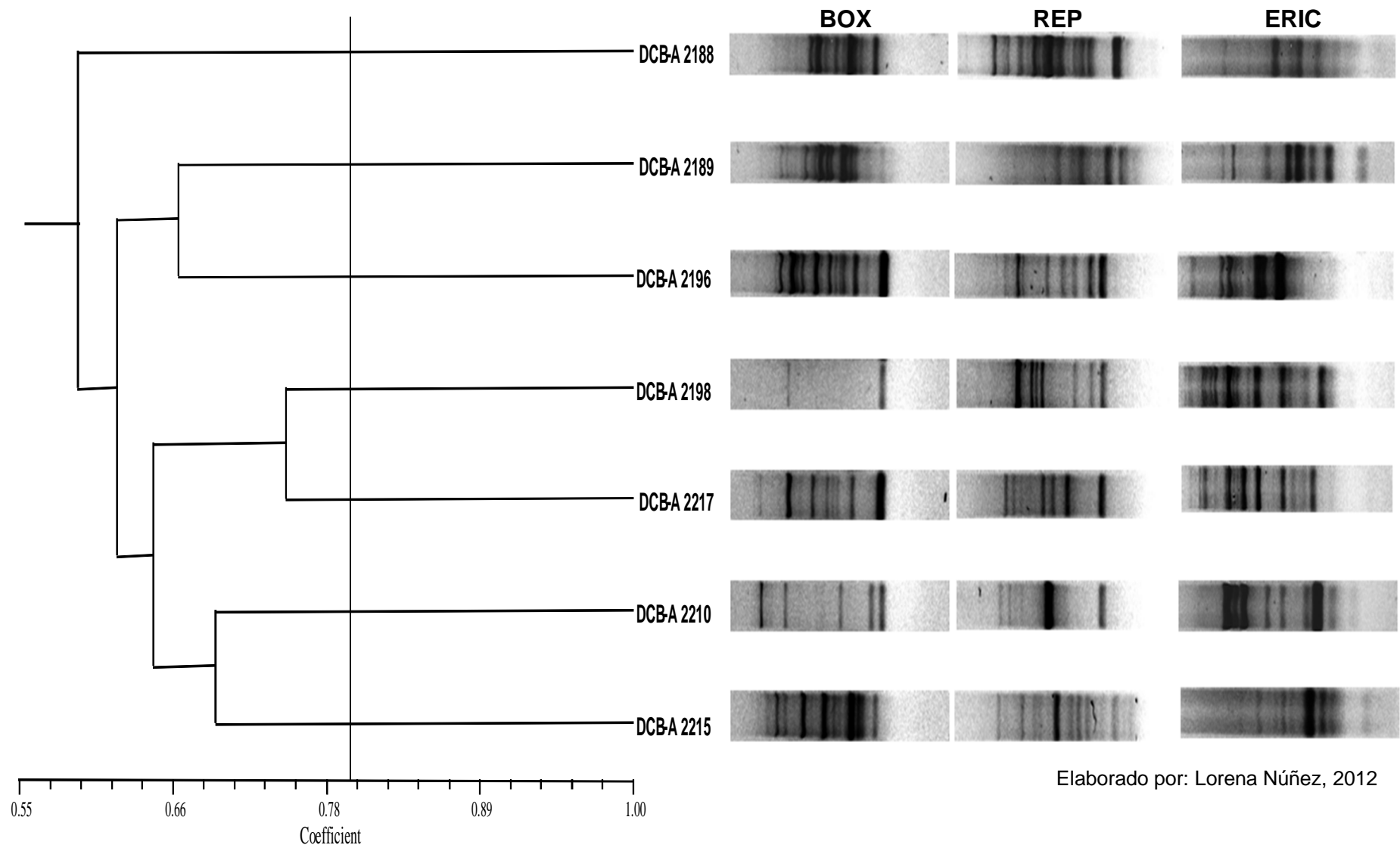
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Figura B8. Dendrograma ERIC – PCR de Bacterias Psicrófilas, similaridad al 80%



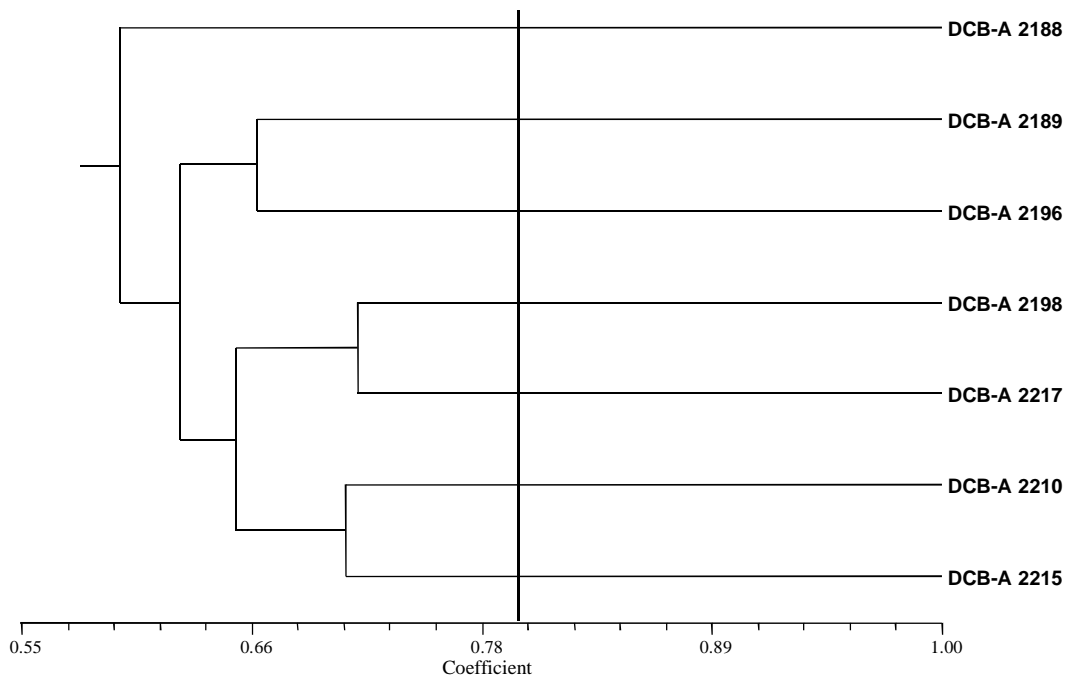
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Figura B9. Dendrograma completo rep - PCR de Bacterias Psicrófilas, similitud al 80%.



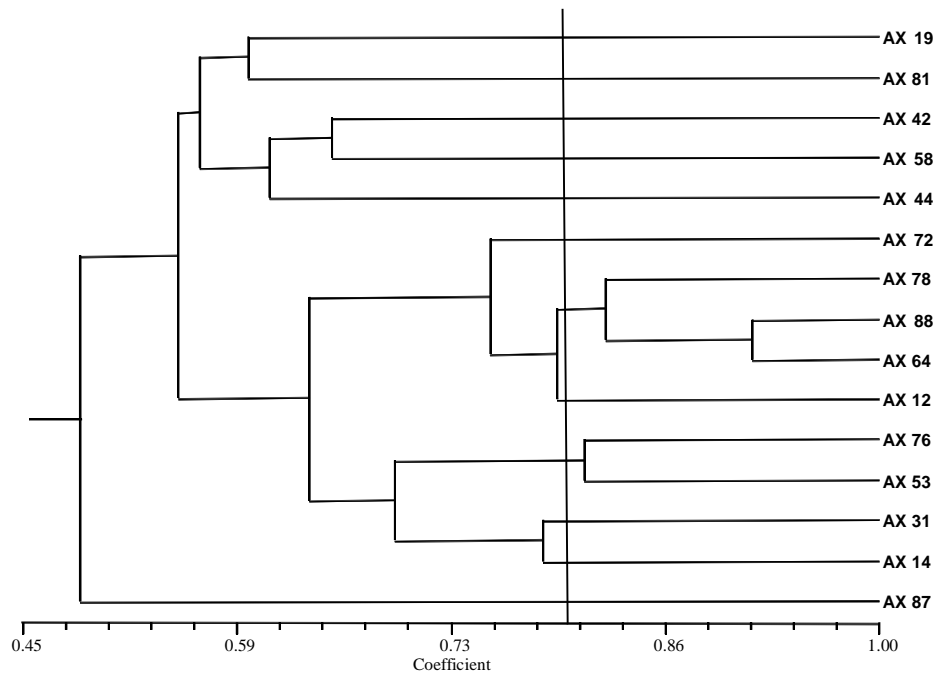
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Figura B10. Dendrograma con Características Genotípicas y Fenotípicas de Bacterias Psicrófilas.



