



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

TEMA:

“DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE ACTINOMICETES COMO MECANISMO DE DEREPLICACIÓN DE MICROORGANISMOS ÚTILES EN BIOTECNOLOGÍA”

Trabajo de graduación, modalidad Sistema Tutorial, 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.

ADRIANA GABRIELA VINUEZA VILLARÉS

Ambato – Ecuador

2010

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE ACTINOMICETES COMO MECANISMO DE DEREPLICACIÓN DE MICROORGANISMOS ÚTILES EN BIOTECNOLOGÍA”, realizado por la Egda. Adriana Gabriela Vinueza Villarés, certifico que el trabajo fue realizado por la persona indicada. Considero que dicho informe 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, Junio del 2010

Dr. Carlos Rodríguez M.; Ph.D

TUTOR DE TESIS

AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE ACTINOMICETES COMO MECANISMO DE DEREPLICACIÓN DE MICROORGANISMOS ÚTILES EN BIOTECNOLOGÍA”, es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido, efectos legales y académicos que se desprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Ambato, Junio del 2010

Adriana Gabriela Vinueza Villarés
180413671-9

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, Junio del 2010

Para constancia firman:

Ing. Romel Rivera
Presidente del Tribunal

Ing. Gladys Navas
Miembro del Tribunal

Ing. Mario Paredes
Miembro del Tribunal

DEDICATORIA

A Dios, quien siempre me ha guiado y nunca me ha abandonado. Por iluminarme y darme la fuerza necesaria para lograr mis objetivos.

A mi Madre, Lucy por haberme dado la vida. Gracias por su inmenso amor, por ser el más claro ejemplo de honestidad, responsabilidad y superación. Gracias por educarme, lo que me ha permitido ser una persona de bien.

A mi Padre, Nelson por haberme apoyado en todo momento, por la confianza, por la paciencia, por sus consejos, pero más que nada, por su amor.

A mi chiquita, Vivi por creer en mí, por ser mi mejor amiga. Gracias por tu alegría, por ser mi fortaleza y mi apoyo.

A mi Mayita, gracias por ser mi ejemplo, por su amor incondicional, por sus consejos, por los valores, no me va a alcanzar la vida para agradecerle todo lo que me ha brindado.

A mi ñaña Ketty, por estar junto a mí, por cuidarme y consentirme toda la vida.

A ti mi corazón, Carlos gracias por estos años junto a mí porque contigo conocí el amor verdadero. Por tu apoyo, por estar junto a mí en los buenos y malos momentos. Por ayudarme a crecer para ser una mejor persona. Gracias por aceptarme tal y como soy. Por ser mi amigo, mi confidente, mi todo. Te amo Miauso.

Gaby

AGRADECIMIENTO

Dejo constancia de mi agradecimiento a:

A la Universidad Técnica de Ambato y en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Bioquímica que me dieron la oportunidad de formar parte de ellas.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, específicamente al Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales por permitirme desarrollar la parte experimental de mi tesis en sus instalaciones.

Al Dr. Carlos Rodríguez por los conocimientos impartidos a lo largo de la Carrera y por ser la guía para la culminación de este trabajo. Por confiar en mis capacidades. He aprendido mucho durante el transcurso de este ciclo. Gracias por la experiencia.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Ciencias Biológicas, en especial al Ing. Raúl Camacho por su amabilidad y disponibilidad durante el desarrollo de mi tesis y a la Ing. Anita Cunachi por su apoyo, ánimo, cariño, por tener siempre tendida su mano amiga desde el día en que me conoció.

A los profesores que me colaboraron como calificadoros del trabajo final a la Ing. Gladys Navas y al Ing. Mario Paredes porque con buena voluntad y paciencia han sabido guiarme en la finalización de la tesis. Y principalmente, muchas gracias por su amistad y los sabios consejos, mi gratitud para Uds.

A mis buenos Profesores y a aquellos que no lo fueron de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos e Ingeniería Bioquímica, gracias por los conocimientos impartidos y principalmente gracias por la amistad brindada.

Al personal administrativo de la Facultad por su amabilidad, disposición y buena voluntad.

A mis amigos, gracias por estar siempre conmigo, por soportar mi típico mal genio y acolitarme en mis locuras, por las tantas aventuras y experiencias compartidas durante los años en la Universidad. Gabriel, Ricardo, Diany, Rosy y Manuel gracias por ser como mis hermanos.

A mis nuevas amigas ayudantes de los laboratorios: Lilita, Ine, Charito y Mafer, que a pesar del poco tiempo que llevamos juntas hemos compartido momentos inolvidables. Gracias por motivarme y estar pendientes de mi trabajo. Es bueno saber que existen personas sinceras, íntegras y que en el futuro serán grandes profesionales no solo por su capacidad sino también por su ética y calidad moral.

Finalmente, a todas las personas sinceras y de buen corazón que se cruzaron en este largo camino y que me dieron palabras de aliento y apoyo para continuar. Gracias.

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 de contenidos	vii
Índice de tablas, gráficos y figuras	xvi
Resumen	xxi
Summary	xxii

B. TEXTO

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Tema de Investigación	1
1.2. Planteamiento del problema	1
1.2.1. Contextualización	1
1.2.1.1. Macro	1

1.2.1.2. Meso	2
1.2.1.3. Micro	3
1.2.2. Análisis Crítico	3
1.2.2.1. Diagrama Causa – Efecto	3
1.2.2.2. Prognosis	3
1.2.2.3. Formulación del problema	4
1.2.2.4. Interrogantes	4
1.2.2.5. Delimitación	4
1.3. Justificación	4
1.4. Objetivos	5
1.4.1. General	5
1.4.2. Específicos	5

CAPÍTULO II

MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes Investigativos	6
2.1.1. Consideraciones Generales de los Actinomicetes	6
2.1.2. Clasificación de la Clase Actinobacteria	7
2.1.3. Metabolismo de los Actinomicetes	7
2.1.3.1. Metabolismo Primario	7
2.1.3.2. Metabolismo Secundario	9
2.1.4. Taxonomía Numérica	12

2.1.5. Generalidades del ADN	17
2.1.5.1. Aislamiento de ADN	18
2.1.5.2. Electroforesis en gel para la purificación de ácidos nucleicos	19
2.1.5.3. Características del gel de agarosa	19
2.1.6. Técnicas de Identificación Molecular	20
2.1.6.1. Rep-PCR.	20
2.1.7. Antagonismo Microbiano	23
2.1.7.1. Tipos de zona de inhibición	24
2.1.7.1.1. Zona completamente clara	24
2.1.7.1.2. Zona opaca	24
2.1.7.1.3. Zona doble, la interna clara y la externa opaca	24
2.1.7.1.4. Zona doble, la interna opaca y la externa clara	24
2.1.7.1.5. Dos zonas de diferente densidad	24
2.1.7.2. Tamaño de zona de inhibición	24
2.1.7.3. Factores que influyen el tamaño de la zona	24
2.1.8. Características de los microorganismos modelo	25
2.1.8.1. Hongos	25
2.1.8.1.1. Características de la pared celular de Hongos	25
2.1.8.2. Bacterias Gram positivas y Gram negativas	27
2.2. Fundamentación Filosófica	28
2.3. Fundamentación Legal	29
2.4. Categorías fundamentales	29

2.4.1. Para la hipótesis de correlación de datos fenotípicos y genotípicos	29
2.4.1.1. Variable Dependiente	29
2.4.1.2. Variable Independiente	30
2.4.2. Para la hipótesis de producción de compuestos bioactivos	30
2.4.2.1. Variable Dependiente	30
2.4.2.2. Variable Independiente	31
2.5. Hipótesis	31
2.5.1. Hipótesis para la correlación de datos fenotípicos y genotípicos	31
2.5.1.1. Hipótesis nula	31
2.5.1.2. Hipótesis alternante	31
2.5.2. Hipótesis para la producción de compuestos bioactivos	32
2.5.2.1. Hipótesis nula	32
2.5.2.2. Hipótesis alternante	32
2.6. Señalamiento de variables de las hipótesis	32
2.6.1. Para la hipótesis de la correlación de datos fenotípicos y genotípicos	32
2.6.2. Para la hipótesis de la producción de compuestos bioactivos	33
CAPÍTULO III	
METODOLOGÍA	
3.1. Modalidad básica de la investigación	34
3.2. Nivel o tipo de investigación	34
3.3. Población y muestra	34
3.4. Operacionalización de variables	34

3.5. Plan de recolección de información	34
3.5.1. Caracterización Fenotípica	34
3.5.1.1. Caracterización macroscópica	34
3.5.1.2. Caracterización microscópica	34
3.5.1.3. Rango de Crecimiento en Función de la Temperatura	37
3.5.1.4. Rango de Crecimiento en Función del pH	38
3.5.1.5. Uso de Diferentes Fuentes de Carbono y Nitrógeno	38
3.5.1.6. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	38
3.5.2. Caracterización genotípica	38
3.5.2.1. Extracción de ADN genómico	38
3.5.2.2. Determinación de cantidad, integridad y pureza del ADN genómico	40
3.5.2.3. rep-PCR	41
3.5.3. Determinación de la actividad antimicrobiana	42
3.5.3.1. Selección y Preparación de los Cultivos de Actinomicetes	42
3.5.3.2. Preparación de los platos con los microorganismos modelo	42
3.5.3.3. Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica	43
3.6. Plan de procesamiento de la información	43
3.6.1. Caracterización fenotípica	43
3.6.2. Caracterización genotípica	43
3.6.3. Determinación de la actividad antimicrobiana	44

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de los Resultados	45
4.1.1. Caracterización Fenotípica	45
4.1.1.1. Caracterización macroscópica	45
4.1.1.2. Caracterización microscópica	45
4.1.1.3. Rango de crecimiento en función de la Temperatura	45
4.1.1.4. Rango de crecimiento en función del pH	45
4.1.1.5. Determinación del uso de diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno	46
4.1.1.6. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	46
4.1.2. Caracterización genotípica	46
4.1.2.1. Determinación de cantidad, integridad y pureza del ADN genómico.	46
4.1.2.2. rep-PCR	46
4.1.2.3. Taxonomía numérica de datos genotípicos	47
4.1.3. Relación entre datos fenotípicos y genotípicos	47
4.1.4. Determinación de la actividad antimicrobiana	47
4.1.4.1. Actividad en contra de la Bacteria Gram positiva (G+)	47
4.1.4.2. Actividad en contra de la Bacteria Gram negativa (G-)	48
4.1.4.3. Actividad en contra de <i>Fusarium</i>	48
4.1.4.4. Actividad en contra de <i>Botrytis</i>	48
4.2. Interpretación de Datos	48
4.2.1. Caracterización Fenotípica	48

4.2.1.1. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	49
4.2.2. Caracterización genotípica	49
4.2.2.1. Taxonomía numérica de datos genotípicos	50
4.2.3. Relación entre datos fenotípicos y genotípicos	50
4.2.4. Determinación de la actividad antimicrobiana	50
4.2.5. Discusión general del trabajo investigativo	51
4.3. Verificación de Hipótesis	52
4.3.1. Hipótesis para la correlación de datos fenotípicos y genotípicos	52
4.3.1.1. Hipótesis nula	52
4.3.1.2. Hipótesis alternante	52
4.3.2. Hipótesis para la producción de compuestos bioactivos	53
4.3.2.1. Hipótesis nula	53
4.3.2.2. Hipótesis alternante	53

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	54
5.2. Recomendaciones	55

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos Informativos	56
6.1.1. Título	56
6.1.2. Institución Ejecutora	56
6.1.3. Beneficiarios	56
6.1.4. Ubicación	56
6.1.5. Tiempo Estimado para la Ejecución	56
6.1.6. Equipo Técnico Responsable	56
6.2. Antecedentes de la Propuesta	56
6.3. Justificación	57
6.4. Objetivos	57
6.4.1. Objetivo General	57
6.4.2. Objetivos Específicos	57
6.5. Análisis de Factibilidad	57
6.6. Fundamentación	58
6.7. Metodología – Modelo Operativo	58

6.7.1. Caracterización Fenotípica	58
6.7.1.1. Caracterización macroscópica	58
6.7.1.2. Caracterización microscópica	58
6.7.1.3. Rango de crecimiento en función de la Temperatura	59
6.7.1.4. Rango de crecimiento en función del pH	59
6.7.1.5. Aminoácidos como Fuentes de Carbono y Nitrógeno	59
6.7.1.6. Análisis de Datos Fenotípicos	59
6.8. Administración	60
6.9. Previsión de la Evaluación	61

C. MATERIALES DE REFERENCIA

Bibliografía	62
Anexos	66

ÍNDICE DE TABLAS

ANEXO A. DATOS EXPERIMENTALES

Tabla A1. Caracterización macroscópica.

Tabla A2. Matriz de datos fenotípicos.

Tabla A3. Grupos especie obtenidos a partir de los datos fenotípicos.

Tabla A4. Matriz de datos genotípicos.

Tabla A5. Grupos especie obtenidos a partir de los datos genotípicos.

Tabla A6. Relación entre datos fenotípicos y genotípicos.

Tabla A7. Actinomicetes que no presentaron actividad antimicrobiana.

Tabla A8. Actinomicetes que presentaron actividad antimicrobiana.

Tabla A9. Diámetros de inhibición en mm frente a la Bacteria gram positiva (G+).

Tabla A10. Diámetros de inhibición en mm frente a la Bacteria gram negativa (G-).

Tabla A11. Diámetros de inhibición en mm frente a *Fusarium*.

Tabla A12. Diámetros de inhibición en mm frente a *Botrytis*.

Tabla A13. Datos originales del aislamiento selectivo y procedencia de los actinomicetes.

ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tabla B1. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram positiva.

Tabla B2. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram positiva.

Tabla B3. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram negativa.

Tabla B4. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram negativa,

Tabla B5. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium*.

Tabla B6. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium*.

Tabla B7. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis*.

Tabla B8. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis*.

ANEXO C. GRÁFICOS

Figura C1. Caracterización microscópica.

Figura C2. Crecimiento en función de la temperatura.

Figura C3. Crecimiento en función del pH.

Figura C4. Crecimiento en diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno.

Figura C5. Número de fuentes de Carbono y Nitrógeno utilizados.

Figura C6. Dendrograma obtenido a partir de datos fenotípicos.

Figura C7. Grupos especie formados a partir de datos fenotípicos.

Figura C8. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (I).

Figura C9. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (II).

Figura C10. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (III).

Figura C11. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (IV).

Figura C12. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (V).

Figura C13. Posición del ADN genómico.

Figura C14. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (I).

Figura C15. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (II).

Figura C16. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (III).

Figura C17. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (IV).

Figura C18. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (V).

Figura C19. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (VI).

Figura C20. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (VII).

Figura C21. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (VIII).

Figura C22. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (IX).

Figura C23. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (X).

Figura C24. Bandas de ADN.

Figura C25. Dendrograma obtenido a partir de datos genotípicos.

Figura C26. Grupos especie obtenidos de los datos genotípicos.

Figura C27. Tipos de actividad de los metabolitos secundarios producidos por actinomicetes.

Figura C28. pH de los medios de cultivo del aislamiento selectivo original.

ANEXO D. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Medios de Cultivo

Buffers

ANEXO E. FOTOGRAFÍAS

Pruebas Fenotípicas

Caracterización Macroscópica

Caracterización Microscópica

Almacenamiento de biomasa microbiana

Rango de crecimiento en función de la Temperatura

Rango de crecimiento en función del pH

Uso de Distintas Fuentes de Carbono y Nitrógeno

Pruebas Genotípicas

Extracción de ADN

Determinación de cantidad, integridad y pureza del ADN genómico

Rep- PCR

Antagonismo Microbiano

RESUMEN

Ciento treinta y tres cultivos puros de actinomicetes fueron utilizados para determinar la relación entre la caracterización fenotípica y genotípica, como mecanismos de dereplicación de aislamientos idénticos de actinomicetes. A partir de la taxonomía numérica de datos genotípicos fueron ubicados treinta y dos grupos especie, con un porcentaje de similitud del 65%. En cambio, sesenta y siete grupos especie se formaron a partir de la taxonomía numérica de datos fenotípicos, con un punto de corte de similitud del 95%. Los resultados demostraron que no existe una relación directa entre los dos tipos de datos. De los grupos especie definidos a partir del análisis de datos fenotípicos, fueron escogidos noventa y seis representantes para la determinación de producción de compuestos bioactivos. Sesenta y ocho presentaron algún tipo de actividad antimicrobiana en contra de bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, *Fusarium* y *Botrytis*. Además, se encontró actividad antimicrobiana específica, así, once cepas mostraron capacidad solamente bactericida, siete antifúngica y quince mostraron un amplio espectro de acción al inhibir el crecimiento tanto de bacterias como de los hongos estudiados. Algunos actinomicetes presentaron actividades muy definidas, ya que cuatro actuaron solamente en contra de bacterias gram positivas, ocho frente a gram negativas, dos contra *Botrytis* y seis frente *Fusarium*. Muchos de los antibióticos producidos por los actinomicetes en estudio fueron igual o más eficientes que los antibióticos usados como control experimental. Los resultados demuestran que el uso de taxonomía numérica de datos fenotípicos permite escoger cultivos representativos de actinomicetes para determinar su capacidad de producir antibióticos. Además, se han obtenido resultados promisorios que probablemente permitirán el desarrollo de bioproductos útiles para el control de bacterias y hongos que causan enfermedades de importancia agrícola y humana.

SUMMARY

One hundred and thirty three pure cultures of actinomycetes were used to determine the association between the phenotypic and genotypic characterization as mechanisms of dereplication of actinomycete identical isolates. From the numerical taxonomy of genotypic data, thirty two group-species were placed, using a 65% similarity cut-off point. On the other hand, sixty seven group-species were formed from the numerical taxonomy of phenotypic data, using a 95% similarity cut-off point. The results showed that it does not exist a direct association among the two types of data. Of the groups species obtained from the analysis of phenotypic data, ninety six representatives were chosen for the determination of bioactive compounds production. Sixty eight presented some type of antimicrobial activity against gram positive and gram negative bacteria, and the phytopathogenic fungi *Fusarium* and *Botrytis*. It was also found specific antimicrobial activity, for instance, eleven strains showed only bactericide ability, seven only antifungal, and fifteen showed a wide spectrum action, as they were able to inhibit the growth of both, bacteria and fungi. Some of the actinomycetes presented more specific activities, since only four were able to kill gram positive bacteria, eight gram negative, two against *Botrytis* and six against *Fusarium*. Many of the antibiotics produced by the actinomycetes used in this study were as effective, and in some cases, even better, than the antibiotics used as an experimental control. The results demonstrate that the use of numerical taxonomy of phenotypic data allows choosing representative cultures of actinomycetes to determine their capacity to produce antibiotics. Additionally, promissory results have been obtained that will probably allow the development of useful bioproducts for the control of bacteria and fungi that cause diseases of agricultural and human importance.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Tema de Investigación

Determinación de la relación entre la caracterización fenotípica y genotípica de actinomicetes como mecanismo de dereplicación de microorganismos útiles en Biotecnología.

1.2. Planteamiento del problema

1.2.1. Contextualización

1.2.1.1. Macro

La clase *Actinobacteria*, en término del número y variedad de especies identificadas, representa uno de las mayores divisiones, entre las 18 principales líneas evolutivas actualmente reconocidas dentro del dominio Bacteria. Incluye 5 subclases y 14 subórdenes. Los miembros de esta clase son bacterias gram-positivas, con un alto contenido de G+C en su ADN, el que varía desde el 51% en algunas corinebacterias, hasta más del 70% en *Streptomyces* y *Frankia*. Una excepción para esta característica común, es el genoma del patógeno obligado *Tropheryma whipplei*, con menos del 50% de G+C (Ventura *et al.*, 2007).

La clase *Actinobacteria* exhibe una gran variedad morfológica, desde cocos en *Micrococcus*, bacilo-cocos en *Arthrobacter*, hifas fragmentadas en *Nocardia*, hasta micelios permanentemente ramificados y altamente diferenciados en *Streptomyces*. Se pueden también encontrar diferentes estilos de vida, el cual incluye patógenos como *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Tropheryma*, *Corynebacterium*, y *Propionibacterium*, habitantes del suelo como *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Nonomuraea*, *Streptosporangium*, y *Micromonospora*, comensales de plantas como *Leifsonia*, simbiontes fijadores de nitrógeno como *Frankia*, y habitantes del tracto gastrointestinal como *Bifidobacterium* (Ventura *et al.*, 2007).

Dentro de la clase *Actinobacteria*, se encuentra el orden *Actinomycetales* (Stackebrandt, 1997). Este exhibe una diversidad de propiedades fisiológicas y metabólicas, como la producción de enzimas extracelulares y la formación de una amplia variedad de metabolitos secundarios. Muchos de esos metabolitos son potentes antibióticos, lo que ha permitido que miembros pertenecientes a este Orden, sean considerados como los principales productores de antibióticos, explotados por la industria farmacéutica (Ventura *et al.*, 2007). Algunos antibióticos producidos por miembros del género *Streptomyces*, con importancia clínica y comercial, pertenecen a la clase de las tetraciclinas (TC). Frecuentemente han sido utilizadas para tratar infecciones causadas por bacterias gram-positivas y negativas, y para infecciones causadas por patógenos intracelulares como son los micoplasmas, clamidias y rickettsias. Los antibióticos hasta ahora encontrados han permitido desarrollar una industria farmacéutica que genera

billones de dólares al año, producto de la comercialización y venta de productos basados en metabolitos producidos por actinomicetes (Petcovik *et al.*, 2006).

1.2.1.2. Meso

El proceso de obtención de un metabolito útil para la industria, comienza con el aislamiento y caracterización de los actinomicetes. Posteriormente se determina la posible actividad biológica mediante pruebas de screening. Al utilizar las técnicas convencionales de aislamiento se deben considerar varios factores, como el pre-tratamiento de las muestras, el medio selectivo y las condiciones de cultivo. La diversidad metabólica y biológica de este grupo de microorganismos es el producto de millones de años de evolución, que ha permitido que se encuentren ampliamente distribuidos en la naturaleza, colonizando prácticamente todos los hábitats existentes en nuestro planeta (Hakvåg *et al.*, 2008; Lo *et al.*, 2002; Magarvey *et al.*, 2004; Moncheva *et al.*, 2002; Newton *et al.*, 2007).

Una vez que se han obtenido aislamientos puros de actinomicetes es necesario realizar la caracterización de los mismos. Para ello se utilizan sus propiedades químicas, morfológicas, y metabólicas. Estos datos sirven para aplicar principios de taxonomía numérica, el que permite comparar características fenotípicas de varios organismos, para obtener el grado de similitud que estos comparten. Las cepas con características comunes, muestran un alto porcentaje de similitud, el cual permite agruparlos para su posterior clasificación (Goodfellow, 1988).

Por otro lado, los métodos de genética molecular permiten detectar directa o indirectamente el polimorfismo de todo el genoma, a diferencia de las características fenotípicas que cubren sólo entre el 5-10% del total del ADN del organismo (Christova *et al.*, 1995). Uno de los métodos ampliamente utilizados por su facilidad de implementación y diferenciación de cepas a nivel de especies, es el repetitive sequence-based PCR (rep-PCR), el cual puede realizarse con ADN genómico extraído a partir de colonias bacterianas. La ventaja de esta técnica es que los resultados son altamente confiables y los costos por prueba son menores en comparación de otros métodos que cumplen con la misma finalidad (Olive & Bean, 1999).