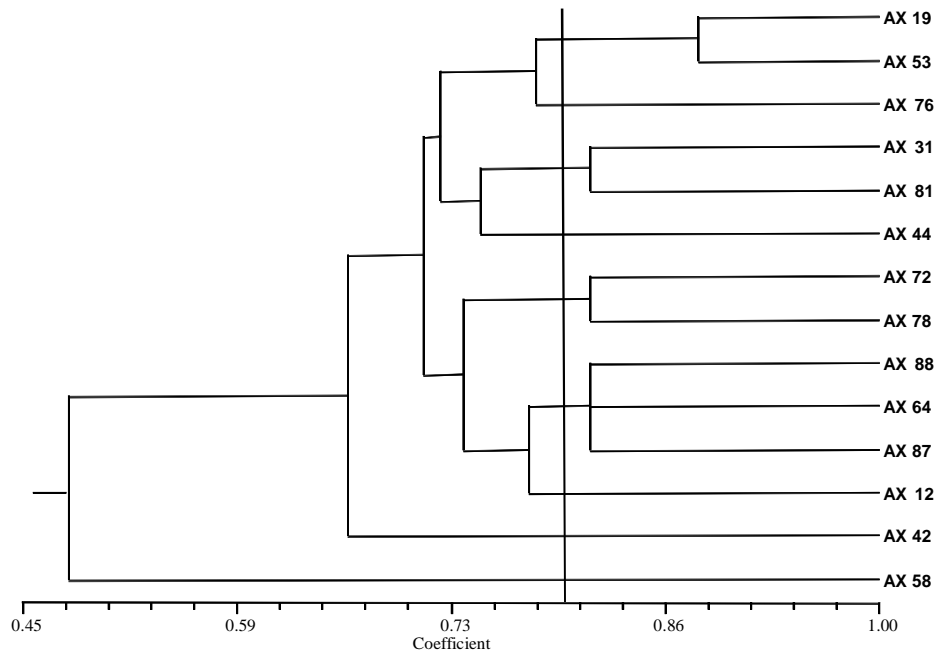
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Figura B11. Dendrograma BOX – PCR de Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo, similaridad al 80%.



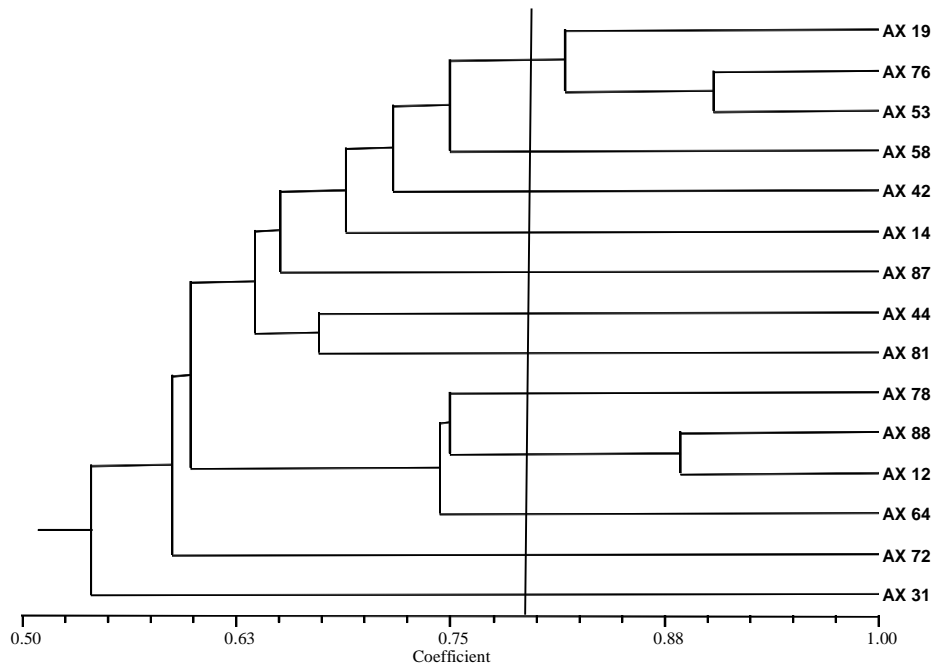
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012

Figura B12. Dendrograma REP – PCR Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo, similaridad al 80%.



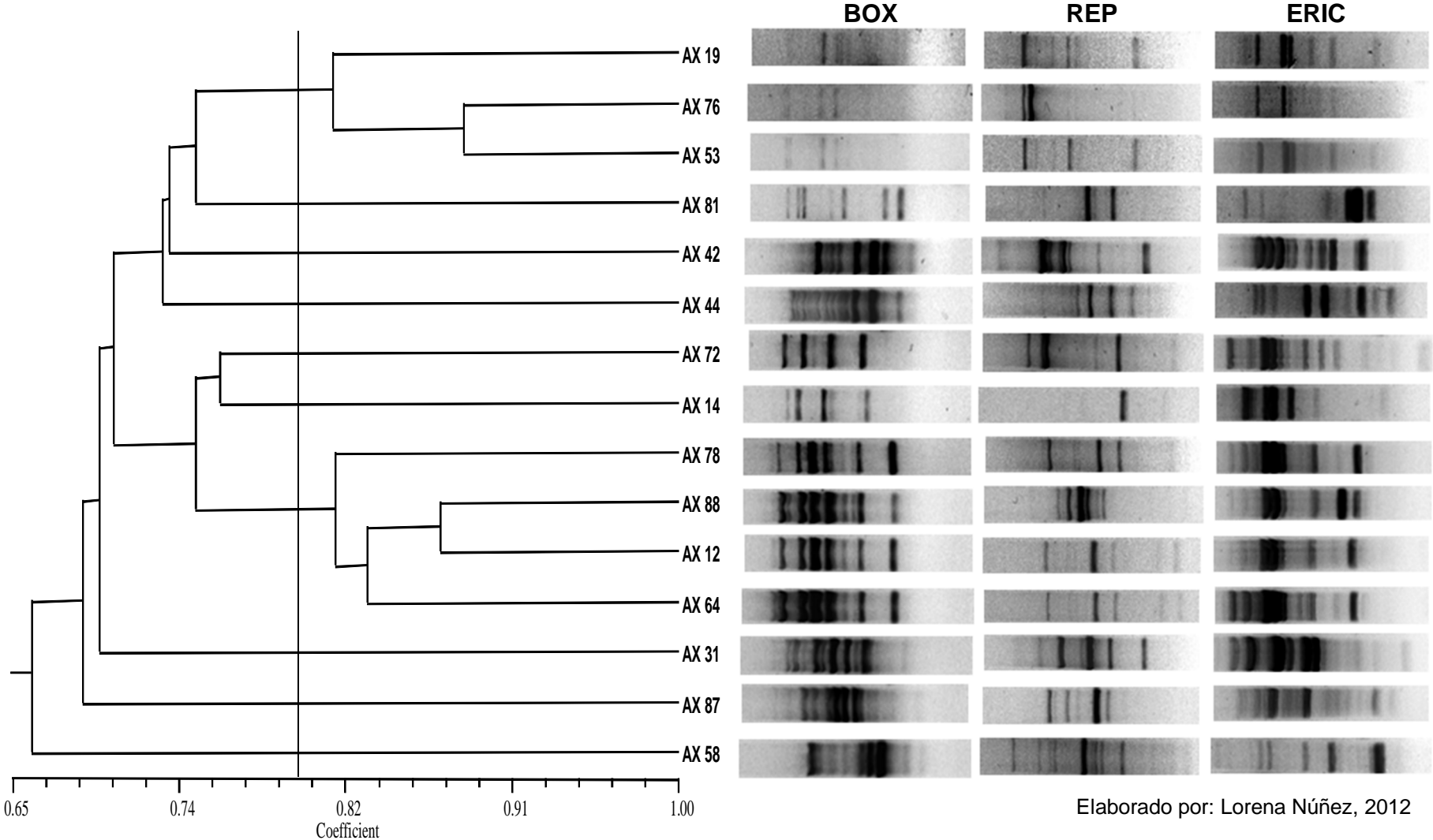
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura B13. Dendrograma ERIC – PCR Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo, similaridad al 80%



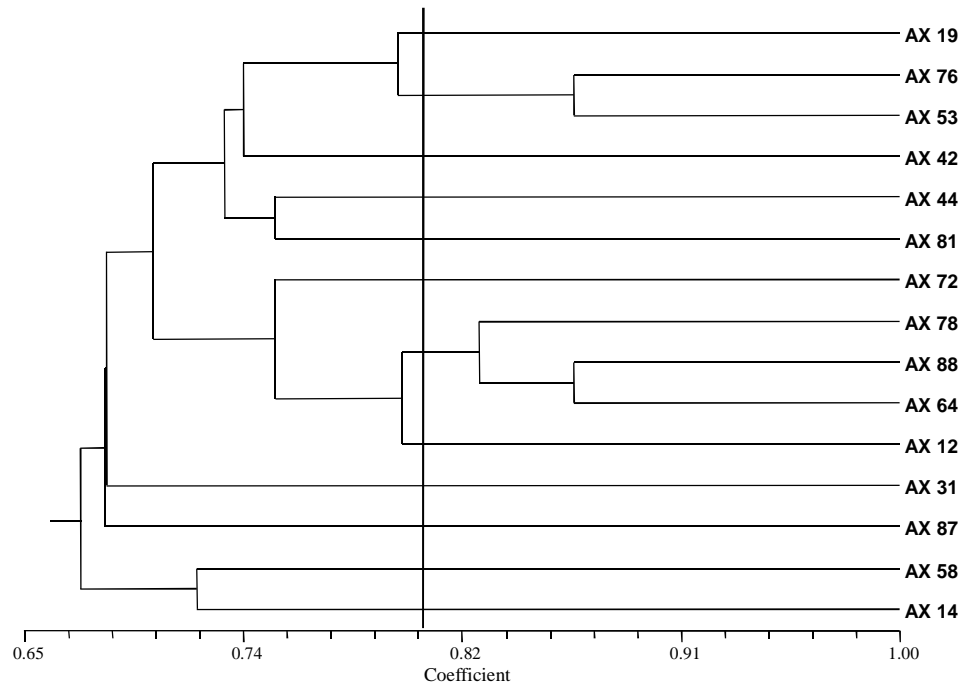
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura B14. Dendrograma completo rep - PCR de Bacterias Biorremedadoras de Suelos Contaminados con Petr3leo, similaridad al 80%.



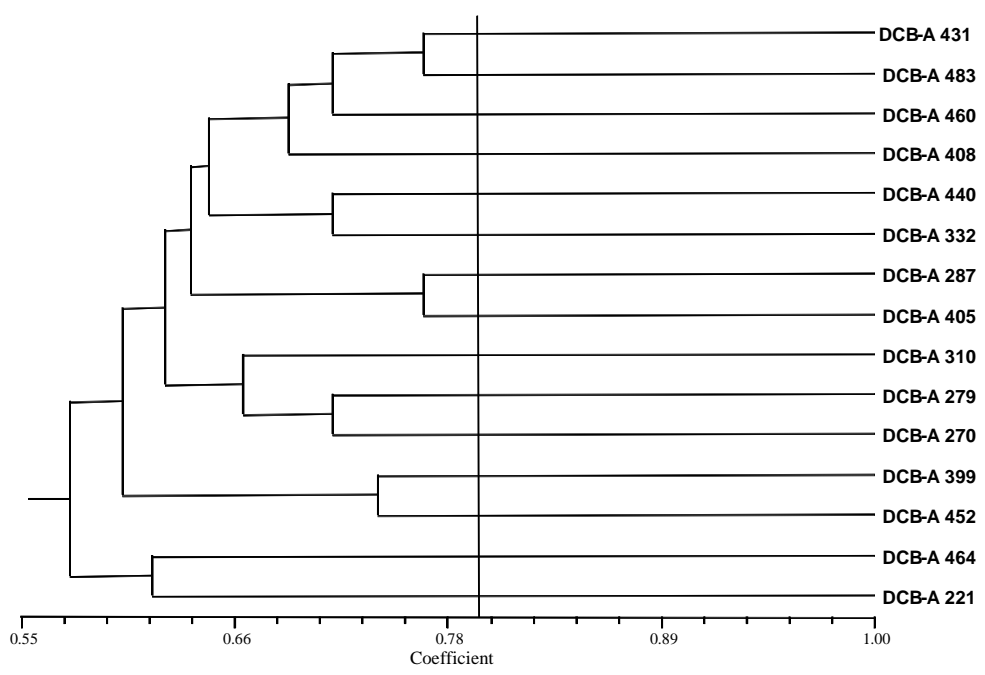
Elaborado por: Lorena N3ñez, 2012

Figura B15. Dendrograma con Características Genotípicas y Fenotípicas de Bacterias con posible capacidad Biorremediadora de Suelos Contaminados con Petróleo.



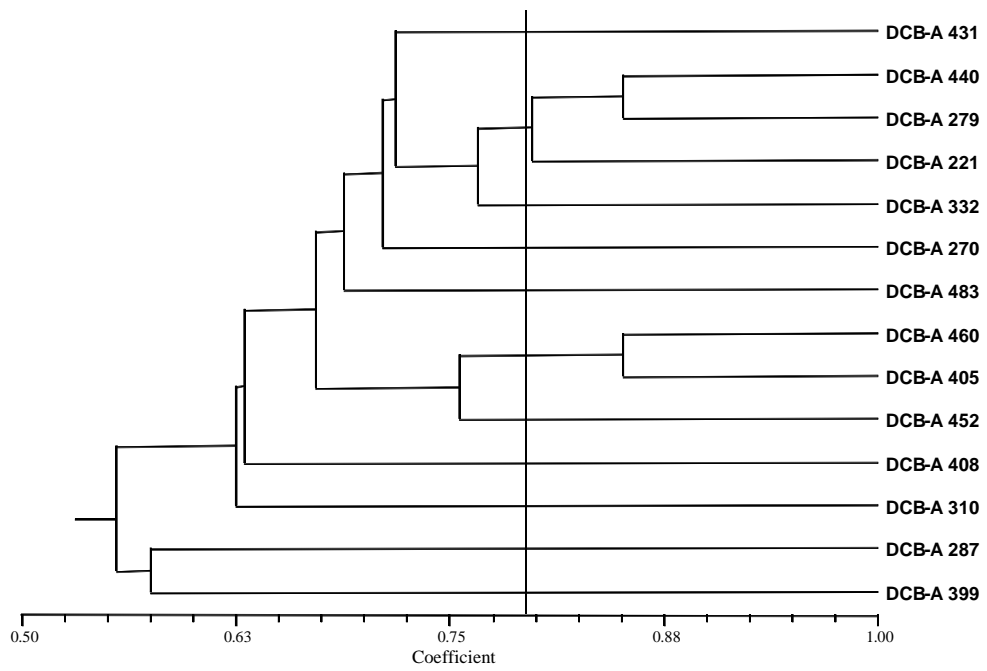
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura B16. Dendrograma BOX – PCR de Actinomicetes Productores de Antibióticos, similitud al 80%.



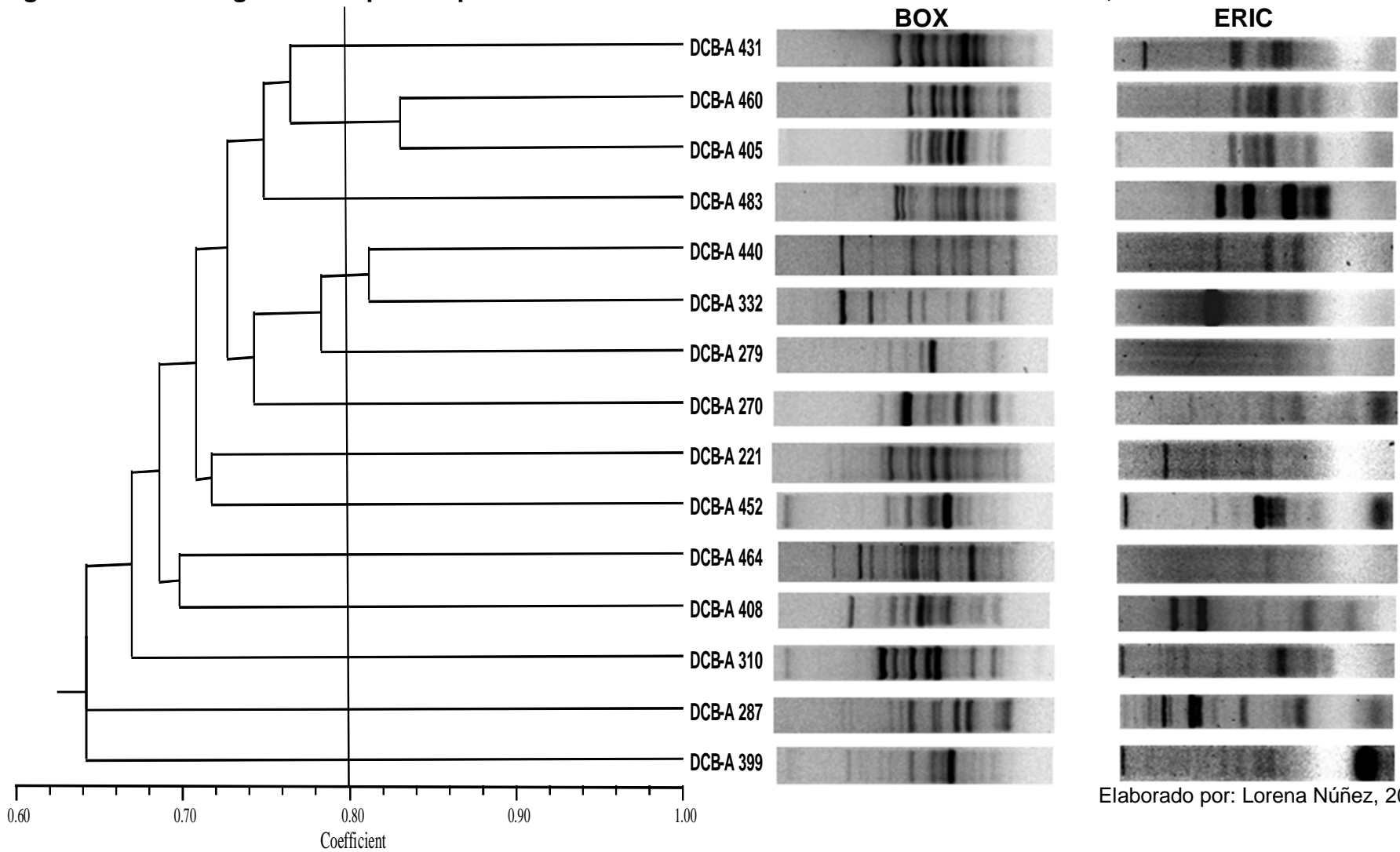
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura B17. Dendrograma ERIC – PCR de Actinomicetes Productores de Antibióticos, similitud al 80%