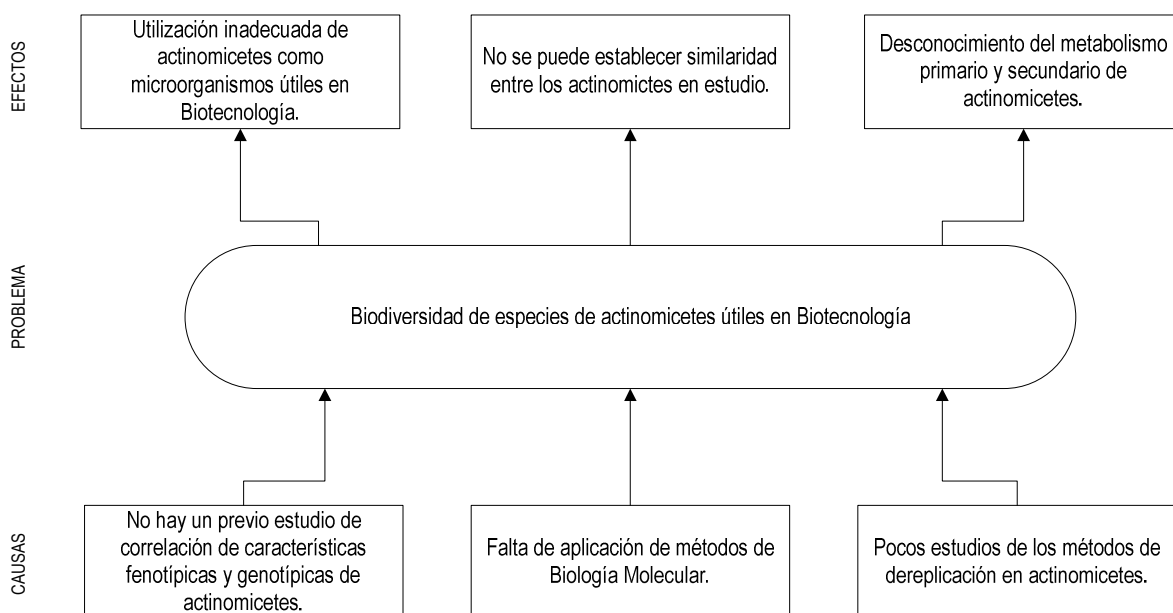
En este contexto, cabe mencionar que el desarrollo enorme realizado en el campo de la taxonomía bacteriana, ha sido mediante la aplicación de técnicas de taxonomía polifásica. Esta tiene por objeto integrar diferentes tipos de información, que incluyen datos fenotípicos, genotípicos y filogenéticos (Vandamme *et al.*, 1996). La parte fundamental de este tipo de taxonomía es que los datos de biología molecular no suplantán a los datos fenotípicos sino más bien los complementan para obtener una visión global y sustentada acerca del organismo investigado (Bull *et al.*, 2000).

1.2.1.3. Micro

Al determinar la biodiversidad de actinomicetes existente en nuestro planeta, comprendemos un poco más acerca de la capacidad de adaptación de éste grupo remarcable de bacterias. Entendemos de mejor manera su capacidad metabólica para producir miles de compuestos bioactivos, y su relación con los diferentes hábitats que han colonizado. El proceso es largo, sin embargo, el obtener un material biológico de calidad, es el primer paso. Para ello, el uso de técnicas de taxonomía polifásica, permiten obtener datos que, al analizarlos, conllevan a identificar los diferentes grupos taxonómicos presentes, y de esta manera es posible seleccionar aquellos representantes que, en la fase de screening, revelaran las especies que producen compuestos bioactivos útiles para la biotecnología.

1.2.2. Análisis Crítico

1.2.2.1. Diagrama Causa – Efecto



1.2.2.2. Prognosis

Si no se llega a culminar el presente trabajo de investigación se desconocería la aplicabilidad del proceso de dereplicación como mecanismo de selección de microorganismos en aislamientos selectivos. Además, al no conocer la capacidad de los actinomicetes de producir compuestos bioactivos se limitaría el uso de los mismos en diferentes áreas de biotecnología, agricultura y salud.

1.2.2.3. Formulación del problema

¿Es factible la correlación de datos fenotípicos y genotípicos para procesos de dereplicación de microorganismos útiles en Biotecnología?

1.2.2.4. Interrogantes

¿Cómo se realiza la caracterización fenotípica de los actinomicetes?

¿Cómo se realiza la caracterización genotípica de los actinomicetes?

¿Cómo se determina la relación entre los datos fenotípicos y genotípicos?

¿Cómo se determina la capacidad de producción de compuestos bioactivos de actinomicetes?

1.2.2.5. Delimitación

Campo: Investigación.

Área: Microbiología.

Sub aérea: Biotecnología.

Aspecto: Metabolismo secundario de microorganismos.

Geográfica: Laboratorio de Ciencias Biológicas. Facultad de Recursos Naturales. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

Temporal: Julio 2009 – Enero 2010

1.3. Justificación

En la actualidad la búsqueda de compuestos bioactivos provenientes de microorganismos es una de las principales prioridades en el campo de la biotecnología. Este tipo de investigación se ve reforzada por la capacidad que los actinomicetes poseen para producir diversos metabolitos secundarios, incluyendo aquellos con potencial actividad biológica. Para ello se realizan estudios de taxonomía polifásica, los que permiten identificar y caracterizar microorganismos para conocer su capacidad metabólica.

En un experimento de aislamiento selectivo es posible obtener en cultivo puro cientos de cepas, muchas de las cuales son idénticas. Por ello es necesario aplicar técnicas que permitan identificar aquellos que son similares, para así disminuir el número de actinomicetes a los que se determina la capacidad para producir compuestos bioactivos. El encontrar aquellos que son similares, no solamente garantiza un ahorro de recursos, sino también que permite trabajar con un material biológico de alta calidad.

La presente investigación tiene como objetivo analizar la relación entre datos fenotípicos, y la caracterización molecular utilizando la técnica de rep-PCR, usando 133 aislamientos de la colección del Departamento de Ciencias Biológicas de la ESPOCH (DCB-ESPOCH), para obtener un material biológico de calidad, a ser utilizado para las pruebas de actividad antimicrobiana en contra de microorganismos modelo.

Es importante reiterar que en el Ecuador, un país megadiverso, el desarrollo tecnológico en el área de biotecnología aún es muy incipiente, debido a la falta de apoyo económico para la investigación, y a una escasez de profesionales altamente capacitados en el área. Ahora más que nunca, nuestro país necesita generar su propio conocimiento e industria, y al desarrollar éste tipo de trabajos de investigación se aporta con un granito de arena hacia la consecución de éste objetivo.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

- Determinar la relación existente entre datos fenotípicos y genotípicos de 133 cepas de actinomicetes de la colección DCB-ESPOCH para obtener material biológico de calidad en aplicaciones biotecnológicas.

1.4.2. Específicos

- Caracterizar fenotípicamente 133 actinomicetes de la colección de cultivos del DCB-ESPOCH.
- Caracterizar genotípicamente 133 actinomicetes de la colección de cultivos del DCB-ESPOCH.
- Determinar el tipo de relación entre los resultados de los análisis fenotípicos y genotípicos.
- Determinar la capacidad de producción de compuestos bioactivos de actinomicetes representantes de cada grupo-especie.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes Investigativos

2.1.1. Consideraciones Generales de los Actinomicetes

Los actinomicetes comprenden un grupo de microorganismos procariotes con una extensa diversidad biológica. Son de naturaleza Gram positiva y presentan características inusuales de crecimiento. Pueden formar micelio aéreo esporulado como ciertas especies de *Streptomyces* o mantenerse en un estado de no-replicación como en algunas micobacterias (Ventura *et al.*, 2007). Muchos de estos organismos pueden formar ciertas estructuras llamadas esporas, así como también unas más especializadas llamadas esporangios, algunas de estas esporas pueden ser móviles por flagelos mientras que otras son inmóviles. Fisiológicamente, es posible distinguir formas aerobias que son más numerosas que las anaerobias, presentan una diversidad considerable desde formas bacilares hasta formas filamentosas ramificadas a modo de esporulación compleja (Leveau & Bouix, 2000).

Generalmente el contenido de G+C de su ADN es superior al 55%. Su crecimiento es más lento que el de otras bacterias, el tiempo de generación medio es de alrededor de 2 y 3 horas y ciertas especies como *Mycobacterium tuberculosis* se desarrollan todavía más lentamente con tiempos de generación superiores a 15 horas. Se reproducen por fisión binaria o fragmentación y la mayoría posee un metabolismo oxidativo (Leveau & Bouix, 2000).

Se distribuyen ampliamente en ecosistemas tanto terrestres como acuáticos (incluidos los marinos), sin embargo su reservorio natural es el suelo donde comprenden aproximadamente del 20 al 60 % del total de la población microbiana (Leveau & Bouix, 2000), en la cual su papel crucial es el reciclado de biomateriales por la descomposición y la formación de humus (Ventura *et al.*, 2007). Además, muchas bifidobacterias se usan como ingredientes activos en una variedad de los llamados alimentos funcionales, debido a sus propiedades probióticas. (Ventura *et al.*, 2007).

Por otro lado, una de las características más importantes de los actinomicetes es su capacidad para producir compuestos bioactivos. En la literatura se describen aproximadamente 20.000 compuestos que exhiben actividad biológica pero solo una pequeña fracción de ellos ha sido desarrollada para uso humano, agrícola o veterinario. La mayoría de estos compuestos son sintetizados por especies del género *Streptomyces* (Petcovik *et al.*, 2006). Este grupo de actinomicetes produce la mayoría de antibióticos naturales para uso terapéutico ya que manifiestan actividades farmacológicas que subrayan todavía más el interés de estos microorganismos (Yim *et al.*, 2007).

2.1.2. Clasificación de la Clase Actinobacteria

Stackebrandt *et al.*, (1997), propone un sistema de clasificación jerárquica de la clase *Actinobacteria* basada en análisis filogenéticos de la secuencia de ADNr/ARNr 16S. De esta manera utilizando este tipo de análisis divide a la clase *Actinobacteria* en órdenes, subórdenes y familias como se muestra en la Tabla 1.

2.1.3. Metabolismo de los Actinomicetes

De las propiedades más significativas de los actinomicetes son su capacidad de desarrollarse sobre los sustratos más diversos y su aptitud para sintetizar numerosos metabolitos bioactivos entre los cuales se cuentan los dos tercios de los antibióticos producidos por microorganismos. Estas propiedades traducen la riqueza completamente destacable del metabolismo celular de este grupo microbiano (Leveau & Bouix, 2000).

2.1.3.1. Metabolismo Primario

Corresponde al conjunto de vías catabólicas, anfóblicas y anabólicas que suministran al organismo la energía y las moléculas necesarias para su crecimiento. Este tipo de metabolismo de los actinomicetes es parecido al de otros microorganismos. La acción de las enzimas del catabolismo conduce a la degradación de los nutrientes y fuentes de energía más o menos complejas (Leveau & Bouix, 2000).

Los productos finales del catabolismo se utilizan para formar intermediarios primarios como los glúcidos, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, vitaminas y los polímeros esenciales que derivan de ellos (polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, coenzimas). Estos metabolitos primarios forman la estructura celular y permiten el funcionamiento del metabolismo general. Algunos de estos metabolitos primarios constituyen la materia prima del metabolismo secundario. Estas actividades catabólicas y de biosíntesis interdependientes están sometidas a una regulación equilibrada que evita la acumulación de productos finales o intermediarios. Los mecanismos de control más importantes son la inducción por los sustratos, la retro – inhibición sobre las actividades enzimáticas, la represión de la síntesis de las enzimas la represión catabólica y la regulación del ATP (Leveau & Bouix, 2000).

Como la mayoría de las bacterias, los actinomicetes utilizan fuentes de carbono clásicas constituidas por osas, oligoholósidos, poliósidos, polialcoholes y sales de ácidos orgánicos. Ocurre lo mismo para las fuentes de nitrógeno generalmente constituidas por aminoácidos, proteínas, fuentes de amonio y nitratos. Los fosfatos y sulfatos suministran respectivamente fósforo y de azufre (Leveau & Bouix, 2000).

Tabla 1. Clasificación de la clase Actinobacteria.

Subclase	Orden	Suborden	Familia
<i>Acidimicrobidae</i>	<i>Acidimicrobiales</i>		<i>Acidimicrobiaceae</i>
<i>Rubrobacteridae</i>	<i>Rubrobacterales</i>		<i>Rubrobacteraceae</i>
<i>Coriobacteridae</i>	<i>Coriobacterales</i>		<i>Coriobacteriaceae</i>
<i>Sphaerobacteridae</i>	<i>Sphaerobacterales</i>		<i>Sphaerobacteraceae</i>
<i>Actinobacteridae</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycineae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
		<i>Micrococchineae</i>	<i>Micrococcaceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>
		<i>Corynebacterineae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i>
		<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>
		<i>Propionibacterineae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i> <i>Nocardioidaceae</i>
		<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>
		<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>
		<i>Streptosporangineae</i>	<i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i>
		<i>Frankineae</i>	<i>Frankiaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i>
		<i>Glycomycineae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>
			<i>Bifidobacteriales</i>

Fuente: Stackebrandt *et al.*, 1997

Más allá de estas fuentes corrientes de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, los actinomicetes tienen la capacidad de degradar o transformar compuestos hidrófobos, entre los cuales se pueden destacar:

- Hidrocarburos y asimilados: alcanos, alquenos, alquinos, ciclanos, terpenos.
- Compuestos nitrogenados no aromáticos: nitrilos, amidas, heterocíclicos.
- Compuestos aromáticos: hidrocarburos arilalifáticos, aminas aromáticas, fenoles, heterocíclicos.
- Esteroles y esteroides (Leveau & Bouix, 2000).

2.1.3.2. Metabolismo Secundario

Los metabolitos secundarios se definen como compuestos de bajo peso molecular, no esenciales para el crecimiento del microorganismo productor. La producción de metabolitos secundarios esta a menudo asociada a un crecimiento limitado correspondiente a la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Esta fase de producción de metabolitos secundarios se llama idiofase, denominándose idiolitos los metabolitos secundarios producidos entonces. La fase de crecimiento rápido que precede a la idiofase se llama trofofase. Esta asociación entre producción de metabolitos secundarios y la fase estacionaria de crecimiento, si bien es frecuente, no es sin embargo sistemática. Así, el empleo de ciertos medios químicamente definidos puede favorecer un crecimiento lento y en este caso la idiofase se superpone frecuentemente con la trofofase (Leveau & Bouix, 2000).

El hecho de que la mayoría de los metabolitos secundarios conocidos producidos por los actinomicetes sean antibióticos, se relaciona con la amplitud de la búsqueda de nuevos antibióticos llevada a cabo desde hace varias décadas con ayuda de tamices específicos. Otros tipos de tamices aplicados más recientemente para seleccionar otras actividades biológicas, de tipo farmacológico por ejemplo, ponen en evidencia un número creciente de metabolitos secundarios no antibióticos (Leveau & Bouix, 2000).

Del mismo modo, se han descubierto metabolitos secundarios sin actividad biológica evidente con ayuda de tamices mas focalizados sobre la originalidad estructural de las moléculas que sobre su actividad (Leveau & Bouix, 2000).

El conjunto de metabolitos secundarios conocidos corresponde a una gran diversidad de familias de compuestos orgánicos, entre los cuales tenemos: aminoazúcares, epóxidos, alcaloides, quinonas, glucósidos, lactonas, macrólidos, nucleósidos, péptidos, fenazinas, polienos, pirroles, quinolinas, tetraciclinas, naftalenos, poliactilenos, β -lactaminas (Leveau & Bouix, 2000).

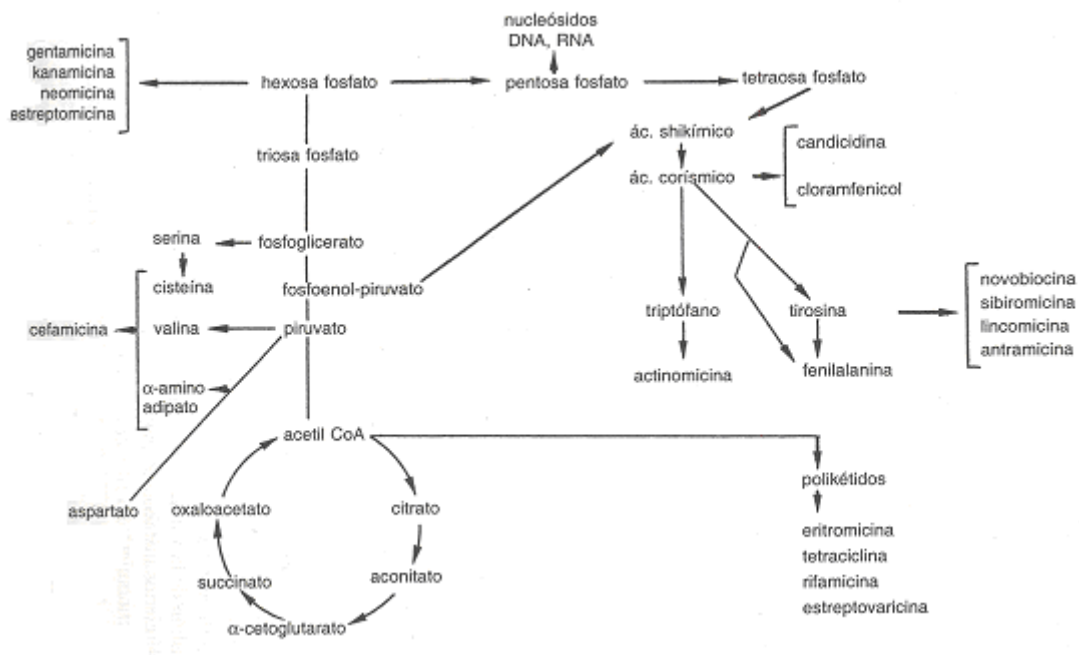


Figura 1. Relaciones entre metabolismo primario y secundario en procariotes (Leveau & Bouix, 2000)

Además, la utilización de las técnicas de separación y de análisis de alta eficacia ha conducido al aislamiento de compuestos minoritarios, análogos estructurales de los metabolitos secundarios principales y de los cuales la mayoría están ligados a la baja especificidad de las enzimas implicadas en el metabolismo secundario (Leveau & Bouix, 2000).

A pesar de la diversidad de estructuras químicas y de sus actividades biológicas, los metabolitos secundarios son sintetizados a partir de un pequeño número de precursores directamente provenientes del metabolismo primario. Así, se distinguen una docena de vías principales en los actinomicetes, en base al origen del carbono (Figura 1) (Leveau & Bouix, 2000):

- Incorporación del esqueleto carbonado completo de la glucosa para formar ya sea, el conjunto del metabolito secundario (estreptomina y otros aminoglicósidos) o ya sea una parte correspondiente a un glúcido proveniente de otra vía (eritromicina, espiramicina y otros macrólidos).
- Utilización de la vía de las pentosas para la biosíntesis de metabolitos nucleotídicos (tubercidina).
- Utilización de la vía del ácido shikímico para la biosíntesis de la parte aromática de ciertos metabolitos (novobiocina, cloramfenicol).

- Utilización de la vía de los policétidos, menos común en los actinomicetes, para acceder a otros metabolitos con ciclos aromáticos (tetraciclinas):
- Una variante de la vía del polipropionato, que implica la condensación del ácido propiónico y del ácido metilmalónico conduce a la biosíntesis de numerosos metabolitos entre ellos las gliconas de los macrólidos (la eritronolida de la eritromicina)
- Otra variante, incluye la incorporación de acetato, de propionato y de butirato conduce a metabolitos secundarios de tipo poliéter (monensina, lasalocida, narasina, emeridica).
- Conversión o incorporación de aminoácidos (cefamicinas, cicloserina).
- Utilización de la vía de los terpenos y de los esteroides (geosmina) (Leveau & Bouix, 2000).

Por otra parte, se utilizan tres tipos de reacciones químicas para transformar intermediarios primarios en metabolitos secundarios finales:

- Oxidaciones y reducciones
- Metilaciones
- Halogenaciones (Leveau & Bouix, 2000).

Como ya se ha mencionado, la producción de metabolitos secundarios tiene lugar generalmente tras la fase de crecimiento rápido, durante la idiofase. En el caso de los antibióticos, la idiofase está asociada a la expresión de mecanismos que permiten a la cepa productora sobrevivir en presencia del antibiótico sintetizado; entre estos mecanismos de resistencia se pueden seleccionar:

- La modificación enzimática del antibiótico
- La alteración de la permeabilidad al antibiótico excretado
- La modificación del blanco celular del antibiótico (Leveau & Bouix, 2000).

La biosíntesis de metabolitos secundarios está regulada por diversos mecanismos entre ellos la represión por fuentes nutricionales, la inducción, la represión o la inhibición de enzimas de las vías de biosíntesis por el metabolito final. La glucosa, fuente de carbono favorable al crecimiento, interfiere con la biosíntesis de numerosos metabolitos secundarios: así, durante la biosíntesis de la tilosina, la glucosa interfiere inhibiendo o reprimiendo la oxidación de los ácidos grasos, fuentes de acetato y propionato en la formación del ciclo de los macrólidos.

La represión de la biosíntesis de metabolitos secundarios por el amonio o por ciertos aminoácidos es frecuente en los actinomicetes. Ese es el caso de la biosíntesis de la tilosina, eritromicina, cloramfenicol o de la estreptomycin. En cambio, los fosfatos interfieren a menudo con la biosíntesis de los metabolitos secundarios según dos mecanismos principales:

- El fosfato puede reprimir o inhibir fosfatasa.
- El fosfato o un efector intracelular, tal como el ATP, reprime o inhibe otras sintetasa diferentes de las fosfatasa.

Ciertos aminoácidos o inductores que corresponden a moléculas particulares pueden inducir enzimas de las vías de biosíntesis de los metabolitos secundarios:

- El triptófano estimula la producción de actinomicina induciendo la hidroxikinureninasa en *S. parvulus*.
- Factores de regulación pueden estimular la biosíntesis de metabolitos secundarios de acuerdo con un mecanismo complejo y no bien conocido; es el caso del factor A en la producción de estreptomycin y del factor IM en la producción de virginiamicina (Leveau & Bouix, 2000).

La finalidad de los metabolitos secundarios aún no es completamente evidente, se plantean varias hipótesis para explicar este proceso. Así, se cree que ciertas etapas del metabolismo primario pueden desregularse, conduciendo a una sobreproducción de intermediarios. Cuando la tasa de crecimiento disminuye, en condiciones de estrés metabólico, la acumulación de intermediarios podría inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios. Esto conferiría a la célula de un mecanismo de eliminación de metabolitos primarios acumulados. Por otro lado, se piensa que los metabolitos secundarios son capaces de conferir ciertas ventajas selectivas en la competición entre diferentes especies en el seno de un biotopo (Leveau & Bouix, 2000).

A pesar que este mecanismo de producción de metabolitos secundarios no es completamente claro, la importancia de la diversa actividad metabólica que presentan los actinomicetes a demostrado tener muchas aplicaciones medicinales, terapéuticas y agroquímicas (Leveau & Bouix, 2000).