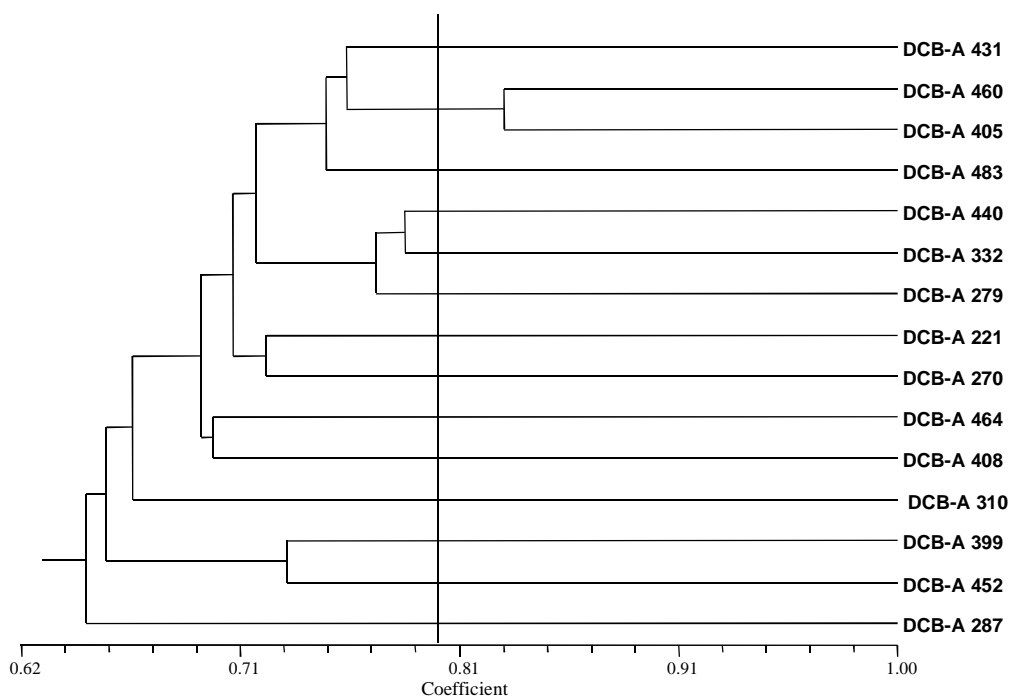
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura B18. Dendrograma completo rep - PCR de Actinomicetes Productores de Antibióticos, similaridad al 80%.



Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura B19. Dendrograma con Características Genóticas y Fenóticas de Actinomicetes Productores de Antibióticos.

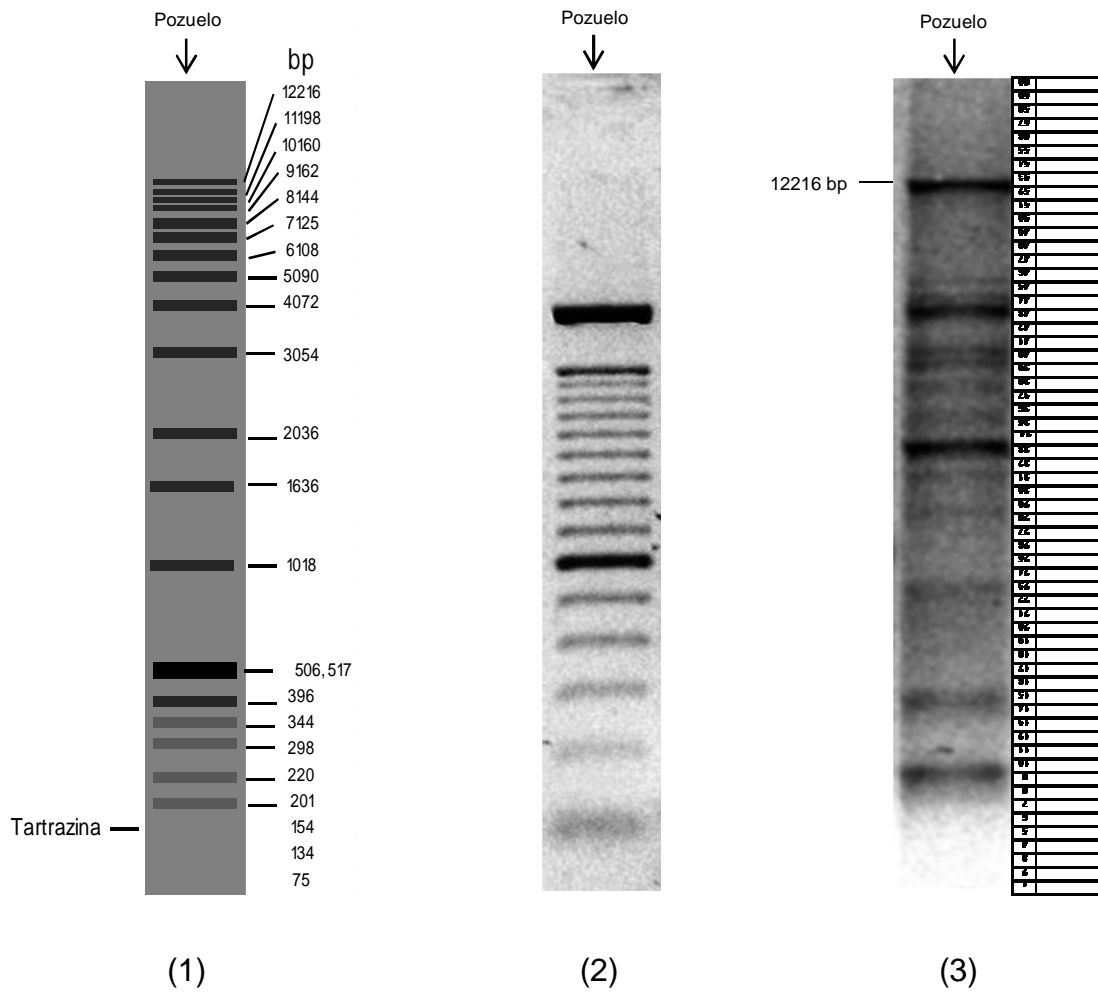


Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

ANEXO C

GRÁFICOS

Figura C1. Tamaño y Posición de las Bandas de ADN.

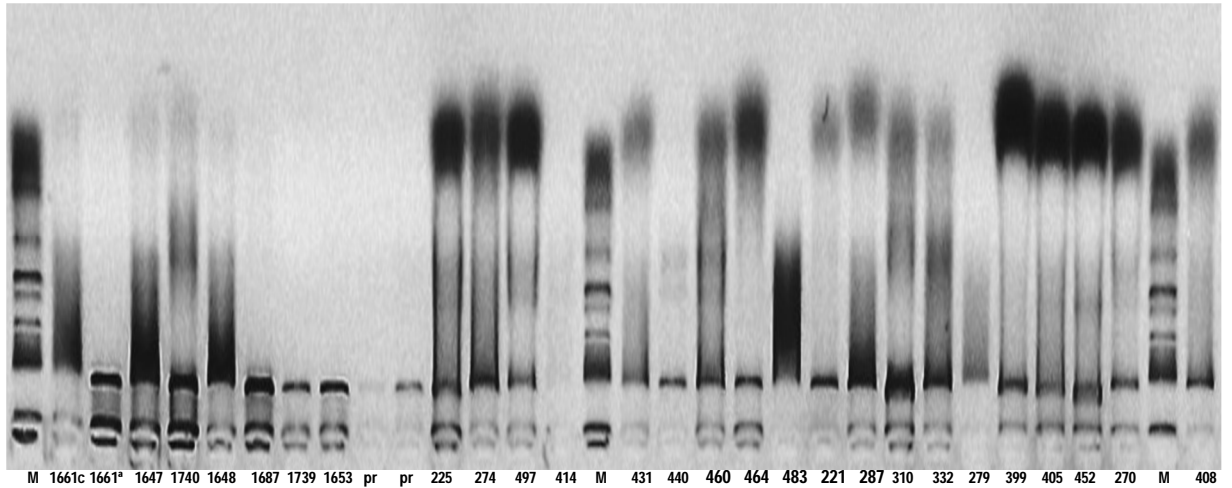


Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

- (1). 1kb ADN Ladder búfer, usado en determinación de ADN
- (2). 100bp Ladder búfer, usado en rep – PCR
- (3). Patrón para determinación de posición de bandas de ADN en los fingerprintings de rep - PCR