2.1.4. Taxonomía Numérica

Edwards y Ewing, en sus estudios sobre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, establecieron los siguientes principios para caracterizar, clasificar e identificar organismos:

La clasificación e identificación de un organismo debe basarse en un patrón morfológico y bioquímico global. Una sola característica (patogenicidad o reacción bioquímica),

independientemente de su importancia, no es una base suficiente para la clasificación o la identificación de un organismo.

Se debe realizar varios ensayos con la cepa de interés para determinar con precisión las características bioquímicas utilizadas para distinguir una especie determinada.

Cepas atípicas a menudo son miembros de un determinado biogrupo dentro de una especie ya existente, pero a veces son típicos miembros de una nueva especie no reconocida (Baron, 1996).

En la taxonomía numérica, también llamada taxonomía fenotípica o computarizada (Baron, 1996), el fenotipo de las bacterias comprenden características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Individualmente, muchas de estas características han demostrado ser irrelevantes como parámetros para la relación genética, pero en su conjunto, proporcionan información descriptiva que nos permite reconocer taxones. La morfología de una bacteria incluye características celulares (forma, endosporas, flagelos, cuerpos de inclusión, coloración de Gram) y de la colonia (color, dimensiones, forma) (Vandamme *et al.*, 1996).

Las características fisiológicas y bioquímicas incluyen datos sobre el crecimiento a diferentes temperaturas, valores de pH, concentraciones de sal, condiciones atmosféricas, crecimiento en presencia de diversas sustancias tales como agentes antimicrobianos, y datos sobre la presencia o actividad de diversas enzimas, metabolización de los compuestos, entre otros (Vandamme *et al.*, 1996).

Todas estas pruebas se utilizan para determinar el grado de similitud entre los organismos. En estudios numéricos, los investigadores suelen calcular el coeficiente de similitud o el porcentaje de similaridad entre las cepas (donde cepa indica un solo aislamiento de una muestra). Cuando se construye un dendrograma o matriz de similaridad se agrupa cepas individuales en grupos y se coloca un grupo con otros grupos sobre la base de su porcentaje de similitud (Baron, 1996).

Un determinado grado de similitud puede estar en relación con el género, la especie, y, a veces, a nivel de subespecies. Por ejemplo, cepas de determinadas especies pueden agruparse a un nivel de similitud del 90%, las especies dentro de un determinado género pueden agruparse a un nivel del 70%, y diferentes géneros de una misma familia puede agruparse al 50% o en menor grado. Cuando este enfoque es la única base para la definición de una especie, es difícil saber cuántas y qué pruebas deben ser elegidas, y qué nivel de similitud debe ser escogido para reflejar la relación entre género y especie (Baron, 1996).

La mayoría de las bacterias tienen suficiente ADN para especificar unos 1500 a 6000 genes promedio. Por lo tanto, incluso un conjunto de 300 pruebas de ensayo sólo especificarían del 5 al 20 por ciento del potencial genético de una bacteria. Pruebas que son relativamente simples

para llevar a cabo, como la utilización de carbohidratos y enzimas se realizan con más frecuencia que las pruebas estructurales, reproductivas, y de genes reguladores, cuyo ensayo es más complicado (Baron, 1996).

Suelen ocurrir errores cuando las especies se clasifican únicamente sobre la base del fenotipo. Por ejemplo, diferentes enzimas, especificadas por diferentes genes, pueden catalizar la misma reacción. Varias características de las cepas pueden afectar a la caracterización fenotípica, entre ellas la tasa de crecimiento, la temperatura de incubación, el requerimiento de sal, y pH. Un mismo conjunto de pruebas no se pueden utilizar para clasificar a todos los grupos de organismos, y no hay ningún número específico de reacciones que permita la identificación de una especie (Baron, 1996).

Como se mencionó anteriormente, para la taxonomía numérica se realizan diferentes pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. En la Tabla 2 se observan algunas de las pruebas que se realizan para este objetivo (Vanderzant *et al.*, 1972).

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas, los cultivos se evalúan con la presencia o ausencia de crecimiento (positivo o negativo) (Vanderzant *et al.*, 1972). A estos resultados se les aplica un análisis numérico con programas que calculan el coeficiente de similitud. Existen distintos tipos de coeficientes utilizados para la construcción de dendrogramas, algunos de ellos se muestran en la Tabla 3 con su respectiva fórmula para el cálculo del coeficiente. Las similaridades (sg_{ij}) derivadas de estas expresiones se deben transformar posteriormente en medidas de distancias genéticas mediante la siguiente ecuación: $dg_{ij} = 1 - sg_{ij}$. (Moura *et al.*, 1999).

Los cálculos se elaboran generalmente en paquetes informáticos que permiten obtener dendrogramas de los distintos análisis para producir un método simplificado de clasificación visual de los datos (Moura *et al.*, 1999).

Aunque la taxonomía numérica es un método de caracterización fenotípica no es del todo confiable. Los organismos se pueden identificar en la base del fenotipo, pero, desde el punto de vista taxonómico, la definición de las especies sobre esta base está sujeta a error (Baron, 1996). Por tal motivo, en la práctica, el enfoque de la taxonomía bacteriana debe ser polifásica, es decir agrupar información fenotípica, genotípica y filogenética (Vandamme *et al.*, 1996).

El primer paso es la agrupación fenotípica de las cepas mediante las características morfológicas y bioquímicas, lo que se consigue con las pruebas de taxonomía numérica. Los representantes de los grupos fenotípicos son entonces sometidos a pruebas de ADN para determinar si la homogeneidad fenotípica (o heterogeneidad) se refleja en la homogeneidad o heterogeneidad filogenética (Baron, 1996).

Tabla 2. Características utilizadas para los análisis de taxonomía numérica.

Características	Detalle
Tiempo de máxima turbiedad	1, 2, 3, 5, 7, 14, 28 días
Crecimiento a	0, 3, 6, 10, 15, 20, 27, 32, 35, 37, 40, 42, 45 °C
Crecimiento a pH	4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0
Requerimiento de sal	NaCl, MgSO ₄ , CaCl ₂ , KCl, medio sin sal
Requerimiento de aminoácidos y purinas	Ácido Glutámico, Alanina, Ácido aspártico, Arginina, Prolina, Metionina. Leucina, Fenil-alanina, Tirosina, Triptófano, Treonina, Serina, Histidina, Isoleucina, Valina, Lisina, Adenina, Guanina, Cisteína.
Única fuente de carbono y nitrógeno	Alanina, Prolina, Ácido Glutámico, Metionina, Lisina, Treonina, Fenil-alanina
Requerimiento de vitaminas	Ácido fólico, Riboflavina, Niacina, Tiamina, Pantotenato, Vitamina B12, Piridoxina, Colina, Biotina
Sensibilidad a antibióticos	Penicilina G, Dihidroestreptomicina, Clortetraciclina, Oxytetraciclina, Tetraciclina, Streptomycina, Cloramfenicol
Ácidos a partir de	Glucosa, Lactosa, Manitol, Arabinosa, Sucrosa, Galactosa, Rafinosa, Ramnosa
Hidrólisis de	Esculina, Almidón, Caseína, Gelatina
Producción de	H ₂ S, Gas (Triple azúcar-hierro), Indol, NO ₂ a partir de NO ₃ , NH ₃ a partir de arginina, Catalasa, Ureasa, Citocromo oxidasa.
Utilización de citrato	
Prueba de rojo metilo	
Prueba de Voges-Proskauer	

Fuente: Vanderzant, *et al*, 1972.

Tabla 2. Continuación...

Características	Detalle
Utilización de Glucosa	Oxidación o fermentación
Tinción de Gram	Positiva, negativa o variable
Inclusiones	Gránulos, grasa
Morfología Celular	
<i>Largo</i>	< 0.5 μm , 0.5-1.2 μm , 1.3-3.0 μm , >3.0 μm
	Delgado, [largo(l) x ancho (a)] 3:1 – 6:1
<i>Ancho</i>	Corto, l x a, 2:1 – 3:1
	Oval, l x a, 1:1
<i>Forma</i>	Recta, Curva. Espiral, Coco-bacilar, Coco, Ramificado, Borde cuadrado, Borde redondo, Borde cónico, borde fusiforme, Pleomórfico.
Arreglo Celular	Solo, Pareado, Cadenas de menos de 5 células, Cadenas de más de 5 células, Formación en forma de paquetes con cocos, Filamentos, Arreglo celular variable.
Características de la Colonia	
<i>Tamaño</i>	< 2 mm de diámetro, 2 – 5 mm de diámetro, diámetro mayor a los 5 mm.
<i>Forma (elevación)</i>	Plana, Convexa, Umbonada
<i>Forma (borde)</i>	Entero, Ondulado, Filamentoso, Rizado.
<i>Densidad de la Colonia</i>	Transparente, Translúcida, Opaca.
Formación de pigmento	
<i>No difusible</i>	Blanco, Blanco grisáceo, Rojo, Rosado, Tomate, Amarillo, Violeta, Café, Negro, Azul.
<i>Difusible</i>	Amarillo, Verde, Café, Negro.

Fuente: Vanderzant, *et al*, 1972.

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	$\frac{a}{a + b + c}$
Sorensen-Dice (SD)	$\frac{2a}{2a + b + c}$
Ochiai (O)	$\frac{a}{\sqrt{(a + b)(a + c)}}$
Ochiai (OII)	$\frac{a}{\sqrt{(a + b)(a + c)(d + b)(d + c)}}$

Fuente: Moura *et al.*, 1999.

2.1.5. Generalidades del ADN

Una bacteria como *Escherichia coli* contiene 0.01 pg de ADN por célula que alcanza una longitud aproximada de 1 mm, la cual contiene 4 millones de pares de nucleótidos. En contraste, una célula humana tiene 6 pg de ADN con una longitud total de 174 cm. Entonces, el cuerpo humano que se encuentra formado de trillones de células en total posee una longitud de 10 a 20 billones de millas de ADN de doble hélice (Mitra, 2003).

Debido a la gran longitud del ADN, este debe poseer un mecanismo que le permita compactarse dentro del núcleo celular. Esto se logra por la interacción del ADN con las proteínas que permite la formación de los cromosomas. El genoma humano consiste de 23 pares de cromosomas con alrededor de 3 billones de pares de bases a partir de cada progenitor. El contenido y longitud del ADN varía de especie a especie. El ADN también es muy ligero 1 mm pesa $3,26 \times 10^{-18}$ g (Mitra, 2003).

El ADN es extremadamente sensible a las fuerzas mecánicas debido a su gran tamaño. Incluso las manipulaciones rutinarias del laboratorio como pipetear puede romper el ADN en fragmentos más pequeños. Sin embargo, una vez aislado, el ADN es una macromolécula relativamente estable y se la puede almacenar seca o congelada en etanol (Mitra, 2003).

El ADN es un polímero de nucleótidos por tal motivo su tamaño y peso molecular pueden ser estimados a través de una variedad de técnicas como centrifugación equilibrada en una

gradiente de densidad, microscopía electrónica o electroforesis en geles de agarosa. Esta última es la más comúnmente utilizada para la estimación del tamaño del ADN (Mitra, 2003).

Con excepción de algunos bacteriófagos que poseen ADN de una sola hebra, las bacterias y los organismos superiores poseen ADN de doble cadena. Los virus contienen ADN o ARN como material genético pero requieren de una célula huésped para su propagación (Mitra, 2003).

El ADN es soluble en agua y puede ser precipitado con etanol o isopropanol en presencia de una sal (0.1 M NaCl). El ADN precipitado y seco se observa como fibras blanquecinas. Debido a su gran peso molecular, puede tomar varias horas llevar el ADN a solución. El ADN es ácido debido a los grupos fosfato en el extremo del azúcar-fosfato el cual está completamente ionizado a cualquier pH sobre 4. Estos grupos fosfato en la otra periferia de la doble hélice se encuentran expuestos a un ambiente acuoso e imparten carga negativa. Además pueden unir cationes divalentes como el magnesio y el calcio (Mitra, 2003).

El ADN bacteriano está asociado a policationes aminos como la espermina y la espermidina, los cuales confieren estabilidad y flexibilidad al ADN. Inclusive en soluciones diluidas, el ADN es muy viscoso debido a su estructura y tamaño en relación a su diámetro. Por esta razón se comporta como un verdadero soluto solo en soluciones muy diluidas. Sin embargo, si las cadenas de ADN son separadas por medios físicos o químicos, esto conlleva a la disminución de su viscosidad. La ultracentrifugación en gradientes de sacarosa es utilizada para determinar el peso molecular del ADN mediante la comparación con ADN de tamaño y coeficiente de sedimentación conocido (Mitra, 2003).

Cuando el ADN se encuentra en solución es más fácil la separación de las cadenas (denaturación) como consecuencia de pHs extremos, calor o exposición a químicos como urea o amidas. El decrecimiento de la viscosidad, el incremento de la absorbancia a 260 nm, la disminución de la densidad o la rotación óptica negativa indican denaturación del ADN. El proceso de denaturación afecta únicamente a las interacciones no covalentes presentes entre las dos cadenas del ADN. Dado que las uniones G-C se encuentran unidas por tres puentes de hidrógeno mientras que las uniones A-T solo por dos, el ADN rico en A-T es fácilmente denaturado en comparación con el ADN rico en G-C (Mitra, 2003).

2.1.5.1. Aislamiento de ADN

Una vez purificado, el ADN es un polímero estable si es almacenado apropiadamente. Los pasos básicos en el aislamiento de ADN involucran el rompimiento de la célula (lisis) mediante el tratamiento con detergentes, la remoción de las proteínas celulares por digestión enzimática con una proteasa o por extracción con fenol - cloroformo y la precipitación del ADN por una mezcla de etanol y una sal (Mitra, 2003).

El ADN precipita en forma de material fibroso, el cual puede ser recolectado y purificado mediante digestión enzimática selectiva para separar el ARN que pudo co-precipitar durante el proceso de aislamiento (Mitra, 2003).

La presencia de detergentes, agentes quelantes, y proteasas como la proteinasa K durante el proceso de aislamiento previene cualquier hidrólisis del ADN por nucleasas celulares y asegura el aislamiento de ADN intacto (Mitra, 2003).

2.1.5.2. Electroforesis en gel para la purificación de ácidos nucleicos

La electroforesis en gel separa al ADN por tamaño. Un gel es cargado con fragmentos de ADN y un potencial eléctrico es aplicado a través del gel. Como el ADN se encuentra cargado negativamente migra hacia el electrodo positivo. Los fragmentos grandes colisionan con la matriz del gel y se mueven lentamente, mientras que los fragmentos más pequeños se mueven con mayor rapidez. La fuerza de fricción del gel actúa como un colador molecular y separa las moléculas por tamaño. La velocidad de migración de las macromoléculas depende de la fuerza del campo, el tamaño y forma de las moléculas, la fuerza iónica y la temperatura del buffer. Después de ser teñidas, las macromoléculas separadas pueden ser observadas como una serie de bandas distribuidas de un extremo del gel al otro (Mitra, 2003).

Las separaciones de ácidos nucleicos por electroforesis se realizan usualmente en geles de agarosa. El gel es vertido para que tome la forma de una capa delgada con pozuelos para cargar la muestra. Este gel es sumergido en un buffer, el cual mantiene el pH requerido y provee los iones que conducen la corriente eléctrica. La tinción del gel con la ayuda de un colorante como el bromuro de etidio (5 mg/ml) permite la detección de los ácidos nucleicos por su fluorescencia. Durante la electroforesis en gel, las muestras de ADN son mezcladas con un buffer de cargado que permite que el ADN se observe mientras se carga. Este buffer contiene glicerol o sacarosa que permite que la muestra se haga más densa para descender al fondo de los pozuelos en el gel (Mitra, 2003).

2.1.5.3. Características del gel de agarosa

La agarosa es un polisacárido lineal obtenido a partir de algas. Está formada de unidades básicas repetidas de agarobiosa (galactosa y 3,6-anhidrogactosa). La agarosa es utilizada en concentraciones del 0.5 al 3% (Mitra, 2003).

Los geles de agarosa se forman suspendiendo agarosa seca en un buffer acuoso. Posteriormente, se hierve la mezcla hasta obtener una solución clara. Esta es vertida en un molde y se la deja enfriar a temperatura ambiente hasta formar un gel rígido. Sin embargo, es muy frágil y puede ser fácilmente destruida durante su manejo. Mientras mayor es la concentración de agarosa, el gel se vuelve más rígido y esto conlleva a la disminución del tamaño de los poros. Es conocido que la movilidad electroforética de las macromoléculas es proporcional a la fracción del volumen de los poros a los cuales la macromolécula puede ingresar. Utilizando una concentración adecuada de agarosa y un campo eléctrico apropiado, los fragmentos de 200 a 50.000 pb pueden ser separados. La Tabla 4 muestra las concentraciones

apropiadas de agarosa para la separación de fragmentos de ADN de distinto tamaño (Mitra, 2003).

2.1.6. Técnicas de Identificación Molecular

Los métodos genotípicos se han convertido cada vez más en parte integrante de la investigación clínica y microbiológica. Actualmente, las técnicas genotípicas microbianas incorporan biología molecular para distinguir con fiabilidad las cepas bacterianas. Los métodos genotípicos más utilizados para el secuenciamiento de ADN se muestran en la Tabla 5 con sus respectivos procedimientos (Olive & Bean, 1999).

2.1.6.1. Rep-PCR.

Este método de fingerprinting bacteriano utiliza primers que corresponden a elementos repetitivos de ADN presentes en los genomas bacterianos. Tres métodos de análisis de secuencias repetitivas se utilizan para este propósito. Estos métodos son, REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence PCR), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence PCR) y BOX-PCR (Extragenic Repeating Elements PCR) (Scott *et al.*, 2002).

Tabla 4. Concentración de agarosa en gel para la separación de fragmentos de ADN.

Porcentaje (w/v) de Agarosa en gel	Rango de ADN lineal (pb)
0.3	5000 – 60.000
0.6	1000 – 20.000
0.7	800 – 10.000
0.9	500 – 7.000
1.2	400 – 6.000
1.5	200 – 3.000
2.0	100 – 2.000

Fuente: Olive & Bean, 1999.

Tabla 5. Comparación de procedimientos de varios métodos moleculares.

PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis)	RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR)	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	CFLP (Cleavase Fragment Length Polymorphism)	AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	Secuenciamiento de ADN
Organismos atrapados en agarosa	Amplificación con PCR	PCR con primers REP o ERIC	PCR con un solo primer	Amplificación con PCR	Digestión con enzimas de restricción	Reacciones de secuenciamiento por PCR
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Digestión con proteínasa	Digestión con enzimas de restricción	Electroforesis en gel	Electroforesis en gel	Digestión con exonucleasas	Ligamiento de fragmentos a enlaces	Electroforesis en gel
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Digestión con enzimas de restricción	Electroforesis en gel	Tinción del gel	Tinción del gel	Purificación en una columna giratoria	PCR selectivo	Análisis de secuencias asistido por computadora
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Electroforesis	Tinción del gel	Interpretación	Interpretación	Digestión con Cleavase I	Electroforesis en gel a través de un secuenciador automático de ADN	Interpretación
↓	↓			↓	↓	
Interpretación	Interpretación			Electroforesis	Interpretación	
				↓		
				Transferencia a un filtro de nylon durante la noche		
				↓		
				Exposición a quimio- luminiscencia		
				↓		
				Interpretación		

Fuente: Olive & Bean, 1999.

Primeramente, se encuentran los elementos REP (Repetitive Extragenic Palindromic elements) que son secuencias de 38 pares de bases que constan de seis posiciones degeneradas y de un

bucle variable de 5 pares de bases entre cada lado de la secuencia palindrómica conservada. Las secuencias REP se han descrito para numerosas bacterias entéricas. La naturaleza palindrómica de los elementos REP y su capacidad para formar estructuras de brazo y argolla conllevan a funciones de multipropósito para estos elementos dispersos altamente conservados (Olive & Bean, 1999).

Las secuencias ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) han sido usadas exitosamente para el tpeo de ADN. Las secuencias ERIC constan de 126 pares de bases que contienen en la parte central una repetición invertida altamente conservada y están localizadas en regiones extragénicas del genoma bacteriano (Olive & Bean, 1999).

Aunque, las secuencias REP y ERIC son las utilizadas, existe otro elemento repetitivo, las secuencias BOX, que al principio únicamente fueron utilizadas para identificar a *Streptococcus pneumoniae* pero se ha descubierto que también se encuentran en numerosas especies bacterianas para las que actualmente se utilizan. Estas secuencias están localizadas en regiones intergénicas y pueden formar también estructuras de brazo y argolla. Son conjuntos de elementos repetitivos compuestos de varias combinaciones de secuencias de tres subunidades conocidas como boxA, boxB y boxC, las cuales constan de 59, 45, y 50 nucleótidos respectivamente (Olive & Bean, 1999).

El rep-PCR se puede realizar con ADN extraído a partir de colonias bacterianas o utilizando métodos modificados que utilizan células enteras sin procesar. La amplificación REP o ERIC puede ser llevada a cabo con un solo primer, un set de primers o múltiples sets de primers. Los patrones de ERIC son generalmente menos complejos que los patrones REP, pero los dos proveen de una buena separación a nivel de cepas. La aplicación simultánea de REP y ERIC PCR a muestras seleccionadas incrementan el poder de identificación (Olive & Bean, 1999).

Rep-PCR se está convirtiendo rápidamente en el método más utilizado para el tpeo de ADN. Esto se debe a que esta técnica es fácil de realizar y puede ser aplicada a un pequeño o gran número de aislamientos. Además, muestra mayor aplicabilidad a un gran número de especies y un poder discriminatorio superior al de los análisis de restricción utilizando el gen del ARNr 16S. Además, estudios que han comparado al Rep-PCR con otras técnicas de tpeo como MLEE (multilocus enzyme electrophoresis), caracterizaciones bioquímicas o ribotipeo, muestran que este método es superior a los anteriores. Además, varias investigaciones indican que Rep-PCR tiene buena correlación con los resultados de PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) aunque con menor poder discriminatorio (Olive & Bean, 1999).

Rep-PCR ha sido adaptado a un formato automático en donde los primers marcados con fluorescencia son utilizados para crear un perfil REP o ERIC y las secuencias amplificadas son separadas mediante un secuenciador basado en la fluorescencia del ADN. Este método permite la formación de patrones consistentes y el almacenamiento de la información obtenida en bases de datos como una imagen digital (Olive & Bean, 1999).

2.1.7. Antagonismo Microbiano

En la actualidad, los metabolitos secundarios microbianos poseen gran efecto en la salud, nutrición y economía de nuestra sociedad. Estos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, efectores de la competición ecológica y simbiosis, feromonas, inhibidores de enzimas, agentes inmunomoduladores, receptores antagonistas y agonistas, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento de plantas y animales. Generalmente, poseen estructuras inusuales y su formación es regulada por nutrientes, tasas de crecimiento, inactivación e inducción de enzimas (Demain, 1998).

Los mecanismos de inhibición del crecimiento y desarrollo de microorganismos, especialmente contra patógenos, no son muy conocidos, y pueden involucrar factores bióticos y/o abióticos, incluso pueden variar de acuerdo al patógeno y al microorganismo que produce la inhibición. Lo que sí está claro es que la presencia de uno o varios microorganismos antagónicos, permite la producción de antibióticos, por lo que evitan que poblaciones de microorganismos patógenos alcancen niveles suficientemente altos para causar enfermedad (Rodríguez, 2002).