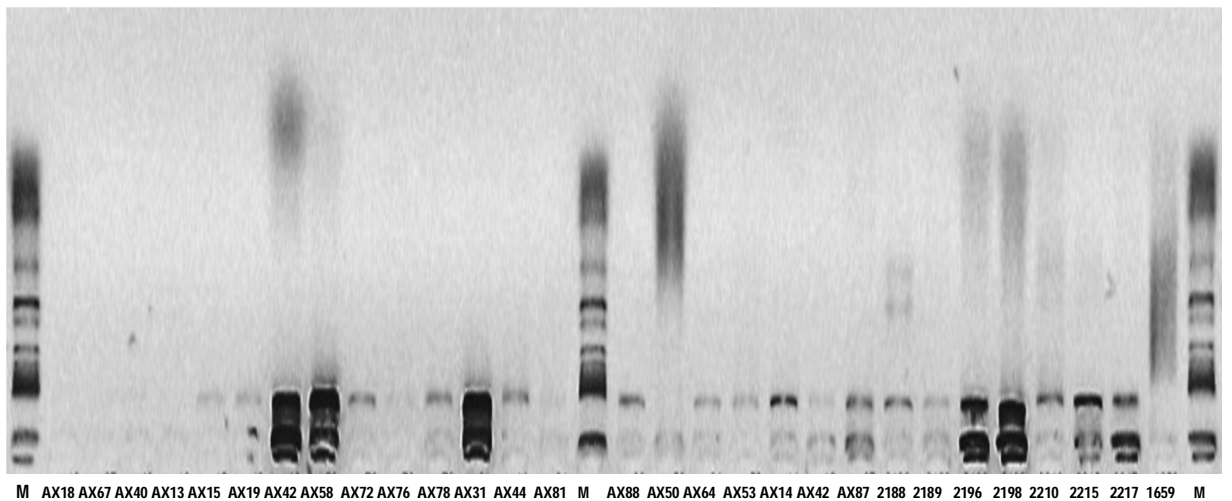
- Todas las fotografías de electroforesis en geles de agarosa para la determinación de la cantidad, integridad y pureza de ADN genómico y de los fingerprintings obtenidos por rep – PCR se realizaron en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales (ESPOCH).

Figura C2. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (I).



Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura C3. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (II).

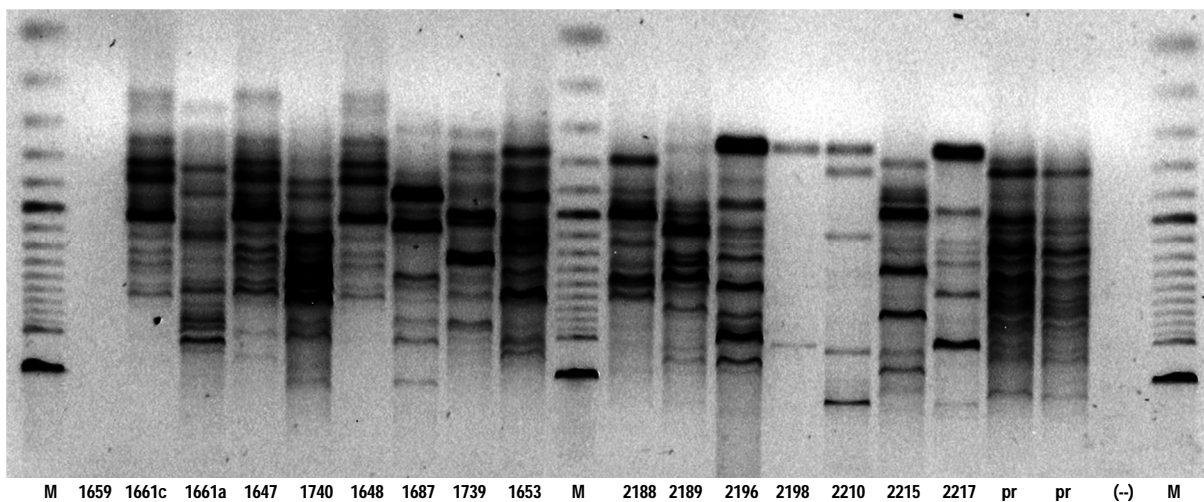


Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

* M: 1Kb ADN Ladder búfer

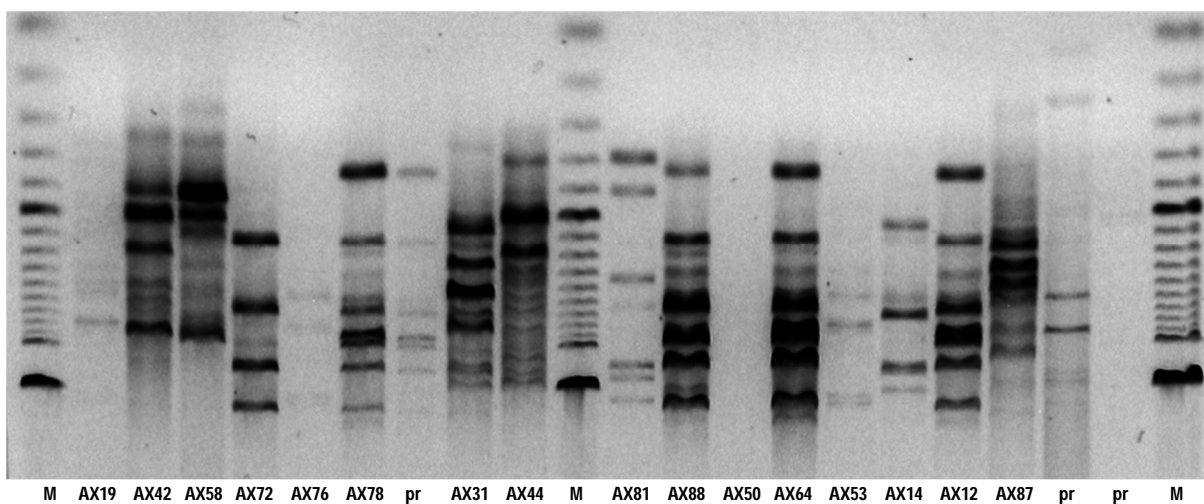
* pr: pruebas de laboratorio

Figura C4. Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer BOX (I).



Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura C5. Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer BOX (II).



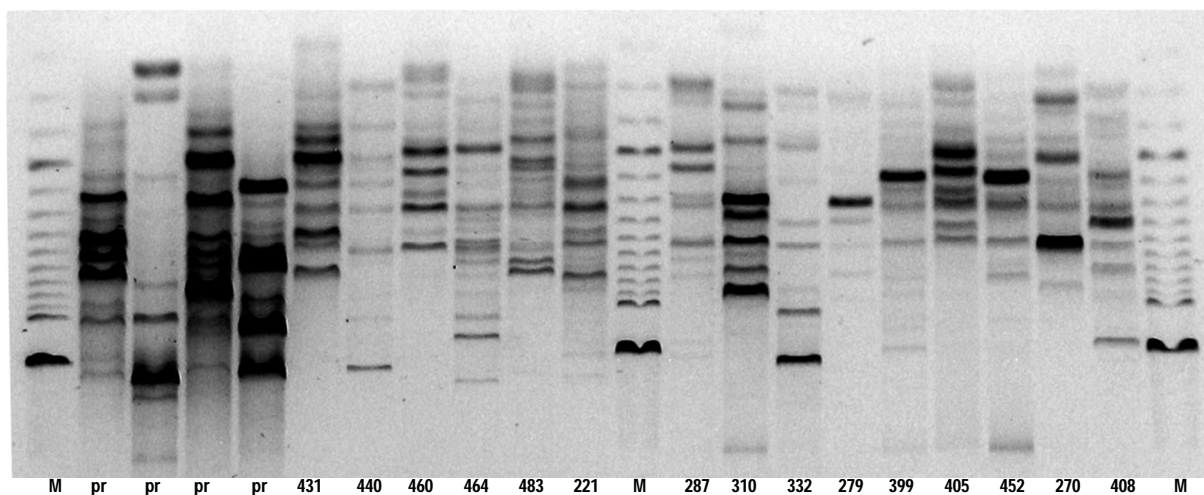
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

* M: 100bp ADN Ladder

* pr: pruebas de laboratorio

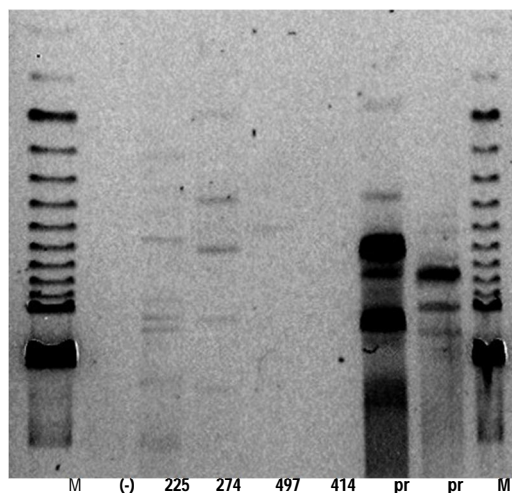
* (-): control negativo

Figura C6. Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer BOX (III).



Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

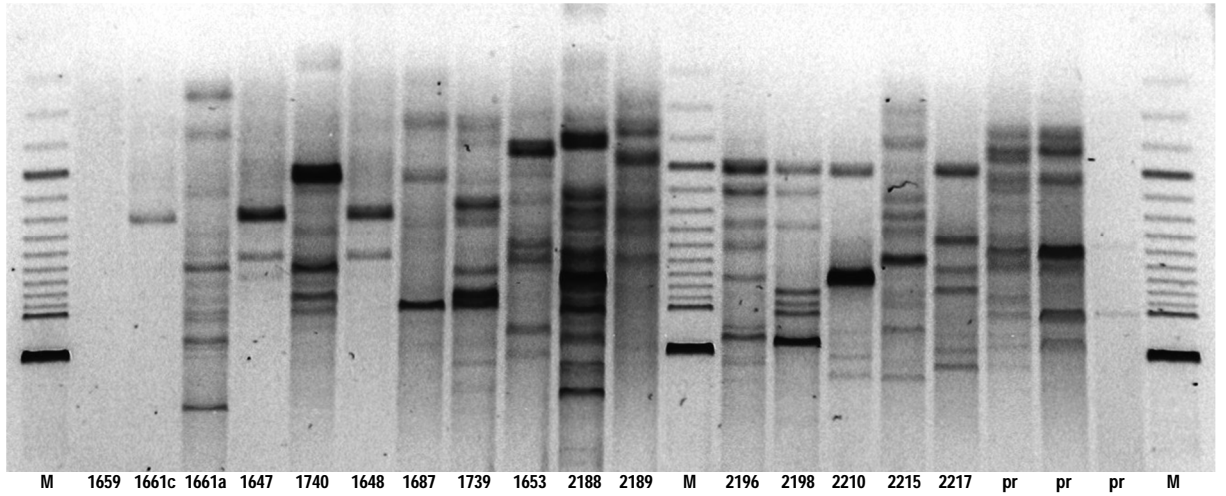
Figura C7. Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer BOX (IV).



Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

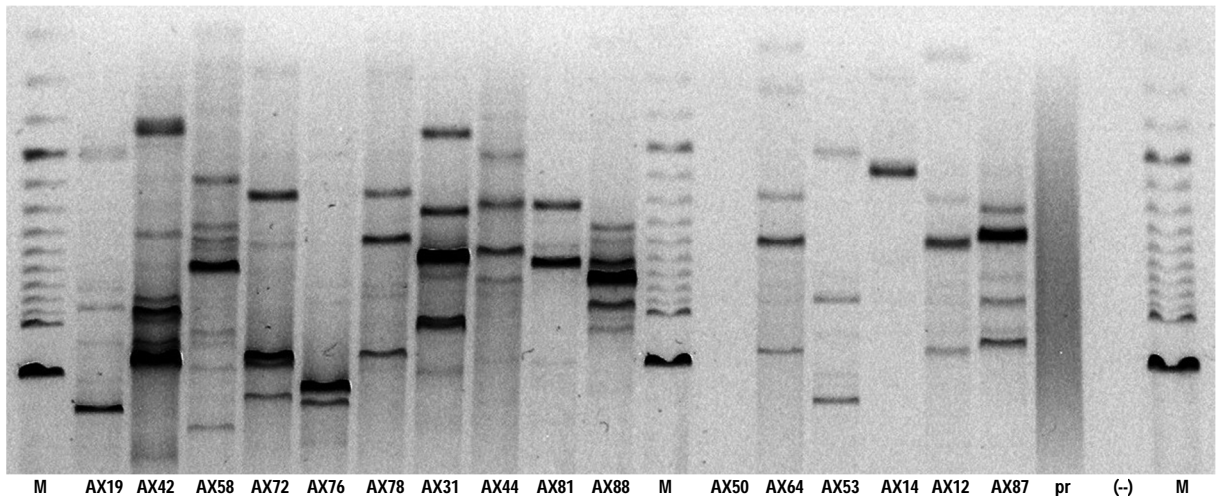
- * M: 100bp ADN Ladder
- * pr: pruebas de laboratorio
- * (-): control negativo

Figura C8. Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer REP (I).



Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura C9. Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer REP (II).



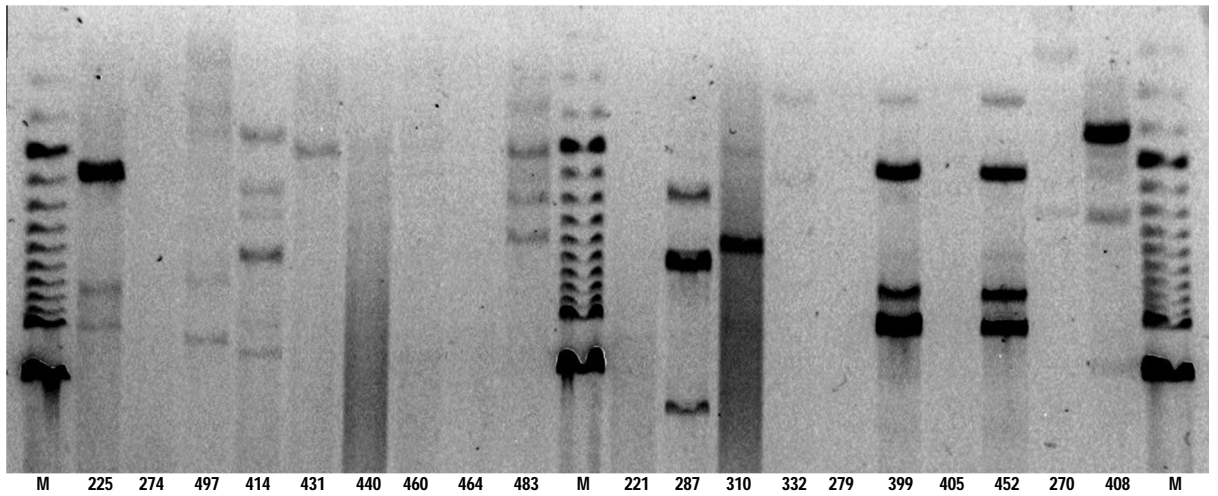
Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

* M: 100bp ADN Ladder

* pr: pruebas de laboratorio

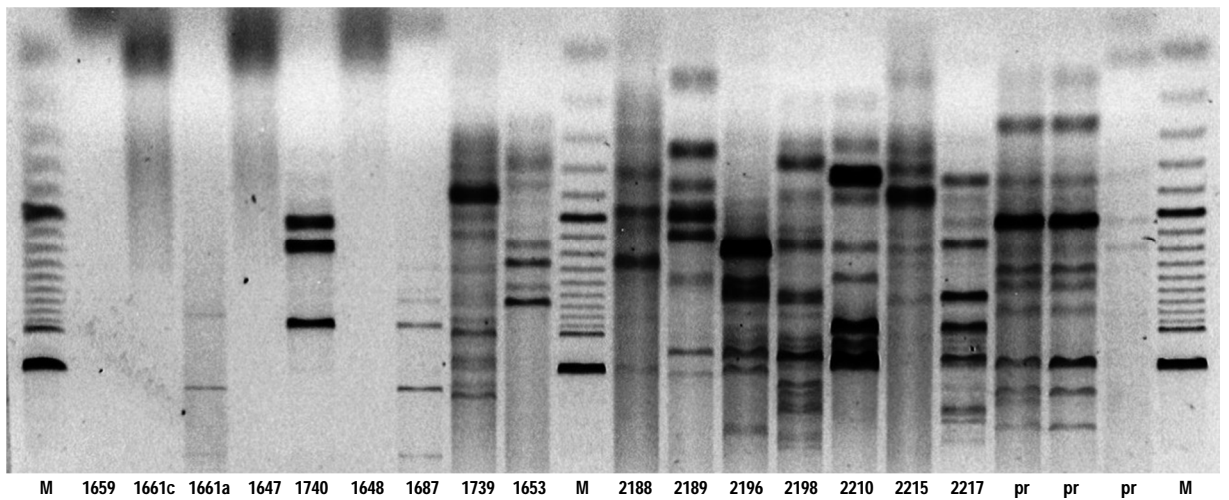
* (-): control negativo

Figura C10. Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer REP (III).



Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

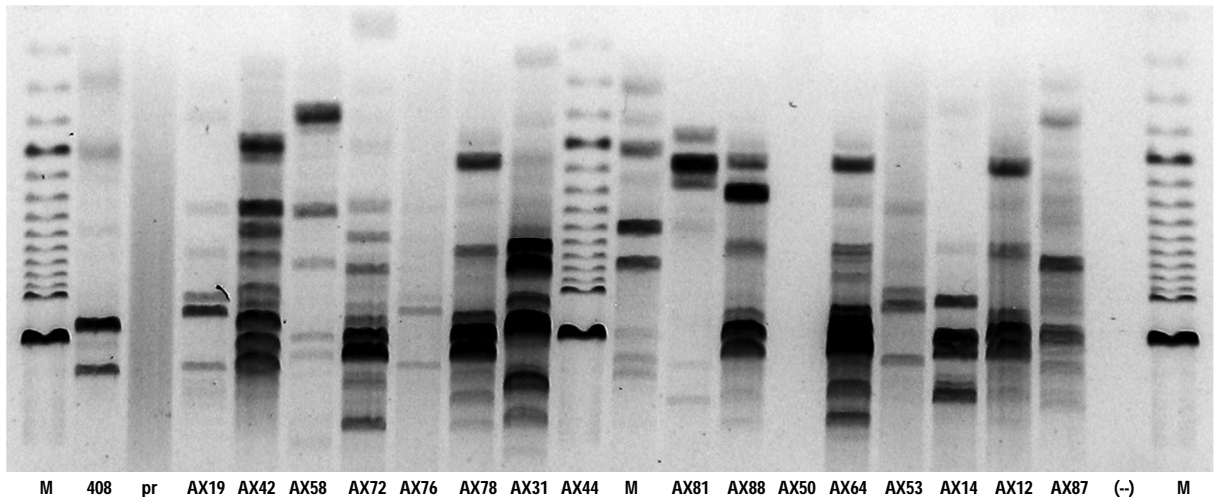
Figura C11. Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer ERIC (I).



Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

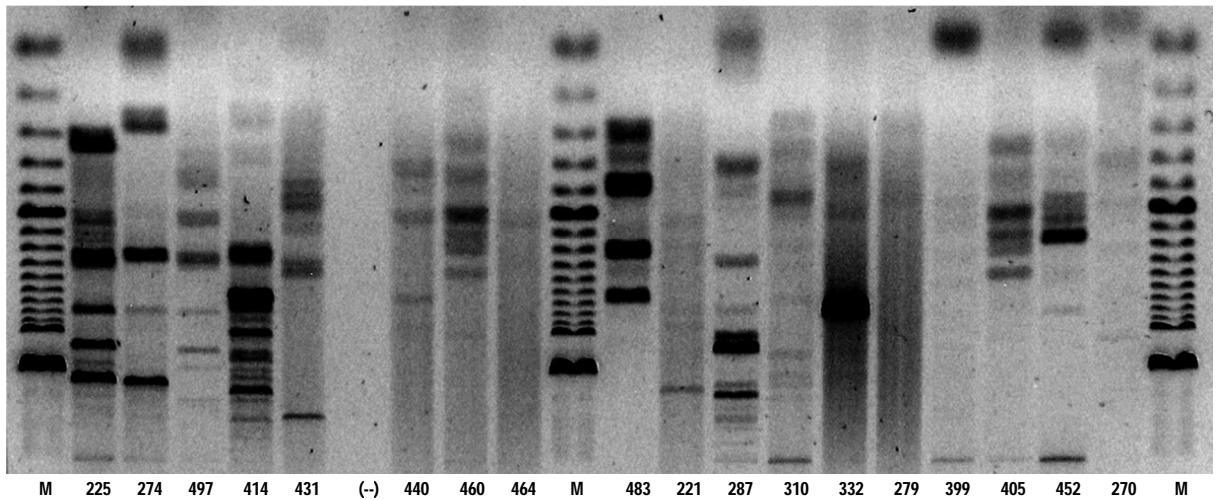
- * M: 100bp ADN Ladder
- * pr: pruebas de laboratorio
- * (-): control negativo

Figura C12. Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer ERIC (II).



Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

Figura C13. Fotografía en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep – PCR con el primer ERIC (III).



Elaborado por: Lorena Núñez, 2012.

- * M: 100bp ADN Ladder
- * pr: pruebas de laboratorio
- * (-): control negativo

ANEXO D

MEDIOS DE CULTIVO Y

SOLUCIONES

MEDIOS DE CULTIVO

Agar no Esporulante

Casaminoácidos	20 g
Almidón soluble	20 g
Extracto de levadura	4 g
Agar	15 g
Agua	1000 ml

Agar Gym

Glucosa	4 g
Extracto de levadura	10 g
Extracto de malta	10 g
CaCO₃	2
Agar	15 g
Agua	1000 ml

Agar Avena

Avena	20 g
Solución de sales traza	1ml
Agar	15 g
Agua	1000 ml

SOLUCIONES PARA TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Búfer de extracción de ADN

Glucosa	50 mM
Tris HCl pH 8	25 mM
EDTA pH8	10 mM

Preparar 100 ml de cada una de las soluciones por separado y esterilizar a 121°C por 2 minutos. Hacer una solución stock de glucosa 0,5 M. para el búfer Tris – HCl preparar una solución stock 1M y para en búfer EDTA una solución stock 0,5 M. una vez esterilizados, mezclar los volúmenes adecuados para obtener 100 ml de búfer de extracción.

Búfer TE 1X

Tris - HCl pH 8	10 mM
EDTA pH8	1 mM

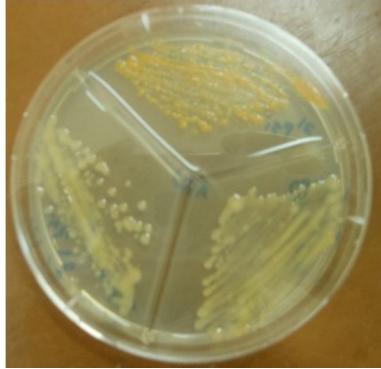
Búfer TBE 10X

Tris HCl pH 8	108 gr
Ácido bórico	55 gr
EDTA pH8	7,4 gr
Agua destilada	1000ml

ANEXO E
FOTOGRAFÍAS

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Caracterización Macroscópica

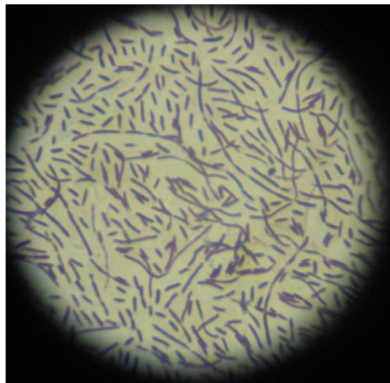


Bacterias (Agar Nutritivo)

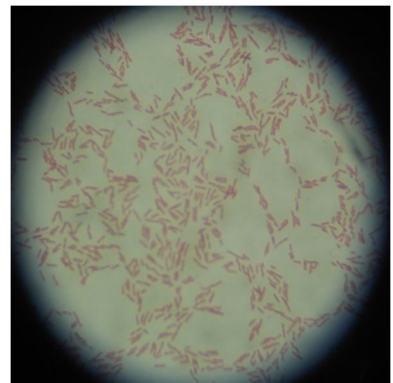


Actinomicetes (GYM)