La determinación de la capacidad antagónica de los actinomicetes ocurre en varias etapas. La inicial involucra identificar aquellos que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos modelo como bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos filamentosos y levaduras. Una vez determinado el espectro de inhibición, es posible continuar con pruebas más elaboradas para elucidar la estructura química del compuesto bioactivo, junto con otros experimentos relacionados a la posibilidad de usarlo como un producto comercial.

Uno de los métodos más utilizados para pruebas preliminares de antagonismo, es el de los cilindros de agar. Consiste en hacer perforaciones cilíndricas con un instrumento estéril, en varias partes de un medio sólido sobre el cual un cultivo de actinomicetes ha estado creciendo por varios días. Luego los cilindros son colocados sobre la superficie de un medio de cultivo en el cual se haya inoculado alguno de los microorganismos modelo. Debe hacerse de tal manera que la parte del cilindro que presente el crecimiento del actinomicete este en contacto con el medio de cultivo en el que es colocado. Luego de un período de incubación, que varía entre 48 – 72 horas, se observa si existen zonas de inhibición, las que serán más grandes mientras mayor sea la actividad antagónica. Un método alternativo es el método de disco. Aquí se procede de igual forma que en el método anterior, pero en lugar de perforar el agar, se depositan discos de papel saturados con el organismo a ser evaluado, sobre la superficie de un medio de cultivo inoculado con alguno de los microorganismos modelo. Después de incubar, si hay actividad, alrededor de los discos aparecerán zonas de inhibición (Phillips, 1994).

2.1.7.1. Tipos de zona de inhibición

Phillips (1994), menciona que existen cuatro tipos diferentes de zonas de inhibición:

2.1.7.1.1. Zona completamente clara

La actividad antimicrobiana provoca la muerte del microorganismo modelo mediante la producción de un fungicida o bactericida, y por lo tanto, impide el crecimiento del microorganismo.

2.1.7.1.2. Zona opaca

Una proporción de la población del organismo a prueba es resistente al compuesto antimicrobiano. El compuesto solamente ha reducido el crecimiento del organismo a prueba.

2.1.7.1.3. Zona doble, la interna clara y la externa opaca

Existe una concentración en la cual la actividad antimicrobiana del compuesto es letal para el organismo a prueba. Más allá de esta concentración una parte de la población es resistente y el crecimiento de la población es reducido.

2.1.7.1.4. Zona doble, la interna opaca y la externa clara

Este caso es muy improbable, pero puede ocurrir si, luego de que se ha iniciado la difusión del compuesto activo, se liberan enzimas degradadoras desde el bloque.

2.1.7.1.5. Dos zonas de diferente densidad

Existen dos niveles de concentración a los cuales diferentes proporciones de la población son sensibles.

2.1.7.2. Tamaño de zona de inhibición

El tamaño de zona es una medida de la actividad que se utiliza para jerarquizar organismos en grupos que servirá para su estudio posterior. Sin embargo, cuando se trate de interpretar los resultados, debe tomarse en cuenta que se desconoce la potencia (cantidad del compuesto que se requiere para lograr un efecto antimicrobiano), cantidad, estructura química, modo de acción, y el posible número de compuestos producidos por el actinomicete.

2.1.7.3. Factores que influyen el tamaño de la zona

El tamaño de la zona se ve influenciado por varios factores, siendo una de las más importantes la concentración de esporas o células en la suspensión que contiene el microorganismo modelo. Se debe mantener una concentración constante en la suspensión para minimizar cualquier pequeña variación (Phillips, 1994).

Otro factor importante es la densidad del inóculo del organismo antagónico potencial, ya que un inóculo inicialmente más pesado lleva una definición más precisa de la zona, aunque también

resulta en zonas más pequeñas. Intervalos de tiempo de una hora o más entre la aplicación de la solución prueba a los platos y el inicio de la incubación permite la difusión del metabolito secundario antes que la multiplicación del organismo prueba se haga apreciable. Un período más largo de predifusión lleva a zonas más grandes y también a gradientes más pronunciadas. Si la predifusión tiene lugar en un refrigerador se minimiza el crecimiento durante este período, pero también se reduce la tasa de difusión. En una sola prueba puede haber diferencias de diez a veinte minutos entre el llenado del primero y el último de los reservorios (Phillips, 1994).

Tener un medio más rico da como resultado un crecimiento más rápido del organismo de prueba y una gradiente menos pronunciada de la línea de respuesta. La incubación a temperaturas no óptimas llevará al crecimiento más lento del organismo prueba y consecuentemente zonas más grandes y gradientes más pronunciadas de la línea de respuesta. Es claro que cualquiera que sea la temperatura que se escoja para la incubación, su uniformidad y la uniformidad de la tasa de temperatura de los platos es más importante que el valor absoluto de la temperatura (Phillips, 1994).

2.1.8. Características de los microorganismos modelo

2.1.8.1. Hongos

Los hongos tienen pocos requerimientos nutricionales, y poseen un modo heterotrófico de nutrición. A diferencia de los animales que obtienen su alimento por ingestión, los hongos obtienen los nutrientes por digestión extracelular ligado a su capacidad de secretar enzimas, seguido por la absorción de los productos solubilizados. En el curso de la evolución, los hongos han conquistado un amplio rango de hábitats, cumpliendo roles importantes en la diversidad de los ecosistemas. La facilidad de poblar varios ecosistemas se da debido a la producción de numerosas esporas, las cuales una vez que alcanzan a colonizar una fuente de alimento, logran la máxima eficiencia por el tipo de crecimiento que presentan como un sistema de tubos ramificados (hifas), las cuales en conjunto forman el micelio (Webster & Weber, 2007).

2.1.8.1.1. Características de la pared celular de Hongos

Aunque la composición química de las paredes celulares varía considerablemente entre y dentro de los diferentes grupos de hongos (Tabla 6), el diseño básico parece ser universal. Consiste de una estructura de fibras las cuales se encuentran entrecruzadas y una matriz de gel o material cristalino. El grado de entrecruzamiento determina la extensibilidad de la pared, mientras que el tamaño del poro determina la permeabilidad (Webster & Weber, 2007).

En Ascomicetes y Basidiomicetes, las fibras son microfibrillas de quitina compuestas de cadenas lineales de β -(1,4)-N-acetilglucosamina, las cuales son sintetizadas en la membrana plasmática y empujadas hacia la nascente pared celular, alrededor del domo apical. La pared celular se vuelve rígida solo después que las microfibrillas se han colocado en el lugar adecuado para el

entrecruzamiento. Los enlaces consisten de glucanos (polímeros de glucosa) altamente ramificados, especialmente aquellos en donde las fracciones de glucosa están unidas por enlaces β -(1,3) y β -(1,6) (Webster & Weber, 2007).

Las proteínas representan el tercer constituyente más importante de las paredes celulares de los hongos. Además las enzimas involucradas en la síntesis, lisis o digestión extracelular, son también proteínas estructurales. Muchas proteínas de la pared celular son modificadas por glicosilación, por ejemplo la unión de cadenas de oligosacáridos al polipéptido (Webster & Weber, 2007).

El grado de glicosilación puede ser muy alto, especialmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, donde más del 90% del peso molecular de una proteína extracelular puede ser aportado por sus cadenas glicosidadas. La manosa es el principal componente de estas cadenas, por tal motivo dichas proteínas son llamadas manoproteínas o mananos (Webster & Weber, 2007).

En *S. cerevisiae*, el tamaño del poro de la pared celular no está determinado por la matriz de glucanos sino por las manoproteínas situadas en la superficie externa de la pared. Las proteínas expuestas a la superficie de la pared celular pueden también determinar las propiedades de la superficie como la adhesión y reconocimiento (Webster & Weber, 2007).

Las proteínas estructurales contienen un tipo de ancla compuesta de glicosilfosfatidilinositol mediante la cual se unen al lumen del retículo endoplasmático rugoso y luego a la superficie de la membrana citoplasmática externa, o un tipo de ancla modificada la cual se une covalentemente a la fracción β -(1,6) de glucano de la pared celular (Webster & Weber, 2007).

En los Zigomicetes, las fibras de quitina son modificadas después de su síntesis por una parcial o completa desacetilación que produce poli- β -(1,4)-glucosamina, llamada también quitosano. Las fibras de quitosano se entrecruzan por polisacáridos que contienen ácido glucorónico y varios azúcares neutrales. La matriz de la pared celular consta de glucanos y proteínas como en los miembros de otros grupos de hongos (Webster & Weber, 2007).

Tabla 6. Composición química de las paredes celulares de grupos seleccionados de hongos (porcentaje).

Grupo	Ejemplo	Quitina	Celulosa	Glucanos	Proteínas	Lípidos
Oomycota	<i>Phytophthora</i>	0	25	65	4	2
Chytridiomycota	<i>Allomyces</i>	58	0	16	10	?
Zygomycota	<i>Mucor</i>	9*	0	44	6	8
Ascomycota	<i>Saccharomyces</i>	1	0	60	13	8
	<i>Fusarium</i>	39	0	29	7	6
Basidiomycota	<i>Schizophyllum</i>	5	0	81	2	?
	<i>Coprinus</i>	33	0	50	10	?

* Principalmente quitosano

Fuente: Webster & Weber, 2007.

Una característica especial que distingue a los Oomicetes de los hongos verdaderos (Eumicetes) es la ausencia de quitina en las paredes celulares, aunque se sabe que la quitina es producida por ciertas especies de Oomicetes bajo ciertas condiciones. Sin embargo, en los Oomicetes el papel estructural de la quitina es llenado por la celulosa, un agregado de cadenas lineales de β -(1,4)-glucano (Webster & Weber, 2007).

2.1.8.2. Bacterias Gram positivas y Gram negativas

Las bacterias se dividen en dos grandes grupos: las Gram positivas y las Gram negativas. La distinción inicial entre estos dos tipos se lleva a cabo mediante una tinción diferencial denominada tinción de Gram. La diferente reacción a la tinción de Gram se basa en las diferencias que existen en la estructura de las paredes celulares. La morfología de las paredes celulares es muy distinta en las células Gram positivas y Gram negativas (Madigan *et al.*, 2004).

En la pared celular de *Bacteria* hay una capa rígida que es la responsable de la resistencia de la pared celular. En las bacterias Gram negativas existen capas adicionales que se sitúan en el exterior de esta. Esta capa rígida tiene una composición química muy similar tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Se denomina capa de peptidoglicano o mureína y está formada por finas láminas compuestas por dos derivados de azúcares, N – acetilglucosamina y ácido N – acetilmurámico, y un pequeño grupo de aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D-glutámico y o bien lisina o ácido diaminopimélico (DAP). Estos componentes se unen

entre sí para formar una estructura repetitiva que se denomina tetrapéptido del glicano (Madigan *et al.*, 2004).

En bacterias Gram positivas, el peptidoglicano representa hasta el 90% de la pared, aunque otra clase de componentes, los ácidos teicoicos, también suelen estar presentes en pequeñas cantidades. Aunque algunas bacterias poseen sólo una capa de peptidoglicano rodeando a la célula, muchas otras, presentan varias capas (hasta 25 en algunos casos). En bacterias Gram negativas, el peptidoglicano constituye sólo alrededor del 10% de pared, estando constituido el resto por una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos (Madigan *et al.*, 2004).

2.2. Fundamentación Filosófica

La presente investigación se basa en el paradigma positivista que tiene como escenario de investigación el laboratorio a través de un diseño preestructurado y esquematizado. Su lógica de análisis está orientado a lo confirmatorio, reduccionista, verificación, inferencial e hipotético deductivo mediante el respectivo análisis de resultados. Además de realidad es única y fragmentable en partes que se pueden manipular independientemente, y la relación sujeto – objeto es independiente. Para este enfoque la realidad es algo exterior, ajeno, objetivo y puede y debe ser estudiada y por tanto conocida.

En una interpretación antojadiza del Génesis el Hombre sería el centro del Universo, y por tanto el origen del antropocentrismo, aunque otros encuentran fundamentos del mismo en los planteamientos filosóficos de René Descartes. El antropocentrismo habría generado la crisis ecológica en que vivimos. En oposición se ha generado un fuerte movimiento biocentrista como manera de poner énfasis en nuevos paradigmas que sirven de auxilio a la detención de la creciente destrucción de la biodiversidad y la disminución de la calidad de vida.

Dicho nuevo paradigma supone una nueva visión de mundo o “Weltanschauung” en el cual existe el dominio responsable de la naturaleza. Se radicaliza, en algunos casos, con la idea de la igualdad del Hombre con la Naturaleza. Este nuevo paradigma que genera una visión nueva de la ética tiene raíces en planteamientos cristianos, budistas, sintoístas. En cuanto a los cristianos podemos mencionar los Salmos de la Creación (104 y 15).

De esta concepción denominada biocéntrica aparecen o se desglosan dos tipos de obligaciones: a saber, una negativa que se configura en evitar los daños e incluso riesgos generados por el actuar del hombre frente a la vida y a la biodiversidad, así como otra positiva, consistente en recurrir por medio de la investigación científica y las aplicaciones tecnológicas a investigar los procesos naturales en peligro.

2.3. Fundamentación Legal

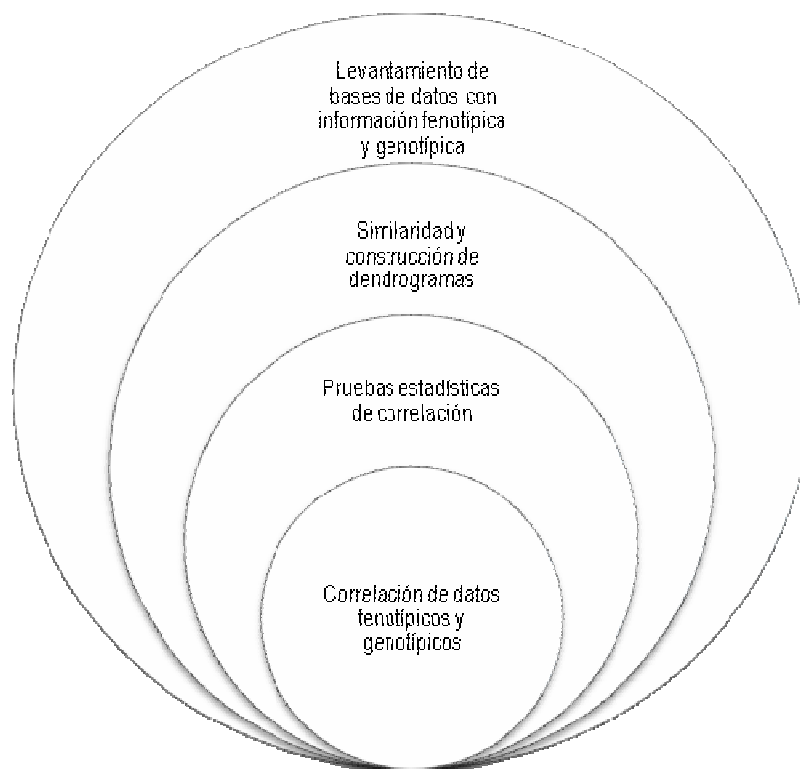
La presente investigación se apoya en el Art. 400 de la Constitución de la República del Ecuador en el Capítulo Segundo (Biodiversidad y Recursos Naturales) en la Sección Segunda (Biodiversidad) menciona que el Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, cuya administración y gestión se realizará con responsabilidad intergeneracional. Se declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola y silvestre y el patrimonio genético del país.

Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) en el Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe señala que la Biodiversidad requiere la unificación de metodologías para el análisis de la biodiversidad genética, funcional y morfológica en agroecosistemas y ecosistemas naturales, utilizando aproximaciones moleculares entre otras.

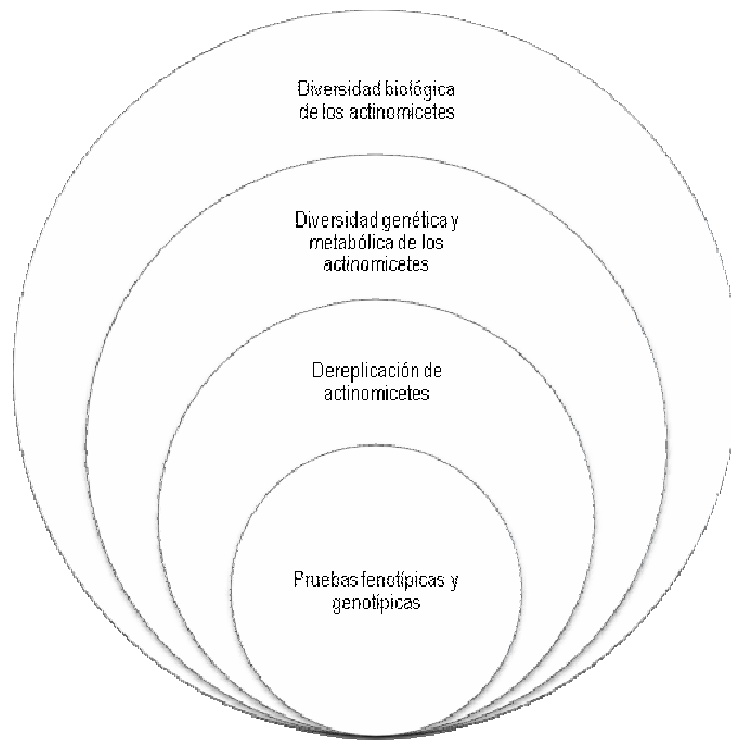
2.4. Categorías fundamentales

2.4.1. Para la hipótesis de correlación de datos fenotípicos y genotípicos

2.4.1.1. Variable Dependiente

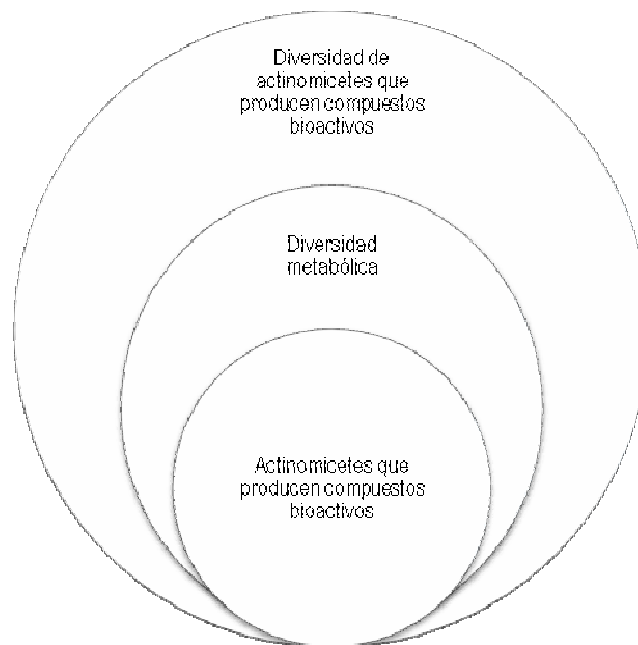


2.4.1.2. Variable Independiente

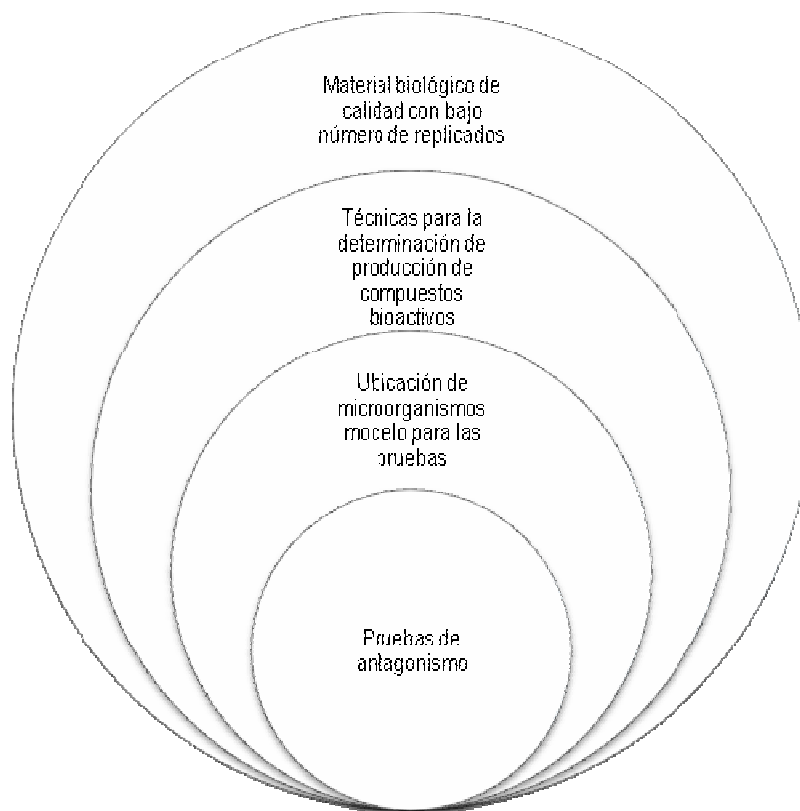


2.4.2. Para la hipótesis de producción de compuestos bioactivos

2.4.2.1. Variable Dependiente



2.4.2.2. Variable Independiente



2.5. Hipótesis

2.5.1. Hipótesis para la correlación de datos fenotípicos y genotípicos

2.5.1.1. Hipótesis nula

No existen diferencias entre los grupos-especie luego del análisis individual de los datos de la caracterización fenotípica y genotípica de los actinomicetes.

2.5.1.2. Hipótesis alternante

Existen diferencias entre los grupos-especie luego del análisis individual de los datos de la caracterización fenotípica y genotípica de los actinomicetes.

2.5.2. Hipótesis para la producción de compuestos bioactivos

2.5.2.1. Hipótesis nula

Todos los actinomicetes representantes de los grupos-especie producen compuestos bioactivos.

2.5.2.2. Hipótesis alternante

Algunos actinomicetes representantes de los grupos especies producen compuestos bioactivos.

2.6. Señalamiento de variables de las hipótesis

2.6.1. Para la hipótesis de la correlación de datos fenotípicos y genotípicos

Para aceptar, rechazar o modificar la hipótesis nula se usarán las siguientes variables independientes:

- Caracterización fenotípica de los aislamientos
 - Rango de crecimiento relacionado a temperatura
 - Rango de crecimiento relacionado a pH
 - Diferentes carbohidratos y aminoácidos como única fuente de energía y materia.
 - Diferentes aminoácidos como única fuente de nitrógeno.
 - Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos

- Caracterización molecular
 - Pruebas de rep-PCR para obtener patrones de bandas (fingerprintings).

2.6.2. Para la hipótesis de la producción de compuestos bioactivos

Para aceptar, rechazar o modificar la hipótesis nula se usarán la siguiente variable independiente:

- Pruebas de antagonismo en contra de bacterias y hongos modelo.

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1. Modalidad básica de la investigación

Experimental

3.2. Nivel o tipo de investigación

Básica exploratoria

3.3. Población y muestra

De los 175 cultivos de actinomicetes recuperados de la colección de cultivos de microorganismos del Departamento de Ciencias Biológicas de la ESPOCH, solo se continuó con el estudio de 133. Cultivos no puros, con características de bacterias diferentes a actinomicetes, y aquellos en los que no se pudo aislar ADN genómico, no fueron tomados en cuenta en la presente investigación.

3.4. Operacionalización de variables

Ver página siguiente.