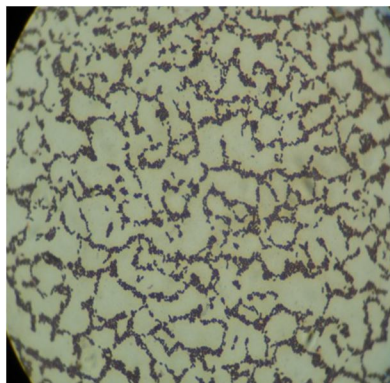
Caracterización Microscópica Bacterias



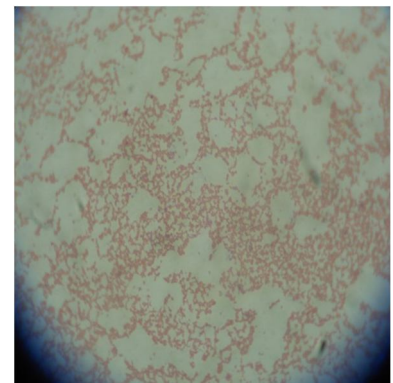
Bacilos G+



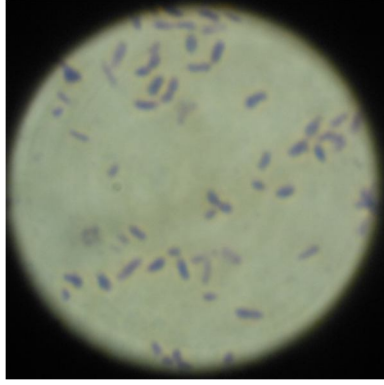
Bacilos G-



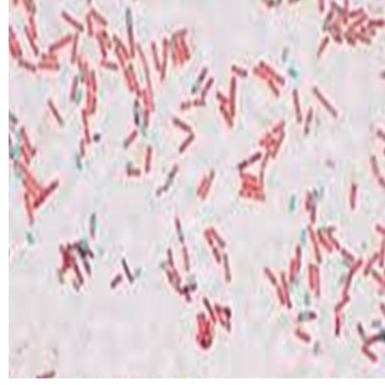
Cocos G+



Cocos G-



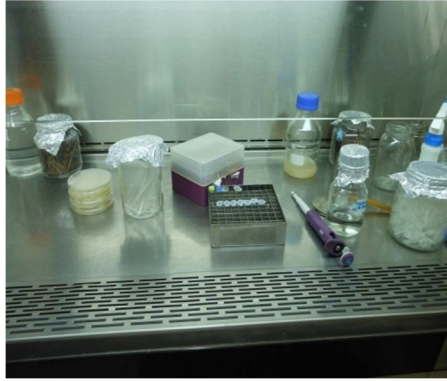
Cápsulas



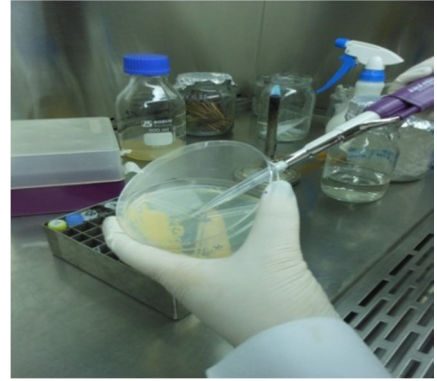
Endosporas

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

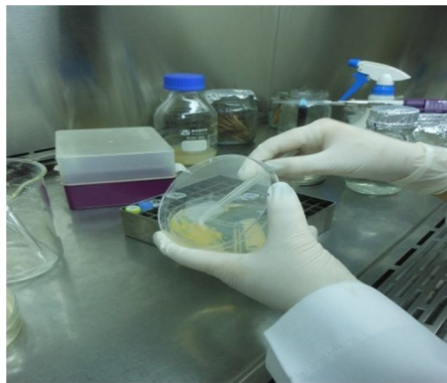
Extracción de ADN



Paso 1



Paso 2



Paso 3



Paso 4



Paso 5



Paso 6



Paso 7



Paso 8



Paso 9



Paso 10



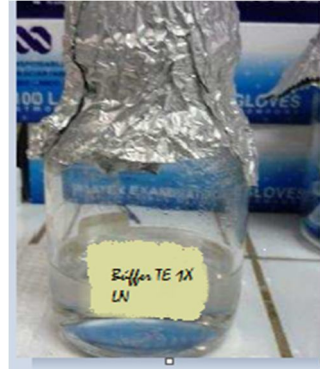
Paso 10



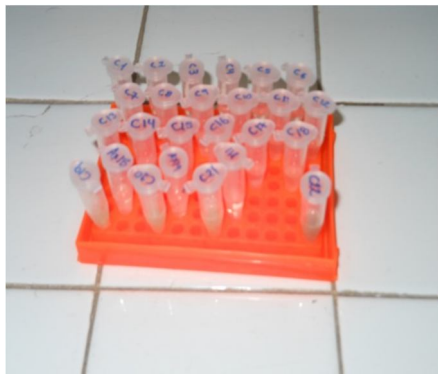
Paso 11



Paso 12



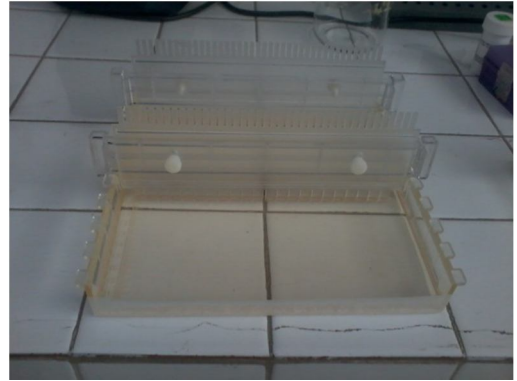
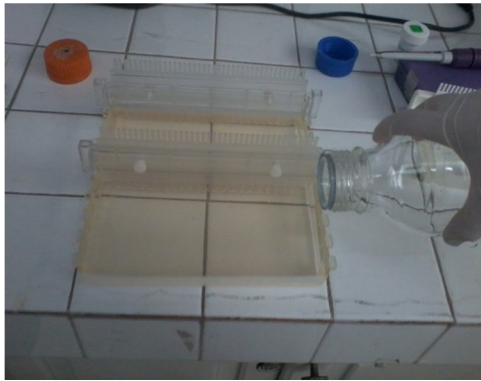
Paso 13



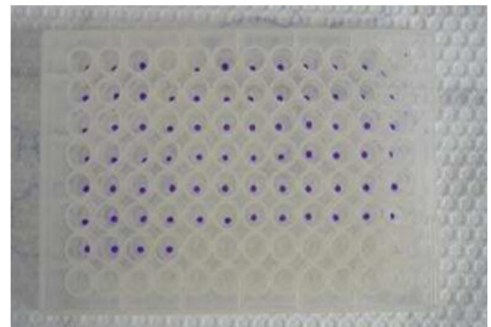
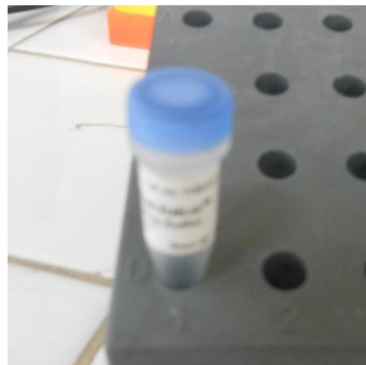
Paso 14

ELECTROFORESIS

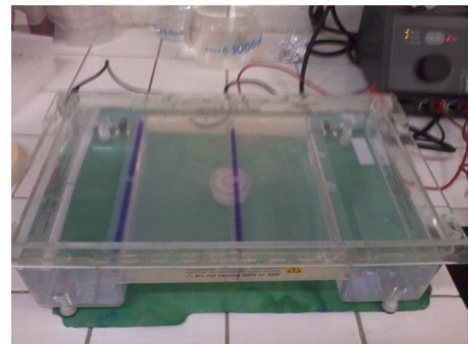
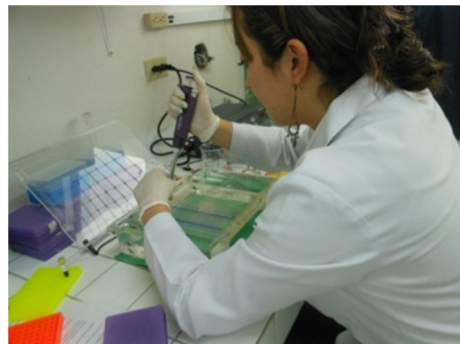
Preparación del gel



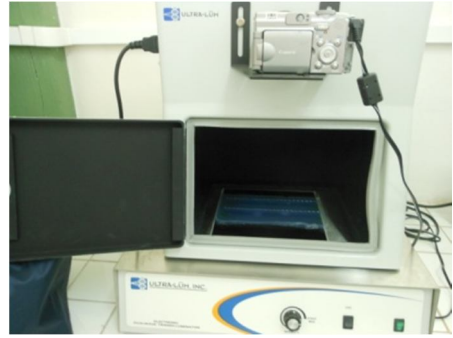
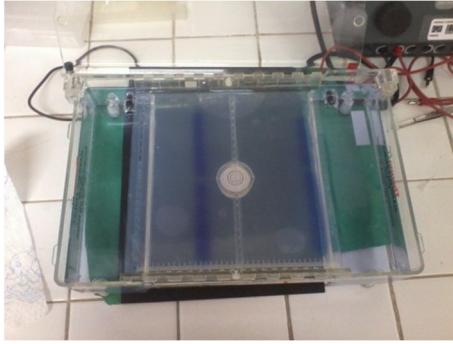
Búfer de Cargado (loading búfer)



Cargado de Pozuelos

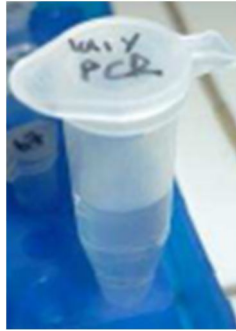


Corrida y Visualización del Gel

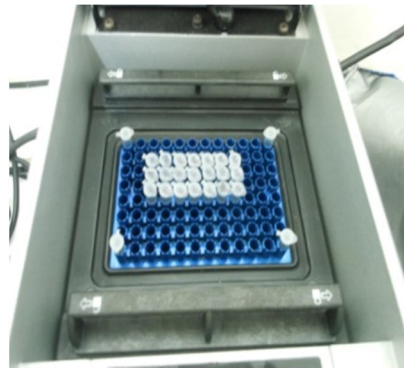


REP – PCR

Preparación de la mezcla master



Colocación de los Tubos en el Termocilador



Adición de la Taq Polimerasa