3.5. Plan de recolección de información

3.5.1. Caracterización Fenotípica

3.5.1.1. Caracterización macroscópica

Los colores del micelio aéreo y reverso de la colonia fueron determinados usando una tabla estándar de colores (British Standard Specification for colours for identification coding and special purposes) (Anexo F), en cultivos crecidos en agar extracto de levadura extracto de malta (GYM) y agar avena (Anexo D), luego de haber sido incubados a 28°C por siete días. Además se reportó la presencia o ausencia de micelio aéreo en las colonias, y la presencia de crecimiento en agar avena (Anexo D). Aquellos actinomicetes que presentaron características macroscópicas similares fueron ubicados en un mismo grupo de color.

3.5.1.2. Caracterización microscópica

La morfología de las cadenas de esporas presentes en el micelio aéreo se determinó solamente en aquellos cultivos que presentaron ésta característica en sus colonias. Para ello se utilizaron

HIPOTESIS 1	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADORES	INDICES	INSTRUMENTOS	
No existen diferencias entre los grupos-especie luego del análisis individual de los datos de la caracterización fenotípica y genotípica de los actinomicetes.	Dependiente	Los datos genotípicos y fenotípicos tienen una relación directa ya que los últimos dependen de los primeros	Grupos especie identificados en los dendrogramas respectivos de acuerdo al porcentaje de similitud	Similitudes mayores al 80% indican miembros de un mismo grupo especie	Software estadístico NTSys. Microsoft Excel.	
	Independientes	El ADN brinda información genotípica individual de cada microorganismos	Patrones de bandas (fingerprinting) obtenidos mediante rep-PCR	Número y posición de bandas presentes en el fingerprinting	Termociclador Equipo de electroforesis. Equipo de fotodocumentación Software para el análisis de imágenes de geles.	
				Características macroscópicas	Coloración del micelio del sustrato, esporas y cualquier producción de pigmento difusible (Tabla Standard de colores)	
					Presencia o ausencia de micelio aéreo. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0	
					Características microscópicas	Tipo de morfología de las cadenas de esporas (Tabla 1).
Características fisiológicas de crecimiento a diferentes rangos de temperatura y pH	Presencia o ausencia de crecimiento. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0					

Continuación...

HIPOTESIS 1	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADORES	INDICES	INSTRUMENTOS
			Características metabólicas relacionadas a la utilización de diferentes carbohidratos y aminoácido como fuentes únicas de carbono y energía, y aminoácidos como fuente única de nitrógeno.	Presencia o ausencia de crecimiento. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0	

HIPOTESIS 2	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADORES	INDICES	INSTRUMENTOS
Algunos actinomicetes representantes de los grupos especies producen compuestos bioactivos.	Dependiente	Producción de compuestos bioactivos de interés en Biotecnología.	Producción de compuestos antimicrobianos	Número de actinomicetes que producen antibióticos	
	Independientes	Antibióticos producidos por algunos actinomicetes impiden el crecimiento de otros microorganismos.	Inhibición de crecimiento de microorganismos modelo (bacteria gram-positiva, gram negativa, <i>Fusarium</i> y <i>Botrytis</i>)	Diámetro de la zona de inhibición.	Regla

cubreobjetos estériles, los mismos que con la ayuda de una pinza, también estéril, fueron colocados sobre la colonia. De ésta manera, partes del micelio aéreo se adhirieron a la superficie. Luego, el cubreobjetos fue colocado sobre un portaobjetos, cuidando que la parte con la muestra de micelio quede en contacto con el portaobjetos. Finalmente, con la ayuda de un microscopio se determinó el tipo de estructura, usando el lente de inmersión (100X). Los resultados se reportaron de acuerdo a las descripciones que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas

SIMBOLO	TIPO	DESCRIPCION
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.

Fuente: Philips, 1994.

3.5.1.3. Rango de Crecimiento en Función de la Temperatura

Suspensiones de biomasa fueron preparadas a partir de crecimiento de cada actinomiceto sobre membranas de celulosa colocadas sobre la superficie de agar no esporulante (Anexo D), e incubadas por cinco días a 28°C. Porciones de biomasa fueron tomadas con la ayuda de un palillo de dientes estéril, las que fueron transferidas a tubos de centrifugación de 1.5 ml que contenían 1 ml de agua de llave estéril. Cinco microlitros de la suspensión de cada cepa fueron inoculados sobre la superficie de agar GYM. Las cajas fueron incubadas a 50°C, 37°C, 28°C y 4°C durante 2, 4, 7 y 30 días, respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes, mediante código binario. Si el actinomicete presentó crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

3.5.1.4. Rango de Crecimiento en Función del pH

Se inocularon 5 µl de las suspensiones de biomasa en la superficie de agar GYM, ajustado a los siguientes pHs: 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, y 9.5, mediante sistemas de búfers (Anexo D). Las cajas se incubaron a 26°C durante 10 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes, mediante código binario. Si el actinomicete presentó crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0. Además, los cultivos fueron clasificados de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH. Aquellos que crecieron desde 4.5 hasta 6.5 fueron considerados como acidofílicos, aquellos que lo hicieron entre 4.5 hasta 7.5 como neutrotolerantes, mientras que si presentaron crecimiento entre 4.5 hasta 8.5 o 9.5 se los clasificó como alcalitolerantes.

3.5.1.5. Determinación de Uso de Diferentes Fuentes de Carbono y Nitrógeno

Para determinar la capacidad de utilización de distintas fuentes de carbono y nitrógeno por los actinomicetes, se utilizaron los siguientes compuestos: ácido aspártico, ácido glutámico, valina, treonina, arginina, asparagina, fenilalanina, histidina, quitosano, lisina, cisterna, leucina, glicina, tirosina y urea. Estos fueron añadidos a un medio basal (Anexo D), que no contenía ninguna fuente de carbono ni de nitrógeno. Sobre la superficie de cada medio de cultivo se inocularon 5 µl de las suspensiones de biomasa. Las cajas se incubaron durante siete días a 26°C. Posteriormente, se evaluaron tomando en cuenta la presencia o ausencia de crecimiento. Si el actinomicete presentó crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

3.5.1.6. Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Los resultados fenotípicos obtenidos fueron tabulados en una matriz en código binario como se muestra en la Tabla 2 (Anexo A). Las cincuenta y cinco pruebas fenotípicas seleccionadas para el análisis se detallan en la Tabla 8.

3.5.2. Caracterización genotípica

3.5.2.1. Extracción de ADN genómico

Los cultivos puros se crecieron sobre una membrana de celulosa previamente colocada sobre la superficie de agar no esporulante. De esta manera se impidió que el micelio del sustrato se adhiera al agar, facilitando la transferencia de la biomasa para la extracción del ADN. De igual

Tabla 8. Descripción de las pruebas fenotípicas usadas en Taxonomía Numérica

Tipo de prueba	Descripción	
Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 37°C ▪ 4°C 	
Fuentes de carbono y nitrógeno	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitina (Qui) ▪ Lisina (Lys) ▪ Cisteína (Cis) ▪ Leucina (Leu) ▪ Glicina (Gly) ▪ Tirosina (Tyr) ▪ Urea ▪ Ácido aspártico (Asp) ▪ Ácido glutámico (Glu) ▪ Valina (Val) ▪ Treonina (Tre) ▪ Arginina (Arg) ▪ Asparagina (Asn) ▪ Fenil alanina (Phe) ▪ Alanina (Ala) ▪ Histidina (His) 	
pH	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 4.5 ▪ 5.5 ▪ 6.5 ▪ 7.5 ▪ 8.5 ▪ 9.5 	
Caracterización macroscópica	Agar Avena	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Crecimiento ▪ Presencia de micelio aéreo ▪ Producción de pigmento difusible ▪ Color micelio aéreo (15 colores)
	GYM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Presencia de micelio aéreo ▪ Color micelio aéreo (8 colores)
Caracterización microscópica	Tipo de cadena de esporas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Espiral ▪ Recta ▪ Incompleta ▪ Flexous

forma se evitó que el agar sea un factor que interfiera en el experimento. Las cajas inoculadas se incubaron a 26°C por 4 días. Una vez transcurrido éste tiempo, se colocó 400µl de búfer de extracción (Anexo D) junto con aproximadamente 50µl de esferas de vidrio (106µl de diámetro, lavadas en ácido), en un tubo de centrifugación estéril de 1.5 ml. Aproximadamente 100mg 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 se descongelaron a temperatura ambiente y fueron batidos utilizando un vórtex a máxima velocidad por 10 minutos, y centrifugados a máxima velocidad (14000rpm) por 20 minutos. Se transfirieron 200µl del sobrenadante a un nuevo tubo estéril de 1.5 ml, tratando de evitar la biomasa y se añadió 200µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Las soluciones se mezclaron 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 (14000rpm) durante 15 minutos, y se transfirieron 150µl del sobrenadante a un nuevo tubo de centrifugación de 1.5ml. El ADN se precipitó añadiendo 300µl de etanol (100% frío), formando fibras blanquecinas. Los tubos con ADN se centrifugaron a máxima velocidad (14000rpm) 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 se lavó con 500µl 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, se colocaron boca abajo y se secaron a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas, o hasta que el olor a etanol desapareció. Finalmente, el ADN fue resuspendido usando 40µl de búfer TE 1X (Anexo D).

3.5.2.2. 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 1µl de 10000X SYBRSafe por cada 10ml 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 se solidificó, se procedió a colocar el gel en el tanque de electroforesis, asegurándose que los pozuelos formados se encontraran en el lado en donde se aplicó la carga negativa del campo eléctrico. Se mezcló 5 µl de cada muestra con 2.5 µl de loading buffer (Invitrogen) y se colocó dicha mezcla 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 85V por 1 hora. Una vez terminada la electroforesis, las bandas de ADN se visualizaron con la ayuda de luz ultravioleta de un transiluminador ULTRALUM, y fotografiadas mediante el uso de una cámara fotográfica digital CANON, de 6.2 millones de megapíxeles, del equipo ULTRACAM. Las fotografías fueron transferidas a un computador en donde fueron editadas y grabadas en formato TIFF.

Se determinó que el ADN genómico íntegro fue aquel en 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 fue considerada como adecuada cuando bandas blancas fueron claramente visibles en los geles. En la Figura C13 (Anexo C) se observa la posición del ADN genómico, ARN ribosomal 23S, ARN ribosomal 16S, ARN ribosomal 5S, ARN mensajero y el ARN de transferencia en una muestra de la extracción tomada como ejemplo para identificar dichas posiciones en el resto de las cultivos utilizados.

3.5.2.3. rep-PCR

Las muestras que presentaron suficiente cantidad de ADN genómico, se utilizaron para obtener fingerprintings mediante la técnica molecular de rep-PCR, usando el primer BOX. Aquellas muestras que no dieron positivo para la presencia de ADN no fueron consideradas para el presente estudio. La cantidad de reactivos para realizar PCR se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9. Mezcla típica para 25 µl de reacción de rep-PCR usando el primer BOX.

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

Fuente: Rodríguez, 2004.

Los ingredientes se mezclaron en función del número de muestras, y se realizó una solución master (master mix). Se colocaron alícuotas de 24.5 µl en tubos plásticos para PCR de 200 µl. Posteriormente, se colocó 0.5 µl de ADN genómico en cada tubo para así completar los 25 µl 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 8°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 se congelaron a -20°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). La electroforesis se realizó a 70V 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 millones de megapíxeles, del equipo ULTRACAM. Las fotografías fueron transferidas a un computador en donde fueron editadas y grabadas en formato TIFF.

3.5.3. Determinación de la actividad antimicrobiana

3.5.3.1. Selección y Preparación de los Cultivos de Actinomicetes

Con los resultados obtenidos en la taxonomía numérica se tomaron 96 representantes de los grupos-especie visualizados en los dendrogramas, tal como se detalla en la Tabla A5 (Anexo A). El número de representantes fue proporcional al número total de miembros de cada grupo. Mientras más numeroso, más actinomicetes fueron escogidos para determinar la capacidad de producción de compuestos bioactivos de interés en Biotecnología. Los cultivos de microbios seleccionados fueron crecidos en agar GYM, por 15 días a 28°C, de tal manera que el micelio cubrió por completo la superficie del medio de cultivo.

3.5.3.2. Preparación de los platos con los microorganismos modelo

Inicialmente, cultivos de los hongos fitopatógenos *Botrytis* y *Fusarium*, fueron crecidos en PDA (Anexo D) a 26°C por 7 días, provocando la esporulación completa de los dos primeros. Así mismo, una bacteria gram positiva y otra gram negativa fueron cultivadas en AN (Anexo D) por 4 días a 28°C. Una vez obtenidos los cultivos de cada microorganismo, se prepararon los platos para la determinación del antagonismo siguiendo la técnica detallada por Phillips (1994).

La primera etapa consistió en preparar suspensiones con las esporas o células de los hongos y bacterias. Para ello se raspó la superficie del medio de cultivo, con la ayuda de un asa de transferencia estéril. El material recogido, ya sea esporas o células, fue transferido a un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina estéril. A partir de éste se realizaron diluciones seriadas. Para hongos se usó un hemocitómetro para determinar la concentración de esporas. En el caso de las bacterias, se usó una placa de Petroff-Hausser. Posteriormente, con éstos valores se calculó el volumen de inóculo necesario para obtener concentraciones finales de 1×10^6 células/ml de medio de cultivo para bacterias y 1×10^3 esporas/ml de medio de cultivo para los hongos fitopatógenos. El volumen calculado fue transferido asépticamente a medio de cultivo estéril, enfriado previamente a 50°C. Las botellas fueron agitadas hasta obtener una suspensión

uniforme de esporas o células, y el medio vertido en cajas tetrapetri estériles, cuidando que el espesor del medio sea uniforme en todos los compartimientos.

3.5.3.3. Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica

Utilizando un sacabocados de 6 mm de diámetro, se extrajeron bloques cilíndricos de partes del micelio de cada uno de los representantes de los grupos especie. La profundidad del medio donde se extrajeron los bloques fue la misma en todos los casos. Luego se depositaron los bloques sobre la superficie de los platos de cultivo que contenían a los microorganismos modelo, colocando la parte del crecimiento del actinomicete en contacto con el medio, para así permitir una difusión más rápida de los metabolitos producidos. Además se prepararon platos en los que se colocaron círculos de papel con nistatín (100ug/ml) como control experimental para hongos y rifampicina (50ug/ml) como control para los ensayos de bacterias. Los platos preparados fueron incubados a 26°C por 7 días. Los perfiles de actividad antagónica se determinaron midiendo los diámetros de las zonas de inhibición, en milímetros, de aquellos actinomicetes que mostraron actividad antimicrobiana.

3.6. Plan de procesamiento de la información

3.6.1. Caracterización fenotípica

Con los resultados de las pruebas fenotípicas se construyó una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas. La información fue procesada con el software estadístico NTSys, en el que primeramente se calcularon los porcentajes de similitud entre los actinomicetes estudiados, usando el coeficiente de simple coincidencia (S_{SM}). Finalmente los porcentajes fueron utilizados para construir un dendrograma mediante el uso del algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) del mismo programa. Una vez obtenido éste gráfico, se identificó los grupos especie basados en un coeficiente de similitud del 95%.

3.6.2. Caracterización genotípica

Las fotografías de los geles se estandarizaron y normalizaron mediante la comparación con un patrón de bandas de ADN, el mismo que se indica en la Figura C24 (Anexo C). Con la ayuda del patrón se determinó la presencia (1) o ausencia (0) de las mismas para 28 posiciones diferentes, usando código binario. Con estos datos se construyó una matriz como se muestra en la Tabla A4 (Anexo A), la que fue importada en el programa NTSys, en donde se realizaron los análisis de la misma manera que en taxonomía numérica, en la forma descrita en el párrafo anterior. Una vez obtenido éste gráfico, se identificaron los grupos especie basados en un coeficiente de similitud del 65%.

Una vez obtenidos éstos resultados se estableció el nivel de relación entre los dendrogramas obtenidos para poder relacionarlo con la hipótesis respectiva. Se procedió a identificar el

porcentaje de similitud de los grupos especie obtenidos en cada uno de los análisis, para determinar si los resultados fueron los mismos.

3.6.3. Determinación de la actividad antimicrobiana

Los diámetros de las zonas de inhibición provocados por aquellos actinomicetes que presentaron actividad antagonista se utilizaron para realizar un análisis de varianza (Tabla 10). Se realizó un diseño completo al azar con 4 repeticiones. El único factor en estudio fue la capacidad antagonista de los actinomicetes aislados, determinada para cada uno de los microorganismos modelo usados en la presente investigación. Solamente aquellos actinomicetes que presentaron actividad antimicrobiana fueron considerados en el análisis final, y cada uno fue considerado como un tratamiento. La separación de medias fue realizada al encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, usando la prueba de Tukey al 5% de significancia. Además, a los actinomicetes se los clasificó de acuerdo al tipo de actividad antagonista. Aquellos considerados como bactericidas presentaron inhibición solamente a las bacterias Gram+ y Gram-, pero no a los hongos. Los actinomicetes con actividad antifúngica solamente afectaron a *Botrytis* y *Fusarium*, pero no a las bacterias. Finalmente, los que presentaron amplio espectro inhibieron el crecimiento tanto de bacterias como de hongos.

Tabla 10. Esquema del análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	
Repeticiones	$(r - 1)$	3
Tratamientos	$(t - 1)$	X
Error	$(r - 1) (t - 1)$	3
Total	$(r \times t) - 1$	Z

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

X = Los tratamientos para cada organismo de prueba varían puesto que no todos mostraron antagonismo para todos los microorganismos modelo.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de los Resultados

4.1.1. Caracterización Fenotípica

4.1.1.1. Caracterización macroscópica

En la Tabla A1 (Anexo A) se muestra la caracterización macroscópica de los ciento treinta y tres actinomicetes utilizados en el estudio. Se obtuvieron treinta y siete grupos de distinto color, donde el color white es predominante como color del micelio aéreo y para el micelio del sustrato es el color 367 manilla. Diecisiete grupos estuvieron formados por un solo representante, mientras que los grupos restantes presentaron al menos dos actinomicetes. Solamente nueve grupos no presentaron micelio aéreo (desde el grupo 29 al 37) en sus colonias, es decir, cuarenta y cinco actinomicetes no presentaron esta característica.

4.1.1.2. Caracterización microscópica

La Figura C1 (Anexo C), muestra los resultados de la caracterización microscópica para los ochenta y ocho actinomicetes que presentaron esporulación. Cincuenta y tres actinomicetes presentaron cadenas rectas, dieciocho incompletas, quince espirales y una con la característica de flexous. Para el cultivo N° 448 no se determinó el tipo de cadena debido a que presentó muy poca esporulación.

4.1.1.3. Rango de crecimiento en función de la temperatura

En la Figura C2 (Anexo C) se observa el crecimiento de los actinomicetes a diferentes temperaturas. Todos los cultivos estudiados crecieron a 28°C. Se encontraron diferencias en el crecimiento a 4°C y 37°C, ya que ochenta y siete crecieron a 4°C, mientras que treinta y tres lo hicieron a 37°C. Es importante anotar que ningún cultivo creció a 50°C. Los resultados se muestran en la Tabla A2 (Anexo A), en la matriz de datos fenotípicos.

4.1.1.4. Rango de crecimiento en función del pH

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla A2 (Anexo A), se determinó que treinta y seis actinomicetes son microorganismos neutrotolerantes, sesenta y cuatro acidofílicos y treinta y tres alcalitolerantes como se indica en la Figura C3 (Anexo C).

4.1.1.5. Determinación del uso de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno

En la Figura C4 (Anexo C) se detalla el número de actinomicetes que presentaron crecimiento en los medios que contenían distintas fuentes de carbono y nitrógeno. De esta manera, de los ciento treinta y tres actinomicetes utilizados, ciento veinte y seis actinomicetes crecieron en ácido aspártico (Asp), ciento treinta y un aislamientos en ácido glutámico (Glu), ciento veinte y seis en valina (Val), ciento veinte y seis en treonina (Tre), ciento veinte y siete en arginina (Arg), ciento veinte y cinco en asparagina (Asn), ciento veinte y seis en fenilalanina (Phe), ciento veinte y siete en alanina (Ala), ciento veinte y seis en histidina (His) ciento veinte y cuatro en quitina (Qui), ciento veinte y seis en lisina (Lys), ciento once en cisteína (Cis), ciento veinte y cuatro en leucina (Leu), ciento veinte y tres en glicina (Gly), ciento veinte y cuatro en tirosina (Tyr) y ciento veinte y cuatro en urea. Ninguno de los compuestos estudiados fue utilizado por los ciento y treinta y tres actinomicetes. También se nota que la gran mayoría de actinomicetes emplearon más de doce fuentes de carbono y nitrógeno. Solamente cinco actinomicetes utilizaron menos de tres fuentes para su crecimiento (Figura C5, Anexo C).

4.1.1.6. Taxonomía numérica de datos fenotípicos

El dendrograma basado en la similaridad entre los microorganismos se muestra en la Figura C6 (Anexo C). Se identificaron sesenta y siete grupos especie, basados en un coeficiente de similaridad del 95% como se indica en la Figura C7 (Anexo C). En la Tabla A3 (Anexo A) se muestran los sesenta y siete grupos especie con sus respectivos miembros y la característica de color del micelio aéreo en agar GYM. Cuarenta y dos grupos mostraron un solo representante, mientras que el grupo 25 es considerado el grupo más grande, con once representantes.

4.1.2. Caracterización Genotípica

4.1.2.1. Determinación de cantidad, integridad y pureza del ADN genómico.

Las Figuras C8, C9, C10, C11 y C12 (Anexo C), muestran claramente la presencia de ADN genómico en los ciento treinta y tres actinomicetes estudiados. En algunas muestras se observó la presencia de ARN y contaminación con proteínas y carbohidratos.

4.1.2.2. rep-PCR

En las Figuras C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22 y C23 (Anexo C) se observan los patrones de fingerprinting obtenidos mediante la técnica molecular de rep-PCR, usando el primer BOX. Aquellas muestras en las que se observó un número menor a cuatro bandas no fueron consideradas en el presente estudio ya que no es suficiente información para separar dos individuos cercanamente relacionados. El número de bandas observado en los distintos fingerprintings fue variable, pero ninguna muestra presentó más de quince bandas.

4.1.2.3. Taxonomía numérica de datos genotípicos

En la Figura C25 (Anexo C) se observa el dendrograma obtenido a partir del cálculo de similitud entre los actinomicetes utilizados. Se identificaron treinta y dos grupos especie basados en un coeficiente de similitud del 65% (Figura C26, Anexo C). En la Tabla A5 (Anexo A) se detallan los treinta y dos grupos especie con sus respectivos miembros y la característica de color del micelio aéreo en agar GYM. Se determinó que cuatro grupos cuentan con un solo miembro y los grupos 5, 17 y 20 son considerados como los más grandes al poseer ocho individuos cada uno.

4.1.3. Relación entre datos fenotípicos y genotípicos

La Tabla A6 (Anexo A) muestra la comparación de los diferentes grupos-especie determinados en los dendrogramas obtenidos tanto por taxonomía numérica como por el análisis de los datos genotípicos. En verde se encuentran resaltados aquellos individuos que han sido colocados en los mismos grupos especie en los dos tipos de análisis. Solamente se encontró que existe un 14% de similitud, ya que solamente diecinueve de los ciento treinta y tres actinomicetes fueron recuperados en los mismos grupos.

4.1.4. Determinación de la actividad antimicrobiana

De los noventa y seis representantes, veinte y ocho actinomicetes no presentaron ninguna actividad antagonista en contra de los microorganismos modelo usados en la presente investigación (Tabla A7, Anexo A). De los sesenta y ocho que presentaron actividad (Tabla A8, Anexo A), once actinomicetes tuvieron capacidad solamente bactericida, siete solamente antifúngica y quince mostraron un amplio espectro de acción al inhibir el crecimiento tanto de bacterias como el de hongos. También se encontraron actinomicetes con actividad muy específica, así, cuatro mostraron actividad solamente en contra de bacterias gram positivas, ocho en contra de gram negativas, dos contra *Botrytis* y seis contra *Fusarium* (Figura C27, Anexo C). Los demás presentaron perfiles de inhibición variables.

4.1.4.1. Actividad en contra de la Bacteria Gram positiva (G+)

Cuarenta y cuatro actinomicetes mostraron inhibición frente a la Bacteria Gram positiva (Tabla A9, Anexo A). El análisis de varianza (Tabla B1, Anexo B) mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos. La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 17 niveles como se indica en la Tabla B2 (Anexo B). Los tratamientos 39 (483), 40 (486), 6 (249) y 27 (435) produjeron las zonas de inhibición más grandes con 35.50 mm de diámetro, igualando lo mostrado en el tratamiento 44, que corresponde al control experimental con rifampicina (3.33 mg/ml). El tratamiento 9 (269) presentó la zona más pequeña con 12.50 mm.

4.1.4.2. Actividad en contra de la Bacteria Gram negativa (G-)

Treinta y nueve actinomicetes mostraron actividad en contra de la bacteria Gram negativa (Tabla A10, Anexo A). La Tabla B3 (Anexo B) muestra el análisis de varianza, en el cual se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos. La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 12 niveles como se muestra en la Tabla B4 (Anexo B). El tratamiento 2 (223) produjo la zona de inhibición más grande con 35.50 mm de diámetro igual que el tratamiento 39, que corresponde al control experimental con rifampicina (3.33 mg/ml). Los tratamientos 31 (450) y 7 (266) presentaron las zonas más pequeñas con 12.25 mm.

4.1.4.3. Actividad en contra de *Fusarium*

Cuarenta cultivos de actinomicetes presentaron actividad antagónica frente al hongo fitopatógeno *Fusarium* (Tabla A11, Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos como se indica en la Tabla B5 (Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5% (Tabla B6, Anexo B) dividió a los tratamientos en 10 niveles. El tratamiento 10 (279), produjo la zona de inhibición más grande con 22.75 mm de diámetro. El tratamiento 35 (478) presentó la zona más pequeña con 8.75 mm. Seis actinomicetes produjeron una zona de inhibición más grande que el tratamiento 40 que pertenece al control experimental con nistatín (75 mg/ml).

4.1.4.4. Actividad en contra de *Botrytis*

Treinta y cinco cultivos de actinomicetes presentaron antagonismo frente al hongo fitopatógeno *Botrytis* (Tabla A12, Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla B7, Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 15 niveles como se muestra en la Tabla B8 (Anexo B). El tratamiento 15 (339), produjo la zona de inhibición más grande con 25.00 mm de diámetro. Los tratamientos 34 (355b), 4 (249), y 19 (365) presentaron las zonas más pequeñas con 7.00 mm. Veintiún actinomicetes produjeron una zona de inhibición más grande que el tratamiento 35 que corresponde al control experimental con nistatín (75 mg/ml).

4.2. Interpretación de Datos

4.2.1. Caracterización Fenotípica

La gran mayoría de actinomicetes mostraron pertenecer a grupos que presentaron cadenas de esporas, mientras que aquellos diferentes, o sea, sin esporulación fueron minoría. Reportes realizados por otros investigadores (Lazzarini *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1996; Moncheva *et al.*, 2002), han demostrado que esta tendencia es generalizada, ya que los actinomicetes más comunes y abundantes pertenecen a los géneros *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nonomuraea*, *Microtetraspora*, *Kitasatospora* y *Streptacidiphilus*, los que presentan generalmente un micelio aéreo esporulado. Probablemente, la gran mayoría de actinomicetes estudiados en la presente investigación pertenece a alguno de los géneros mencionados. Sin embargo, hay que resaltar

que aquellos menos comunes son más interesantes porque debido a su número bajo, y a la dificultad para aislarlos, éstos son considerados como raros, con probabilidades altas de encontrar nuevos metabolitos secundarios de interés en biotecnología.

La caracterización del rango de crecimiento relacionado a temperatura mostró datos interesantes, ya que de los actinomicetes estudiados, la gran mayoría presentaron características mesófilas y psicrófilas, al crecer a 28°C y 4°C, respectivamente. En la Tabla A13 (Anexo A), se muestra los datos del aislamiento de cada uno de los cultivos. Es claro notar que la gran mayoría provinieron de suelos y sedimentos de laguna de la región de la Sierra Central del Ecuador, en donde las condiciones climáticas y del suelo se caracterizan por tener temperaturas promedio anuales menores a 15°C. Es posible que los actinomicetes estudiados hayan desarrollado adaptaciones metabólicas y morfológicas para acomodarse a las condiciones frías.

La misma tendencia se observa al analizar los resultados de los rangos de crecimiento en relación al pH. La gran mayoría son actinomicetes acidófilicos ya que su pH máximo no es mayor a 6, con un pH óptimo entre 4 y 5.5. Al observar la Figura C28 (Anexo C) se nota claramente que la gran mayoría fueron aislados en medios de cultivo ácido (pH 5 o 5.5).

La gran mayoría de aminoácidos fueron usados como fuentes de carbono y nitrógeno por parte de casi todos los actinomicetes. No se encontraron diferencias significativas en la utilización de los mismos, la única excepción fue el aminoácido cisteína (Cis), el cual fue utilizado solamente por ciento once de los ciento treinta y tres actinomicetes estudiados.

4.2.1.1. Taxonomía numérica de datos fenotípicos

A pesar que el número de pruebas usadas para el análisis fue relativamente bajo (55), los resultados permitieron formar grupos bien definidos, con similitudes muy altas (95%). Otros estudios han usado números mayores (Mustafa *et al.*, 2004; Vanderzant *et al.*, 1972), pero el corte de similitud escogido para formar grupos fue menor, con porcentajes menores al 90%. Los resultados permitieron encontrar aquellos cultivos que se encontraban repetidos, ya que la similitud refleja características morfológicas y metabólicas comunes entre ellos. Los datos fueron tan robustos que fueron utilizados para escoger los representantes para la determinación de la producción de compuestos bioactivos en la segunda parte de la presente investigación.

4.2.2. Caracterización genotípica

El aislamiento del ADN genómico no presentó mayores problemas. A partir de la biomasa de la gran mayoría de actinomicetes, fue posible obtener una cantidad adecuada de ADN. La contaminación con ARN y proteínas no interfirió en forma significativa en la técnica de PCR para determinar los fingerprintigs usando el primer box, sin embargo, algunos mostraron pocas bandas en los geles de electroforesis, y fueron excluidos del análisis final debido a que la

información taxonómica iba a ser limitada, pudiendo influir negativamente en la obtención del dendrograma final. Solamente aquellos que mostraron más de cuatro bandas fueron incluidos.

4.2.2.1. Taxonomía numérica de datos genotípicos

La matriz de datos se construyó con la comparación de solamente veinte y ocho posiciones diferentes, lo que influyó significativamente en el análisis. El porcentaje de similaridad utilizado para formar los grupos taxonómicos fue mucho más bajo (65%), que el usado en la taxonomía numérica de los datos fenotípicos, provocando que los grupos no estén bien definidos, con un número menor de miembros, y sin mostrar la consistencia de datos fenotípicos. Lamentablemente se observó un número muy bajo de bandas en cada actinomicete, lo que al final influyó en los resultados. Debido a ello, los datos no fueron usados para determinar los actinomicetes representantes en las pruebas de actividad antimicrobiana.

4.2.3. Relación entre datos fenotípicos y genotípicos

No se encontró una relación entre los grupos taxonómicos formados en cada uno de los dendrogramas. Tal como se expuso anteriormente, los resultados obtenidos en la taxonomía numérica de los datos genotípicos, no fueron lo suficientemente robustos ni consistentes como para definir grupos especies con similaridades mayores al 90%, lo que hubiese permitido obtener menos grupos, y con más número de miembros, tal como ocurrió en la taxonomía numérica de datos fenotípicos. Probablemente es necesario incluir más datos de fingerprinting usando otros primers como *rep* y *eric*, los que ya han sido usados anteriormente en conjunto con el primer *box* (Olive & Bean, 1999), para obtener un mayor número de pruebas, lo que podría incrementar los valores de similaridad de corte para decidir los grupos taxonómicos.

4.2.4. Determinación de la actividad antimicrobiana

La diversidad biológica de los actinomicetes estudiados se manifestó también en la diversidad metabólica, al encontrarse una diversidad de patrones de inhibición en contra de los microorganismos modelo. La gran mayoría de actinomicetes presento algún tipo de inhibición, porque del total analizado (96), el 71%, que corresponde a 68 cultivos, produjeron compuestos bioactivos. Esto concuerda con lo reportado por Bull *et al.* (2000), quienes manifiestan que los actinomicetes son una fuente importante de metabolitos secundarios útiles para biotecnología.

Debido a las características fenotípicas, es posible afirmar que algunos de los compuestos producidos probablemente son nuevos, ya que los perfiles metabólicos y morfológicos de taxonomía numérica soportan la idea de que estos pertenecen a los denominados “géneros raros” (Lazzarini *et al.*, 2000; Donadio *et al.*, 2002), los que han sido poco estudiados y que probablemente producen compuestos que hasta ahora no han sido descubiertos.

El análisis individual de la inhibición muestra resultados interesantes, ya que en todos los casos es posible encontrar actinomicetes que produjeron zonas de inhibición iguales e incluso superiores a los controles experimentales con antibióticos.

Si bien es cierto que esta es solo una comparación preliminar, es posible concluir que los antibióticos producidos por los actinomicetes son más eficientes que las concentraciones usadas en los controles, que de por sí son altas. Es necesario realizar más estudios que permitan identificar el tipo de molécula del compuesto bioactivo, así como también si se trata de un nuevo compuesto.

4.2.5. Discusión general del trabajo investigativo

El presente estudio trató de determinar una metodología adecuada de selección de representantes de actinomicetes para la determinación de la producción de compuestos bioactivos. Para ello se analizaron datos fenotípicos y genotípicos mediante taxonomía numérica para ver si existe una correlación entre ellos.

Es conocido que en un programa de búsqueda de antibióticos, en la fase de aislamiento selectivo se obtienen cientos de cultivos puros, muchos de ellos iguales, por lo que se requiere una metodología eficiente para seleccionar aquellos diferentes, y dejar a un lado los repetidos o similares. Ese proceso no es posible realizarlo a simple vista o al azar, es necesario seguir un proceso técnico, con fundamento científico, que permita alcanzar el objetivo planteado.

La comparación de los dendrogramas basados en la taxonomía numérica de datos genotípicos y fenotípicos no encontró una correlación entre los mismos, debido principalmente a que en los primeros se obtuvieron muy pocas bandas en los fingerprintigs, imposibilitando la comparación de un número mayor de posiciones (pruebas) en los análisis de similaridad. Esto provocó que se obtenga menor número de grupos-especie que en la taxonomía numérica de datos fenotípicos, y además, que se tenga que usar un punto de corte muy bajo (65%) para elegir los grupos taxonómicos. Todo lo contrario ocurrió con los datos fenotípicos, ya que el análisis de taxonomía numérica permitió definir los grupos al 95% de similaridad, valor muy alto que permitió obtener grupos grandes y congruentes.

Por ello, estos resultados fueron usados para seleccionar a los cultivos que fueron usados en la fase de determinación de la producción de compuestos bioactivos. Del total inicial (133), solo noventa y seis fueron incluidos en la fase final. Eso significa que casi el 30% de actinomicetes fueron descartados, permitiendo tanto una optimización en el uso de los recursos y materiales, así como también un ahorro económico importante.

En la última etapa del estudio se encontró que los actinomicetes estudiados presentaron una gran capacidad para producir compuestos bioactivos. Lo importante es el potencial uso de los resultados, debido a la naturaleza de los compuestos detectados. Muchos de los actinomicetes presentan actividad específica. Por ejemplo, algunos solamente actúan como bactericidas, lo que

significaría desarrollar un producto farmacéutico de uso humano, porque probablemente el compuesto solo ataca a células procariotas. Por supuesto que el desarrollo de un producto de esa naturaleza llevará años realizarlo, sin embargo, los resultados alcanzados ofrecen un punto de partida sólido para continuar con las futuras investigaciones.

Por otro lado, la actividad antagónica específica en contra de *Botrytis* y *Fusarium*, dos hongos fitopatógenos de gran importancia comercial en agricultura, podría abrir un nuevo campo en la fabricación de bioproductos que sean altamente efectivos en el control de dichos patógenos, sin llegar a afectar a otros hongos importantes de ecosistema del suelo y de la planta, y además, permitirán disminuir la contaminación del ambiente al evitar el uso de pesticidas químicos.

El presente trabajo pretende aportar con resultados concretos en el desarrollo de técnicas útiles en microbiología, así como también en la búsqueda de compuestos bioactivos útiles en biotecnología. Si bien es cierto que este es un estudio básico, sin embargo se han sentado bases científicas sólidas que permitirán que futuros estudios continúen el desarrollo, no solo de uno, sino de varios posibles bioproductos útiles en biotecnología y agricultura.

4.3. Verificación de Hipótesis

4.3.1. Hipótesis para la correlación de datos fenotípicos y genotípicos

4.3.1.1. Hipótesis nula (H_0)

No existen diferencias entre los grupos-especie luego del análisis individual de los datos de la caracterización fenotípica y genotípica de los actinomicetes.

4.3.1.2. Hipótesis alternante (H_1)

Existen diferencias entre los grupos-especie luego del análisis individual de los datos de la caracterización fenotípica y genotípica de los actinomicetes.

Luego de analizar los resultados de correlación entre los datos fenotípicos y genotípicos de los ciento treinta y tres actinomicetes utilizados en el presente estudio, “se acepta la hipótesis alternante (H_1)” afirmando que existen diferencias entre los grupos-especie de actinomicetes luego del análisis individual de los datos.

4.3.2. Hipótesis para la producción de compuestos bioactivos

4.3.2.1. Hipótesis nula (H_0)

Todos los actinomicetes representantes de los grupos-especie producen compuestos bioactivos.

4.3.2.2. Hipótesis alternante (H_1)

Algunos actinomicetes representantes de los grupos-especies producen compuestos bioactivos.

Después de realizar el análisis de antagonismo microbiano, “se acepta la hipótesis alternante (H_1)” afirmando que solo sesenta y ocho actinomicetes representantes de los grupos-especie producen compuestos bioactivos.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- En la taxonomía numérica de datos fenotípicos, los ciento treinta y tres cultivos de actinomicetes estudiados fueron ubicados en sesenta y siete grupos especie. El punto de corte de la similaridad de grupo fue del 95%. Veinte y cinco grupos estuvieron formados por más de un miembro, mientras que el resto presentaron solamente uno. De estos fueron escogidos 96 representantes para la determinación de producción de compuestos bioactivos en contra de los microorganismos modelo.
- Los ciento treinta y tres cultivos de actinomicetes utilizados en la taxonomía numérica de datos genotípicos fueron ubicados en treinta y dos grupos especie. El porcentaje de similaridad de grupos fue del 65%. Veinte y ocho grupos estuvieron formados por más de un miembro, mientras que los cuatro restantes presentaron uno solo.
- La dereplicación de cultivos de actinomicetes usando pruebas fenotípicas es una herramienta útil de selección de representantes para determinar la producción de compuestos bioactivos útiles en biotecnología. Las pruebas deben incluir características macro y microscópicas, rangos de crecimiento en diferentes pHs y temperaturas, y la utilización de diferentes aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno.
- No se encontró una relación directa entre la taxonomía numérica de datos fenotípicos con los genotípicos.
- Sesenta y ocho cultivos de actinomicetes presentaron algún tipo de actividad antimicrobiana en contra de bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, *Fusarium* y *Botrytis*.
- Se encontró actividad antimicrobiana específica, así, once cepas mostraron capacidad solamente bactericida, siete antifúngica y quince mostraron un amplio espectro de acción al inhibir el crecimiento tanto de bacterias como de los hongos estudiados. Además, algunos actinomicetes presentaron actividades muy específicas, ya que cuatro actuaron solamente en contra de bacterias gram positivas, ocho frente a gram negativas, dos contra *Botrytis* y seis frente *Fusarium*.
- Muchos de los antibióticos producidos por los actinomicetes fueron igual o más eficientes que los antibióticos usados como control experimental.

5.2. Recomendaciones

- Realizar dereplicación de cultivos puros de actinomicetes obtenidos en experimentos de aislamiento selectivo para la búsqueda de compuestos bioactivos. De esta manera, se lograría un ahorro en recursos económicos y humanos durante el proceso de búsqueda de metabolitos útiles en biotecnología mediante selección de microorganismos por taxonomía numérica.
- Determinar la estructura química y concentración de los metabolitos secundarios obtenidos a partir del antagonismo microbiano para posteriores aplicaciones biotecnológicas.
- Realizar la caracterización molecular, es decir el secuenciamiento de las distintas cepas utilizadas en el estudio, principalmente de aquellas que produjeron metabolitos secundarios para ubicarlas en grupos ya existentes o para saber si se está tratando con una nueva especie.
- Realizar una fermentación líquida con los actinomicetes productores de metabolitos secundarios para la obtención de un bioproducto. Luego de las pruebas de laboratorio, realizar pruebas de campo para conocer la efectividad de los compuestos bioactivos en condiciones reales para el control de enfermedades principalmente en plantas de interés agrícola.

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos Informativos

6.1.1. Título

Dereplicación de cultivos puros de actinomicetes obtenidos en experimentos de aislamiento selectivo para la búsqueda de compuestos bioactivos.

6.1.2. Instituciones Ejecutoras

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

Universidad Técnica de Ambato (UTA).

6.1.3. Beneficiarios

Investigadores y estudiantes de Universidades y Escuelas Politécnicas del país. Centros de Investigaciones en Biotecnología. Empresas privadas relacionadas a Agrobiotecnología.

6.1.4. Ubicación

ESPOCH. Panamericana Sur Km. 1.5. Riobamba.

UTA. Colombia S/N y Chile. Ciudadela Ingahurco. Ambato.

6.1.5. Tiempo Estimado para la Ejecución

Seis meses.

6.1.6. Equipo Técnico Responsable

Docentes, investigadores y estudiantes trabajando en experimentos de aislamientos selectivo para la búsqueda de microorganismos útiles en biotecnología.

6.2. Antecedentes de la Propuesta

La dereplicación es un proceso que permite identificar microorganismos con características similares desde el punto de vista morfológico, fisiológico o genético. Por otro lado, en experimentos de aislamiento selectivo se obtienen cientos de cultivos, muchos de los cuales son similares. La investigación *“Determinación de la relación entre la caracterización fenotípica y genotípica de actinomicetes como mecanismo de dereplicación de microorganismos útiles en Biotecnología”*, demostró que la realización de pruebas fenotípicas permite identificar cultivos

con características morfológicas y fisiológicas similares, usando taxonomía numérica. De esa manera se asegura la calidad de los microbios que se escogen como representantes, permitiendo un ahorro en recursos materiales y humanos en el proceso de búsqueda de metabolitos útiles para biotecnología. La fase final de la investigación mencionada demostró la producción de compuestos bioactivos (antibióticos), por más del 71% de los actinomicetes, demostrando que el proceso de selección de los representantes no significó una disminución en la detección de la producción de biocompuestos.

6.3. Justificación

El estudio *“Determinación de la relación entre la caracterización fenotípica y genotípica de actinomicetes como mecanismo de dereplicación de microorganismos útiles en Biotecnología”*, demostró que la dereplicación de cultivos similares provenientes de experimentos de aislamiento selectivo de actinomicetes, es posible mediante la taxonomía numérica de datos fenotípicos. La implementación de esta metodología significaría un ahorro considerable de recursos económicos, debido a la disminución en el número de actinomicetes que se usarían en la determinación de la producción de compuestos bioactivos, sin correr el riesgo de realizar un muestreo erróneo, y garantizando tanto la calidad microbiológica de los cultivos como la detección del tipo de biocompuestos producidos.

6.4. Objetivos

6.4.1. Objetivo General

- Dereplicar cultivos de actinomicetes y otro tipo de microbios usando taxonomía numérica de datos fenotípicos.

6.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar las características macroscópicas y microscópicas de los aislamientos.
- Determinar las características fisiológicas relacionadas al crecimiento en diferentes condiciones.
- Identificar los aislamientos similares mediante la taxonomía numérica de los datos fenotípicos obtenidos.

6.5. Análisis de Factibilidad

La viabilidad de la *“Dereplicación de cultivos puros de actinomicetes obtenidos en experimentos de aislamiento selectivo para la búsqueda de compuestos bioactivos”* se asegura con los resultados obtenidos en la investigación *“Determinación de la relación entre la caracterización fenotípica y genotípica de actinomicetes como mecanismo de dereplicación de microorganismos*

útiles en Biotecnología”. Además, el cumplimiento adecuado de los objetivos específicos planteados en ésta propuesta garantizarán el cumplimiento del objetivo general.

Por otro lado, los siguientes resultados de la investigación en la que se basa la propuesta, permiten que los resultados de la presente propuesta sean alcanzados sin ningún inconveniente.

- La selección de los grupos taxonómicos en los datos fenotípicos fue realizado con un porcentaje de similaridad de más del 95%, valor que es elevado y que asegura que todos los individuos dentro del grupo posean las características morfológicas y fisiológicas prácticamente similares.
- La parte de la fundamentación legal, que regula el acceso y uso responsable de la biodiversidad con fines de bioprospección.

6.6. Fundamentación

La investigación “*Determinación de la relación entre la caracterización fenotípica y genotípica de actinomicetes como mecanismo de dereplicación de microorganismos útiles en Biotecnología*”, es la base científica que permite la formulación de la presente propuesta.

6.7. Metodología – Modelo Operativo

6.7.1. Caracterización Fenotípica

6.7.1.1. Caracterización macroscópica

Los colores del micelio del sustrato y esporas serán determinados usando una tabla estándar de colores (British Standard Specification for colours for identification coding and special purposes), en cultivos que hayan crecido en agar extracto de levadura extracto de malta (GYM). Además se reportará la presencia o ausencia de micelio aéreo en las colonias. La producción de pigmentos difusibles se determinará creciendo los cultivos en agar avena (AA) y GYM. En todos los casos, los platos serán incubados a 28°C por siete días.

6.7.1.2. Caracterización microscópica

La determinación de la morfología del micelio aéreo será determinada solamente en aquellos cultivos que presenten crecimiento de ésta estructura en sus colonias. Para ello se usarán cubreobjetos estériles. Con la ayuda de una pinza, serán colocados sobre el micelio aéreo de las colonias. De ésta manera, parte del micelio se pegará sobre la superficie del cubreobjetos. Éste último será colocado sobre un portaobjetos limpio. Finalmente, con la ayuda de un microscopio se determinará el tipo de estructura.

6.7.1.3. Rango de Crecimiento en Función de la Temperatura

Se inocularán 5 µl de las suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar GYM. Las cajas se incubarán a 50°C, 37°C y 4°C durante 2, 4 y 30 días, respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes y se evaluará mediante código binario. Si el actinomicete presenta crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

6.7.1.4. Rango de Crecimiento en Función del pH

Se inocularán 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar GYM ajustado a los siguientes pHs: 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, y 9.5. Las cajas se incubarán a 26°C durante 10 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes y se evaluará mediante código binario. Si el actinomicete presenta crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

6.7.1.5. Aminoácidos como Fuentes de Carbono y Nitrógeno

Para probar la capacidad de utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, se utilizarán distintos aminoácidos. Para la preparación del medio de cultivo se utilizará un medio basal. Sobre la superficie del medio se inocularán 5 µl de la suspensión de esporas. Las cajas se incubarán a 28°C durante 48 horas. Se evaluará tomando en cuenta la presencia o ausencia de crecimiento. Si el actinomicete presenta crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

6.7.1.6. Análisis de Datos Fenotípicos

Con los resultados de las pruebas fenotípicas se construirá una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas. Posteriormente la información será procesada en el software estadístico NTSys, en el que primeramente se calcularán los porcentajes de similitud entre los actinomicetes estudiados. Finalmente, con la ayuda del mismo programa se procederá a obtener un dendrograma basado en la similitud entre los microorganismos. Una vez obtenido éste gráfico, se procederá a identificar los grupos especie basados en un coeficiente de similitud mayor al 95%.

6.8. Administración

INDICADORES A MEJORAR	SITUACIÓN ACTUAL	RESULTADOS ESPERADOS	ACTIVIDADES	RESPONSABLES
<p>Proceso de Dereplicación a partir de aislamientos selectivos.</p>	<p>Búsqueda de compuestos bioactivos a partir de actinomicetes similares.</p>	<p>Dereplicación de cultivos similares provenientes de experimentos de aislamiento selectivo de actinomicetes que permitan discriminar grupos-especie.</p>	<p>Caracterización macroscópica de los aislamientos.</p>	<p>Docente</p>
<p>Búsqueda de nuevos compuestos bioactivos a partir de actinomicetes seleccionados por taxonomía numérica.</p>		<p>Ahorro de tiempo y recursos económicos al realizar taxonomía numérica previo al antagonismo microbiano.</p>	<p>Caracterización microscópica de los aislamientos que presentan esporulación.</p>	
		<p>Identificación de compuestos bioactivos a partir de actinomicetes seleccionados por taxonomía numérica.</p>	<p>Crecimiento de los cultivos en distintas temperaturas, pHs y distintas fuentes de carbono y nitrógeno.</p>	<p>Estudiante</p>
			<p>Análisis de datos fenotípicos.</p>	

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010

6.9. Previsión de la Evaluación

PREGUNTAS BÁSICAS	EXPLICACIÓN
¿Quiénes solicitan evaluar?	Docentes Investigador
¿Por qué evaluar?	Proporciona información del proceso de dereplicación como mecanismo de selección de actinomicetes para la búsqueda de compuestos bioactivos.
¿Para qué evaluar?	Para identificar los grupos-especie basados en la similitud que permitan seleccionar actinomicetes que producen metabolitos secundarios.
¿Qué evaluar?	Datos obtenidos a partir de taxonomía numérica.
¿Quién evalúa?	Docente
¿Cuándo evaluar?	Al finalizar las pruebas de taxonomía numérica.
¿Cómo evaluar?	Revisando los datos obtenidos previo a la realización de una matriz en código binario.
¿Con qué evaluar?	Programa NTSys.

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010

BIBLIOGRAFÍA

- BARON, S., 1996**, *Medical Microbiology*. Fourth Edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas.
- BULL, A.; WARD, A. & GOODFELLOW, M., 2000**, Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64(3)**:573-606.
- CHRISTOVA, K.; SHOLEVA, Z. & CHIPEVA, V., 1995**, Application of Molecular Biological Methods in Taxonomy of Genus *Streptomyces*. *Journal of Culture Collections*. **1**:3-10.
- DEMAIN, A., 1998**, Induction of Microbial Secondary Metabolism. *International Microbiology*, **1**:259-264.
- DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; ALDUINA, R.; MAZZA, P.; CHIOCCHINI, C.; CAVALETTI, L.; SOSIO, M. & PUGLIA, A., 2002**, Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, **99**:187-198.
- GOODFELLOW, M., 1988**, Numerical Taxonomy and Selective Isolation of Industrially Important *Actinomycetes*. *Actinomycetologia*, **2(1)**:13-29.
- HAKVÁG, S.; FJAERVIK, E.; JOSEFSEN, K.; IAN, E.; ELLINGSEN, T & ZOTCHEV, S., 2008**, Characterization of *Streptomyces* spp. Isolated from the Sea Surface Microlayer in the Trondheim Fjord, Norway. *Marine Drugs*, **6**:620-635.
- LAZZARINI, A.; CAVALETTI, L.; TOPPO, G. & MARINELLI, F., 2000**, Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**:399-405.
- LEVEAU, J & BOUIX, M., 2000**, *Microbiología Industrial, Los microorganismos de interés industrial*. Primera Edición. Editorial Acribia, España. 437-442.
- LO, C., LAI, N., CHEAH, H., WONG, N. & HO, C., 2002**, *Actinomycetes* isolated from soil samples from the Crocker range Sabah. *Review of Biodiversity and Environmental Conservation*, **2**:1-3.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J. & PARKER, J., 2004**, *Biología de los Microorganismos*. Décima Edición. Pearson Prentice Hall, España. 56-81.
- MAGARVEY, N.; KELLER, J.; BERNAN, V.; DWORKIN, M. & SHERMAN, D., 2004**, Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived *Actinomycete* Taxa Rich in Bioactive Metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, **70(12)**:7520-7529.
- MITRA, S., 2003**, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Jhon Wiley & Sons Publication, United States of America. 56-81.

- MONCHEVA, P.; TISHKOV, S.; DIMITROVA, N.; CHIPEVA, V.; ANTONOVA-NIKOLOVA, S. & BOGATZEVSKA, N., 2000-2002**, Characteristics of Soil *Actinomycetes* from Antarctica. *Journal of Culture Collections*, **3**:3-14.
- MOURA, J.; BOSCO, J. & CUNHA, L., 1999**, Comparison of Similarity Coefficients Based on RAPD Markers in the Common Bean. *Genetics and Molecular Biology*, **22**(3):427-432.
- MUSTAFA, O.; TAMER, A. & AZERI, C., 2004**, Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, **3**(9):441-446.
- NEWTON, R.; JONES, S.; HELMUS, M. & MCMAHON, K., 2007**, Phylogenetic Ecology of the Freshwater *Actinobacteria* acl Lineage. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(22):7169-7176.
- OLIVE, M. & BEAN, P., 1999**, Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**(6):1661-1669.
- PETKOVIC, H.; CULLUM, J.; HRANUELI, D.; HUNTER, I.; PERIC-CONCHA, N.; PIGAC, J.; THAMCHAIPENET, A.; VUJAKLIJA, D. & LONG, P., 2006**, Genetics of *Streptomyces rimosus*, the Oxytetracycline Producer. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **70**(3):704-728.
- PHILIPS, L., 1994**, *Manual de Actinomycetes*. 150.
- RODRÍGUEZ, C., 2004**, Molecular and Phenotypic Characterization of Members of the Family *Streptomycetaceae*. Ph. D. Thesis, University of Newcastle.
- SCOTT, T.; ROSE, J.; JENKINS, T.; FARRAH, S. & LUKASIK, J., 2002**, Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(12):5796-5803.
- STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. & WARD-RAINEY, N., 1997**, Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**(2):479-491.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K. & SWINGS, J., 1996**, Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological Reviews*, **60**(2):407-438.
- VANDERZANT, C.; JUDKINS, P.; NICKELSON, R. & FITZHUGH, H., 1972**, Numerical Taxonomy of *Coryneform* Bacteria Isolated from Pond-Reared Shrimp (*Penaeus aztecus*) and Pond Water. *Applied Microbiology*, **23**(1):38-45.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G.; CHATER, K. & VAN SINDEREN, D., 2007, Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **71(3)**:495-548.

WEBSTER, J. & WEBER, R., 2007, *Introduction to fungi*. Third Edition. Cambridge University Press, United States of America. 1-6.

XU, L; LI, Q. & JIANG, C., 1996, Diversity of Soil Actinomycetes in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, **62(1)**:244-248.

YIM, G.; HUIMI WANG, H. & DAVIES, J., 2007, Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **362**:1195-1200.

ANEXO A

DATOS EXPERIMENTALES

Tabla A1. Caracterización Macroscópica.

Grupo de color	Color Micelio Aéreo	Color Micelio del Sustrato	ID actinomicete
1	white	320 (410) light brown	274, 269
2	white	352 pale cream	328
3	white	353 deep cream	339, 337
4	white	358 light buff	443, 310
5	white	361 light stone	440, 348
6	white	367 manilla	487, 462, 442, 441, 439, 418, 407, 396, 323, 301, 241
7	white	369 biscuit	486, 478, 463, 438, 437, 436, 435, 335, 255, 249, 246, 223, 215, 210
8	white	388 beige	500, 489, 477, 394, 302, 297
9	white	389 camouflage beige	482, 288, 272, 271, 234, 233, 225
10	white	414 golden brown	333, 324, 270, 247, 222
11	white	447 salmon pink	448
12	694 dove grey	367 manilla	365
13	630 french grey	388 beige	383
14	627 light aircraft grey	358 light buff	279
15	627 light aircraft grey	367 manilla	444
16	627 light aircraft grey	388 beige	449, 434, 432, 322
17	626 camouflage grey	358 light buff	332
18	626 camouflage grey	499 service brown	330
19	384 light straw	320 (410) light brown	343
20	384 light straw	361 light stone	400, 352

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A1. Continuación...

Grupo de color	Color Micelio Aéreo	Color Micelio del Sustrato	ID actinomicete
21	384 light straw	389 camouflage beige	389
22	384 light straw	414 golden brown	479, 398
23	365 vellum	358 light buff	228, 216
24	365 vellum	361 light stone	355b, 355a, 470, 378, 374, 361, 354, 342, 341, 340, 314, 286
25	365 vellum	388 beige	454
26	365 vellum	411 middle brown	336
27	210 sky	320 (410) light brown	399
28	210 sky	411 middle brown	452, 227
29	-	355 lemon	366
30	-	358 light buff	431, 424
31	-	361 light stone	430
32	-	367 manilla	498, 494, 483, 469, 468, 456, 451, 450, 446, 429, 416, 412, 406, 349, 325, 266
33	-	369 biscuit	490, 465, 414, 408
34	-	388 beige	495, 480, 464, 405, 351, 262
35	-	389 camouflage beige	499, 460, 457, 417, 415, 413, 411, 287, 273, 263, 242, 224, 221
36	-	414 golden brown	459
37	-	447 salmon pink	497

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A2. Matriz de Datos Fenotípicos.

CODIGO	37 °C	4°C	Qui	Lys	Cis	Leu	Gly	Tyr	Urea	Asp	Glu	Val	Tre	Arg	Asn	Phe
210	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
215	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
216	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
221	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
222	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
223	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
224	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
225	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
227	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
228	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
233	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
234	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
241	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
242	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
246	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
247	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
249	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
255	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
262	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
263	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
266	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
269	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
271	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
272	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
273	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
274	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
279	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
286	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
287	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
288	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
297	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
301	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
302	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
310	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
314	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
322	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
323	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
324	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
325	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
328	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
330	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
332	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
333	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
335	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
336	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
337	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
339	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
340	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
341	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
342	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
343	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
348	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
348	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
349	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
351	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
352	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
354	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
355 a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
355 b	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
361	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
365	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
366	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
374	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
378	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
383	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
389	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
394	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A2. Continuación...

CODIGO	37 °C	4°C	Qui	Lys	Cis	Leu	Gly	Tyr	Urea	Asp	Glu	Val	Tre	Arg	Asn	Phe
396	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
398	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
399	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
399	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
405	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	1	1
406	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
407	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
408	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
411	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
412	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
413	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
414	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
415	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
416	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
417	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
418	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
424	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
429	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
430	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
431	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
432	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
434	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
435	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
436	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
437	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
438	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
439	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
440	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
441	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
442	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
443	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
444	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
446	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
448	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
449	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
450	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
451	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
452	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
452	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
454	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
456	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
457	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
459	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
460	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
462	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
462	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
463	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
464	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
465	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
468	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
469	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
470	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
477	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
478	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
479	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
480	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
482	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
482	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
483	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
486	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
487	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
489	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
490	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
494	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
495	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
497	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
498	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
499	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A2. Continuación...

CODIGO	Ala	His	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	Crecimiento	M. aéreo	Pigmento	M. aéreo	C. espiral	C. recta	C. incomp	C. flexus
									Avena			GYM				
210	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
215	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
216	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
221	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
222	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
223	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
224	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
225	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
228	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
233	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
234	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
241	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
242	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
246	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
247	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
249	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
255	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
262	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
263	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
266	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
269	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
270	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
270	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
271	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
272	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
273	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
274	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
279	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
286	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
287	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
288	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
297	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
301	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
302	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
310	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
314	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
322	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
323	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
324	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
325	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
328	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
330	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
332	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
333	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
335	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
336	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
337	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
339	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0
340	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
341	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
342	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
343	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
348	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
348	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
349	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
351	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
352	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
354	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
355 a	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
355 b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
361	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
365	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
366	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
374	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
378	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
383	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
389	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
394	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A2. Continuación...

CODIGO	Ala	His	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	Crecimiento Avena	M. aéreo	Pigmento	M. aéreo GYM	C. espiral	C. recta	C. incomp	C. flexus
396	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
398	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
399	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
399	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
400	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
405	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
406	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
407	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
408	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
411	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
412	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
413	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
414	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
415	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
416	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
417	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
418	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
424	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
429	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
430	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
431	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
432	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
434	1	1	ND	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
435	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
436	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
437	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
438	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
439	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
440	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
441	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0
442	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
443	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
444	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
446	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
448	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
449	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
450	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
451	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
452	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
452	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
454	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
456	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
457	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
459	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
460	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
462	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
462	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
463	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
464	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
465	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
468	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
469	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
470	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
477	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
478	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
479	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
480	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
482	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
482	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
483	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
486	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
487	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
489	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
490	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
494	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
495	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
497	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
498	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
499	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
500	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A2. Continuación...

CODIGO	COLORACIÓN DEL MICELIO AÉREO AGAR GYM							
	210	365	384 light	626 camouflage	627 light	630 french	694 dove	white
	sky	vellum	straw	grey	aircraft grey	grey	grey	
210	0	0	0	0	0	0	0	1
215	0	0	0	0	0	0	0	1
216	0	1	0	0	0	0	0	0
221	0	0	0	0	0	0	0	0
222	0	0	0	0	0	0	0	1
223	0	0	0	0	0	0	0	1
224	0	0	0	0	0	0	0	0
225	0	0	0	0	0	0	0	1
227	1	0	0	0	0	0	0	0
228	0	1	0	0	0	0	0	0
233	0	0	0	0	0	0	0	1
234	0	0	0	0	0	0	0	1
241	0	0	0	0	0	0	0	1
242	0	0	0	0	0	0	0	0
246	0	0	0	0	0	0	0	1
247	0	0	0	0	0	0	0	1
249	0	0	0	0	0	0	0	1
255	0	0	0	0	0	0	0	1
262	0	0	0	0	0	0	0	0
263	0	0	0	0	0	0	0	0
266	0	0	0	0	0	0	0	0
269	0	0	0	0	0	0	0	1
270	0	0	0	0	0	0	0	1
270	0	0	0	0	0	0	0	1
271	0	0	0	0	0	0	0	1
272	0	0	0	0	0	0	0	1
273	0	0	0	0	0	0	0	0
274	0	0	0	0	0	0	0	1
279	0	0	0	0	1	0	0	0
286	0	1	0	0	0	0	0	0
287	0	0	0	0	0	0	0	0
288	0	0	0	0	0	0	0	1
297	0	0	0	0	0	0	0	1
301	0	0	0	0	0	0	0	1
302	0	0	0	0	0	0	0	1
310	0	0	0	0	0	0	0	1
314	0	1	0	0	0	0	0	0
322	0	0	0	0	1	0	0	0
323	0	0	0	0	0	0	0	1
324	0	0	0	0	0	0	0	1
325	0	0	0	0	0	0	0	0
328	0	0	0	0	0	0	0	1
330	0	0	0	1	0	0	0	0
332	0	0	0	1	0	0	0	0
333	0	0	0	0	0	0	0	1
335	0	0	0	0	0	0	0	1
336	0	1	0	0	0	0	0	0
337	0	0	0	0	0	0	0	1
339	0	0	0	0	0	0	0	1
340	0	1	0	0	0	0	0	0
341	0	1	0	0	0	0	0	0
342	0	1	0	0	0	0	0	0
343	0	0	1	0	0	0	0	0
348	0	0	0	0	0	0	0	1
348	0	0	0	0	0	0	0	1
349	0	0	0	0	0	0	0	0
351	0	0	0	0	0	0	0	0
352	0	0	1	0	0	0	0	0
354	0	1	0	0	0	0	0	0
355 a	0	1	0	0	0	0	0	0
355 b	0	1	0	0	0	0	0	0
361	0	1	0	0	0	0	0	0
365	0	0	0	0	0	0	1	0
366	0	0	0	0	0	0	0	0
374	0	1	0	0	0	0	0	0
378	0	1	0	0	0	0	0	0
383	0	0	0	0	0	1	0	0
389	0	0	1	0	0	0	0	0
394	0	0	0	0	0	0	0	1

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A2. Continuación...

CODIGO	COLORACIÓN DEL MICELIO AÉREO AGAR GYM							
	210 sky	365 vellum	384 light straw	626 camouflage grey	627 light aircraft grey	630 french grey	694 dove grey	white
396	0	0	0	0	0	0	0	1
398	0	0	1	0	0	0	0	0
399	1	0	0	0	0	0	0	0
399	1	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	1	0	0	0	0	0
405	0	0	0	0	0	0	0	0
406	0	0	0	0	0	0	0	0
407	0	0	0	0	0	0	0	1
408	0	0	0	0	0	0	0	0
411	0	0	0	0	0	0	0	0
412	0	0	0	0	0	0	0	0
413	0	0	0	0	0	0	0	0
414	0	0	0	0	0	0	0	0
415	0	0	0	0	0	0	0	0
416	0	0	0	0	0	0	0	0
417	0	0	0	0	0	0	0	0
418	0	0	0	0	0	0	0	1
424	0	0	0	0	0	0	0	0
429	0	0	0	0	0	0	0	0
430	0	0	0	0	0	0	0	0
431	0	0	0	0	0	0	0	0
432	0	0	0	0	1	0	0	0
434	0	0	0	0	1	0	0	0
435	0	0	0	0	0	0	0	1
436	0	0	0	0	0	0	0	1
437	0	0	0	0	0	0	0	1
438	0	0	0	0	0	0	0	1
439	0	0	0	0	0	0	0	1
440	0	0	0	0	0	0	0	1
441	0	0	0	0	0	0	0	1
442	0	0	0	0	0	0	0	1
443	0	0	0	0	0	0	0	1
444	0	0	0	0	1	0	0	0
446	0	0	0	0	0	0	0	0
448	0	0	0	0	0	0	0	1
449	0	0	0	0	1	0	0	0
450	0	0	0	0	0	0	0	0
451	0	0	0	0	0	0	0	0
452	1	0	0	0	0	0	0	0
452	1	0	0	0	0	0	0	0
454	0	1	0	0	0	0	0	0
456	0	0	0	0	0	0	0	0
457	0	0	0	0	0	0	0	0
459	0	0	0	0	0	0	0	0
460	0	0	0	0	0	0	0	0
462	0	0	0	0	0	0	0	1
462	0	0	0	0	0	0	0	1
463	0	0	0	0	0	0	0	1
464	0	0	0	0	0	0	0	0
465	0	0	0	0	0	0	0	0
468	0	0	0	0	0	0	0	0
469	0	0	0	0	0	0	0	0
470	0	1	0	0	0	0	0	0
477	0	0	0	0	0	0	0	1
478	0	0	0	0	0	0	0	1
479	0	0	1	0	0	0	0	0
480	0	0	0	0	0	0	0	0
482	0	0	0	0	0	0	0	1
482	0	0	0	0	0	0	0	1
483	0	0	0	0	0	0	0	0
486	0	0	0	0	0	0	0	1
487	0	0	0	0	0	0	0	1
489	0	0	0	0	0	0	0	1
490	0	0	0	0	0	0	0	0
494	0	0	0	0	0	0	0	0
495	0	0	0	0	0	0	0	0
497	0	0	0	0	0	0	0	0
498	0	0	0	0	0	0	0	0
499	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	1

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A2. Continuación...

CODIGO	COLOR MICELIO AÉREO AGAR AVENA							
	210	352 pale	365 vellum	367 manilla	369 biscuit	384 light	389 camouflage	626 camouflage
	sky	cream				straw	grey	grey
210	0	0	0	0	0	0	0	0
215	0	0	0	0	0	0	0	0
216	0	0	0	0	0	0	0	0
221	0	0	0	0	0	0	0	0
222	0	0	0	0	0	0	0	0
223	0	0	0	0	0	0	0	0
224	0	0	0	0	0	0	0	0
225	0	0	0	0	0	0	0	0
227	0	0	1	0	0	0	0	0
228	0	0	0	0	0	0	0	0
233	0	0	0	0	0	0	0	0
234	0	0	0	1	0	0	0	0
241	0	0	1	0	0	0	0	0
242	0	0	0	0	0	0	0	0
246	0	0	0	0	0	0	0	0
247	0	0	0	1	0	0	0	0
249	0	0	0	0	0	0	0	0
255	0	0	0	0	0	0	0	0
262	0	0	0	0	0	0	0	0
263	1	0	0	0	0	0	0	0
266	0	0	0	0	0	0	0	0
269	0	0	0	0	0	0	0	0
270	0	0	0	0	0	0	0	0
270	0	0	0	0	0	0	0	0
271	0	0	0	0	0	0	0	0
272	0	0	0	0	0	0	0	0
273	0	0	0	0	0	0	0	1
274	0	0	0	0	1	0	0	0
279	0	0	0	0	0	0	0	0
286	0	0	1	0	0	0	0	0
287	0	0	0	0	0	0	0	0
288	0	0	0	0	0	0	0	0
297	1	0	0	0	0	0	0	0
301	0	0	0	0	0	0	0	0
302	0	0	0	1	0	0	0	0
310	0	0	0	0	0	0	0	0
314	0	0	1	0	0	0	0	0
322	0	0	0	0	0	0	0	0
323	0	0	0	0	0	0	0	0
324	0	0	0	0	0	0	1	0
325	0	0	0	0	0	0	0	0
328	0	0	0	0	0	0	0	0
330	0	0	0	0	0	0	0	0
332	0	0	0	0	0	0	0	0
333	0	0	0	0	1	0	0	0
335	0	0	0	1	0	0	0	0
336	0	0	0	0	0	0	0	0
337	0	0	0	0	0	0	0	0
339	0	0	0	0	0	0	0	0
340	0	0	1	0	0	0	0	0
341	0	0	0	1	0	0	0	0
342	0	0	0	0	0	0	0	0
343	0	0	0	0	0	0	0	0
348	0	0	0	0	0	0	0	0
348	0	0	0	0	0	0	0	0
349	0	0	0	0	0	0	0	0
351	0	0	0	0	0	0	0	0
352	0	0	1	0	0	0	0	0
354	0	0	0	0	0	0	0	0
355 a	0	0	1	0	0	0	0	0
355 b	0	0	1	0	0	0	0	0
361	0	0	0	0	0	0	0	0
365	0	0	0	0	0	0	0	0
366	0	0	0	0	0	0	0	0
374	0	0	0	0	0	0	0	0
378	0	0	1	0	0	0	0	0
383	0	0	0	0	0	0	0	0
389	0	0	0	0	0	0	0	0
394	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A2. Continuación...

CODIGO	COLOR MICELIO AÉREO AGAR AVENA							
	210 sky	352 pale cream	365 vellum	367 manilla	369 biscuit	384 light straw	389 camouflage grey	626 camouflage grey
396	0	0	0	0	0	0	0	0
398	0	0	0	0	0	0	0	0
399	0	0	0	0	0	0	0	0
399	0	0	0	0	0	0	0	0
400	1	0	0	0	0	0	0	0
405	0	0	0	0	0	0	0	0
406	0	0	0	0	0	0	0	0
407	0	0	0	0	0	0	0	0
408	0	0	0	0	0	0	0	0
411	0	0	0	0	0	0	0	0
412	0	0	0	0	0	0	0	0
413	0	0	0	0	0	0	0	0
414	0	0	0	0	0	0	0	0
415	0	0	0	0	0	0	0	0
416	0	0	0	0	0	0	0	0
417	0	0	0	0	0	0	0	0
418	0	0	0	0	0	0	0	0
424	0	0	0	0	0	0	0	0
429	0	0	0	0	0	0	0	0
430	0	1	0	0	0	0	0	0
431	0	0	0	0	0	0	0	0
432	0	0	0	0	0	0	0	0
434	0	0	0	0	0	0	0	0
435	0	0	0	0	0	0	0	0
436	1	0	0	0	0	0	0	0
437	0	0	0	1	0	0	0	0
438	0	0	0	1	0	0	0	0
439	0	0	0	0	0	0	0	0
440	0	0	0	0	0	0	0	0
441	0	0	0	0	1	0	0	0
442	0	0	0	0	1	0	0	0
443	0	0	0	0	1	0	0	0
444	0	0	0	0	0	0	0	0
446	0	0	0	0	0	0	0	0
448	0	0	0	0	0	0	0	0
449	0	0	0	0	0	0	0	0
450	0	0	0	0	0	0	0	0
451	0	0	0	0	0	0	0	0
452	0	0	0	0	0	0	0	0
452	0	0	0	0	0	0	0	0
454	0	0	0	0	0	0	0	0
456	0	0	1	0	0	0	0	0
457	0	0	0	0	0	0	0	0
459	0	0	0	0	0	0	0	1
460	0	0	0	0	0	0	0	0
462	0	0	0	0	0	0	0	0
462	0	0	0	0	0	0	0	0
463	0	0	0	0	0	0	0	0
464	0	0	0	0	0	0	0	0
465	0	0	0	0	0	0	0	0
468	0	0	0	0	0	0	0	0
469	0	0	0	0	0	0	0	0
470	0	0	0	0	0	0	0	0
477	0	0	0	0	0	0	0	0
478	0	0	0	0	0	1	0	0
479	0	0	0	0	0	0	1	0
480	0	0	0	0	0	0	0	0
482	0	0	0	0	0	0	0	0
482	0	0	0	0	0	0	0	0
483	0	0	0	0	0	0	0	0
486	1	0	0	0	0	0	0	0
487	1	0	0	0	0	0	0	0
489	0	0	0	0	0	0	0	0
490	0	0	0	0	0	0	0	0
494	0	0	0	0	0	0	0	0
495	0	0	0	0	0	0	0	0
497	0	0	0	0	0	0	0	0
498	0	0	0	0	0	0	0	0
499	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A2. Continuación...

CODIGO	COLOR MICELIO AÉREO AGAR AVENA						
	627 light	630 french	631 light	638 dark	676 light	694 dove	white
	aircraft grey	grey	grey	sea grey	weatherwork grey	grey	
210	0	0	0	0	0	0	0
215	0	0	0	0	0	0	0
216	0	0	0	0	0	0	0
221	0	0	0	0	0	0	1
222	0	0	0	0	0	0	1
223	0	0	0	0	0	0	0
224	0	0	0	0	0	0	1
225	0	0	0	0	0	0	0
227	0	0	0	0	0	0	0
228	0	0	0	0	0	0	0
233	1	0	0	0	0	0	0
234	0	0	0	0	0	0	0
241	0	0	0	0	0	0	0
242	1	0	0	0	0	0	0
246	0	0	0	0	0	0	0
247	0	0	0	0	0	0	0
249	0	0	0	0	0	0	0
255	0	0	0	0	0	0	0
262	0	0	0	0	0	1	0
263	0	0	0	0	0	0	0
266	1	0	0	0	0	0	0
269	0	0	0	0	0	0	1
270	1	0	0	0	0	0	0
270	1	0	0	0	0	0	0
271	1	0	0	0	0	0	0
272	0	0	1	0	0	0	0
273	0	0	0	0	0	0	0
274	0	0	0	0	0	0	0
279	1	0	0	0	0	0	0
286	0	0	0	0	0	0	0
287	0	0	0	0	0	0	1
288	0	1	0	0	0	0	0
297	0	0	0	0	0	0	0
301	0	0	0	0	0	0	0
302	0	0	0	0	0	0	0
310	0	0	0	0	0	1	0
314	0	0	0	0	0	0	0
322	0	0	0	0	0	0	1
323	1	0	0	0	0	0	0
324	0	0	0	0	0	0	0
325	0	0	0	0	0	0	0
328	0	0	0	0	0	0	0
330	0	0	0	0	0	0	1
332	1	0	0	0	0	0	0
333	0	0	0	0	0	0	0
335	0	0	0	0	0	0	0
336	0	0	0	0	0	0	0
337	0	0	0	0	0	0	0
339	1	0	0	0	0	0	0
340	0	0	0	0	0	0	0
341	0	0	0	0	0	0	0
342	1	0	0	0	0	0	0
343	0	0	0	0	0	0	1
348	0	0	0	0	0	0	1
348	0	0	0	0	0	0	1
349	0	0	0	0	0	0	1
351	0	0	0	0	0	0	0
352	0	0	0	0	0	0	0
354	0	0	0	0	0	0	1
355 a	0	0	0	0	0	0	0
355 b	0	0	0	0	0	0	0
361	0	0	0	0	0	0	1
365	0	1	0	0	0	0	0
366	0	0	0	0	0	0	0
374	0	0	0	0	0	0	1
378	0	0	0	0	0	0	0
383	1	0	0	0	0	0	0
389	0	1	0	0	0	0	0
394	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A2. Continuación...

CODIGO	COLOR MICELIO AÉREO AGAR AVENA						
	627 light aircraft grey	630 french grey	631 light grey	638 dark sea grey	676 light weatherwork grey	694 dove grey	white
396	0	0	0	0	0	0	0
398	0	0	0	0	0	0	1
399	0	0	0	0	0	0	0
399	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0
405	0	0	0	0	0	0	0
406	0	0	0	0	0	0	0
407	0	0	0	0	0	0	0
408	0	0	0	0	0	0	0
411	0	0	0	0	0	0	0
412	0	0	0	0	0	0	0
413	0	0	0	0	0	0	0
414	0	0	0	0	1	0	0
415	0	0	0	0	0	0	0
416	0	0	0	0	0	0	1
417	0	0	0	0	0	0	0
418	0	0	0	0	0	0	0
424	0	0	0	0	0	1	0
429	0	0	0	0	0	0	0
430	0	0	0	0	0	0	0
431	0	0	0	0	0	1	0
432	0	0	0	0	0	0	0
434	0	0	0	0	0	0	0
435	0	0	0	0	0	0	1
436	0	0	0	0	0	0	0
437	0	0	0	0	0	0	0
438	0	0	0	0	0	0	0
439	0	0	0	0	0	0	0
440	0	0	0	0	0	0	0
441	0	0	0	0	0	0	0
442	0	0	0	0	0	0	0
443	0	0	0	0	0	0	0
444	0	0	0	0	0	0	0
446	0	0	0	0	0	0	1
448	0	0	0	0	0	0	1
449	0	0	0	0	0	0	0
450	0	0	0	0	0	0	1
451	0	0	0	0	0	0	0
452	0	0	0	0	0	0	1
452	0	0	0	0	0	0	1
454	0	0	0	0	0	0	0
456	0	0	0	0	0	0	0
457	0	0	0	0	0	0	0
459	0	0	0	0	0	0	0
460	0	0	0	0	0	0	0
462	0	0	0	0	0	0	1
462	0	0	0	0	0	0	1
463	0	0	0	0	0	0	0
464	0	0	0	0	0	0	1
465	0	0	0	1	0	0	0
468	0	0	0	0	0	0	0
469	1	0	0	0	0	0	0
470	0	0	0	0	0	0	1
477	0	0	0	0	0	0	1
478	0	0	0	0	0	0	0
479	0	0	0	0	0	0	0
480	0	0	0	0	0	0	0
482	0	0	0	0	0	0	0
482	0	0	0	0	0	0	0
483	0	0	0	0	0	0	1
486	0	0	0	0	0	0	0
487	0	0	0	0	0	0	0
489	0	0	0	0	0	0	1
490	1	0	0	0	0	0	0
494	0	0	0	0	0	0	0
495	0	0	0	0	0	0	0
497	0	0	0	0	0	0	0
498	0	0	0	0	0	0	0
499	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A3. Grupos especie obtenidos a partir de los datos fenotípicos.

Grupo de color	Subgrupo	Color Micelio Aéreo	ID actinomicete
1	-	white	210, 222, 247, 324
2	-	white	215, 223, 255, 246, 241, 297, 337, 482
3	-	627 light aircraft grey	432, 444, 434
4	-	365 vellum	228, 454, 341, 342, 314, 355a, 361
	5.1	365 vellum	374
	5.2	627 light aircraft grey	322
5	5.3	384 light straw	343, 398
	5.4	210 sky	452
6	-	626 camouflage grey	330
7	-	630 french grey	383
8	-	694 dove grey	365
9	-	384 light straw	400
10	-	-	479
11	-	365 vellum	216, 336, 286, 340, 355b, 378, 354, 470
12	-	210 sky	227, 399
13	-	384 light straw	389
14	-	white	249, 348, 477
15	-	white	442
16	-	-	221
17	-	-	430
18	-	-	242
19	-	-	490

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A3. Continuación...

Grupo de color	Subgrupo	Color Micelio Aéreo	ID actinomicete
20	-	-	456
21	-	-	263, 469
22	-	-	266
23	-	-	287, 446, 450
24	-	-	349
25	-	-	325, 415, 413, 408, 451, 468, 497, 351, 457, 499, 417
26	-	-	366, 429, 412, 494, 495
27	-	-	498
28	-	-	406
29	-	-	411, 464
30	-	-	273, 459
31	-	-	424, 431
32	-	-	405, 460, 480
33	-	-	414, 465
34	-	-	416, 483
35	-	white	225, 301, 328
36	-	white	418, 500, 439, 440
37	-	white	233
38	-	white	234
39	-	white	335
40	-	white	270
41	-	white	271, 339

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A3. Continuación...

Grupo de color	Subgrupo	Color Micelio Aéreo	ID actinomicete
42	-	626 camouflage grey	332
43	-	white	310
44	-	white	269, 288
45	-	white	272
46	-	white	323
47	-	white	407
48	-	white	274, 333
49	-	white	489
50	-	white	302
51	-	white	478
52	-	white	436
53	-	white	486, 487
54	-	white	435
55	-	white	462
56	-	627 light aircraft grey	279
57	-	627 light aircraft grey	449
58	-	384 light straw	352
59	-	white	394
60	-	-	224
61	-	-	262
62	-	white	396
63	-	white	437, 438

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A3. Continuación...

Grupo de color	Subgrupo	Color Micelio Aéreo	ID actinomicete
64	-	white	443
65	-	white	448
66	-	white	441
67	-	white	463

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A4. Matriz de Datos Genotípicos.

CODIGO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
210	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
215	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0
216	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
221	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
222	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
223	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
224	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
225	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
227	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
228	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
234	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
241	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
242	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
246	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
247	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
249	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
255	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
262	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
263	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
266	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
269	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
270	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
270	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
271	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
272	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
273	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1
274	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
279	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
286	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
287	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
288	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
297	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
301	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0
302	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
310	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
314	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
322	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0
323	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
324	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
328	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
332	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
333	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0
335	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
336	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
337	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
339	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
340	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
341	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
342	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
343	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
348	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
348	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
349	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1
351	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
352	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
354	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
355a	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1
355b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
361	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1
365	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
366	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
374	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
378	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
383	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
389	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A4. Continuación

CODIGO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
396	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
398	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
399	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
399	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
400	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
405	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
406	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
407	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
408	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
411	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
412	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
413	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
414	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
415	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
416	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
417	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
418	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
424	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
429	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
430	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
431	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
432	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
434	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
435	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
436	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
437	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
438	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
439	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
441	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
442	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
443	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
444	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
446	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1
448	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
449	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
451	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
452	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
452	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
454	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0
456	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
457	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
459	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1
460	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
462	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
462	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
463	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
464	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
465	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
468	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
469	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
470	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
477	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
478	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
479	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
480	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
482	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
482	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
483	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
486	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
487	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
489	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
494	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
495	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
497	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
498	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
499	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A4. Continuación

CODIGO	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
215	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
216	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1
221	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
222	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
223	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
224	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
225	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
227	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
228	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
234	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
241	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
242	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
246	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
247	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
249	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
255	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
262	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
263	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
266	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
269	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
270	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
270	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
271	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
272	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
273	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
274	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
279	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
286	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
287	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
288	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
297	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
301	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
302	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
310	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
314	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
322	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
323	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
324	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
325	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
328	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
330	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
332	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
333	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
335	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
336	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
337	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
339	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
340	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
341	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1
342	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
343	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
348	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
348	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
349	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
351	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
352	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1
354	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
355a	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
355b	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
361	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
365	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
366	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
374	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
378	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
383	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
389	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
394	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A4. Continuación

CODIGO	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
396	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
398	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
399	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
399	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
400	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
405	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
406	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
407	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
408	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
411	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
412	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
413	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0
414	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
415	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
416	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
417	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
418	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
424	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
429	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
430	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
431	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
432	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
434	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
435	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
436	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
437	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
438	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0
439	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
440	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
441	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
442	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
443	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
444	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
446	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
448	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
449	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
450	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
451	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
452	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
452	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
454	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
456	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
457	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
459	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
460	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
462	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
462	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
463	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
464	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
465	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
466	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
469	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
470	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
477	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
478	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
479	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
482	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
482	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
483	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
486	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
487	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
489	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
490	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
494	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
495	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
497	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
498	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
499	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
500	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A5. Grupos especie obtenidos a partir de los datos genotípicos.

Grupo de color	Subgrupo	Color Micelio Aéreo	ID actinomicete
1	1.1	white	210, 223, 246, 215, 255
	1.2	627 light aircraft grey	279, 434
2	2.1	white	271
	2.2	627 light aircraft grey	432
3	3.1	white	270, 448, 272, 500
	3.2	365 vellum	454
4	4.1	210 sky	227
	4.2	365 vellum	470
	4.3	-	415, 460, 406
	4.4	white	249, 396
5	5.1	-	273, 287, 468
	5.2	627 light aircraft grey	444, 322
	5.3	white	274, 407, 310
6	-	white	339, 418
7	-	-	480
8	8.1	white	225
	8.2	-	366, 490
9	9.1	365 vellum	228
	9.2	-	405, 263, 416
	9.3	white	323, 394
10	10.1	white	222, 324, 486
	10.2	-	465, 498
11	11.1	white	247
	11.2	-	483, 417, 431

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A5. Continuación...

Grupo de color	Subgrupo	Color Micelio Aéreo	ID actinomicete
	12.1	694 dove grey	365
12	12.2	-	451, 424
	12.3	white	435, 443
13	-	white	233
	14.1	-	224, 266
14	14.2	white	441
	14.3	626 camouflage grey	330
	15.1	white	463, 489
15	15.2	-	497
	16.1	white	234, 482
16	16.2	365 vellum	314, 355b, 374
	17.1	white	337, 328
17	17.2	-	351, 413, 429, 430, 414, 325
	18.1	384 light straw	343
18	18.2	white	437, 440
	18.3	-	456
	19.1	630 french grey	383
	19.2	white	436
19	19.3	384 light straw	398
	19.4	210 sky	399
	19.5	-	450, 457
	20.1	white	241
	20.2	365 vellum	286
20	20.3	384 light straw	389
	20.4	365 vellum	354, 378, 361, 342
	20.5	627 light aircraft grey	449

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A5. Continuación...

Grupo de color	Subgrupo	Color Micelio Aéreo	ID actinomicete
21	-	-	446
22	22.1	365 vellum	340, 355a
	22.2	white	348
23	23.1	-	221, 479
	23.2	white	487
24	24.1	210 sky	452
	24.2	white	478
25	25.1	-	242, 495
	25.2	white	288
26	26.1	-	262, 459
	26.2	white	269, 439, 477, 462
	26.3	365 vellum	336
	27.1	white	335, 442
27	27.2	-	412, 494
	27.3	384 light straw	352
28	28.1	-	349, 464, 469
	28.2	white	438
29	-	white	297
30	30.1	626 camouflage grey	332
	30.2	white	333
	30.3	384 light straw	400
31	31.1	white	301, 302
	31.2	-	499, 408
32	32.1	365 vellum	216, 341
	32.2	-	411

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A6. Relación entre datos Fenotípicos y Genotípicos.

ID actinomicete	Grupo Taxonomía	Grupo ADN
210	1	1
222	1	10
324	1	10
247	1	11
255	2	1
246	2	1
215	2	1
223	2	1
482	2	16
337	2	17
241	2	20
297	2	29
434	3	1
432	3	2
444	3	5
454	4	3
228	4	9
314	4	16
361	4	20
342	4	20
355 ^a	4	22
341	4	32

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A6. Continuación...

ID actinomicete	Grupo Taxonomía	Grupo ADN
322	5	5
374	5	16
343	5	18
398	5	19
452	5	24
330	6	14
383	7	19
365	8	12
400	9	30
479	10	23
470	11	4
355b	11	16
378	11	20
354	11	20
286	11	20
340	11	22
336	11	26
216	11	32
227	12	4
399	12	19
389	13	20
249	14	4

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A6. Continuación...

ID actinomicete	Grupo Taxonomía	Grupo ADN
348	14	22
477	14	26
442	15	27
221	16	23
430	17	17
242	18	25
490	19	8
456	20	18
263	21	9
469	21	28
266	22	14
287	23	5
450	23	19
446	23	21
349	24	28
415	25	4
468	25	5
417	25	11
451	25	12
497	25	15
325	25	17
351	25	17
413	25	17

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A6. Continuación...

ID actinomicete	Grupo Taxonomía	Grupo ADN
457	25	28
408	25	31
499	25	31
366	26	8
429	26	17
495	26	25
494	26	27
412	26	27
498	27	10
406	28	4
464	29	28
411	29	32
273	30	5
459	30	26
431	31	11
424	31	12
460	32	4
480	32	7
405	32	9
465	33	10
414	33	17
416	34	9
483	34	11

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A6. Continuación...

ID actinomicete	Grupo Taxonomía	Grupo ADN
225	35	8
328	35	17
301	35	31
500	36	3
418	36	6
440	36	18
439	36	26
233	37	13
234	38	16
335	39	27
270	40	3
271	41	2
339	41	6
332	42	30
310	43	5
288	44	25
269	44	26
272	45	3
323	46	9
407	47	5
274	48	5
333	48	30
489	49	15

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A6. Continuación...

ID actinomicete	Grupo Taxonomía	Grupo ADN
302	50	31
478	51	24
436	52	19
486	53	10
487	53	23
435	54	12
462	55	26
279	56	1
449	57	20
352	58	27
394	59	9
224	60	14
262	61	26
396	62	4
437	63	18
438	63	28
443	64	12
448	65	3
441	66	14
463	67	15

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A7. Actinomicetes que no presentaron actividad antimicrobiana.

ID actinomicete	ID actinomicete
216	418
228	424
242	430
247	437
262	441
272	443
273	448
330	459
335	462
349	463
366	465
396	469
400	490
406	498

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A8. Actinomicetes que presentaron actividad antimicrobiana.

ID actinomicete	G+	G-	<i>Fusarium</i>	<i>Botrytis</i>
210	+	+	+	+
221	-	+	-	-
222	+	-	-	+
223	+	+	+	+
225	-	-	+	-
227	+	+	+	-
233	+	-	+	-
234	-	-	+	-
241	+	+	+	+
249	+	+	+	+
263	+	+	+	-
266	+	+	-	-
269	+	+	+	+
270	-	-	-	+
274	-	+	-	-
279	-	-	+	+
287	-	-	+	-
288	-	+	-	-
301	-	-	-	+
310	-	-	+	+
314	+	+	+	+
322	+	-	-	-
324	-	-	+	+

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A8. Continuación...

ID actinomicete	G+	G-	<i>Fusarium</i>	<i>Botrytis</i>
325	+	+	+	+
332	+	+	-	-
333	-	-	+	+
337	+	+	+	+
339	-	+	+	+
341	+	+	-	-
342	+	+	+	+
343	+	+	+	+
348	+	+	-	-
352	+	+	+	+
365	-	+	+	+
374	+	+	+	+
383	-	+	+	+
389	+	+	+	+
394	+	+	+	+
399	+	-	-	-
405	-	-	+	+
408	-	-	+	-
414	+	-	-	-
416	+	+	-	-
431	+	-	-	-
435	+	+	-	-
436	+	+	-	-

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A8. Continuación...

ID actinomicete	G+	G-	<i>Fusarium</i>	<i>Botrytis</i>
438	-	-	+	-
440	+	-	-	-
442	-	+	-	-
444	-	+	+	+
449	-	-	+	+
450	+	+	-	-
452	+	-	-	-
456	+	+	-	-
457	+	-	+	+
460	+	-	+	+
464	-	-	+	+
470	+	-	-	+
478	+	+	+	-
479	+	+	-	-
482	+	-	+	+
483	+	-	-	-
486	+	+	-	-
487	+	+	-	+
489	-	-	+	-
495	-	+	+	-
497	+	-	-	-
355b	+	+	+	+

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A9. Diámetros de inhibición en mm frente a la Bacteria gram positiva (G+).

ID actinomicete	R1	R2	R3	R4
210	30	30	33	34
222	25	25	34	31
223	36	35	34	35
227	20	19	19	20
233	17	17	18	19
241	20	22	25	27
249	35	35	35	37
263	30	30	33	32
266	24	23	22	22
269	16	15	9	10
314	32	25	29	27
322	25	25	20	26
325	25	25	23	25
332	22	19	21	22
337	20	26	32	30
341	31	30	30	28
342	30	19	29	18
343	30	25	27	22
348	25	23	28	23
352	23	25	27	28
374	25	18	23	28
389	15	14	15	14
394	17	16	16	17

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A9. Continuación...

ID actinomicete	R1	R2	R3	R4
399	26	26	23	26
414	23	23	22	22
416	20	20	22	22
431	18	22	20	25
435	35	36	35	36
436	30	30	32	30
440	23	22	18	19
449	17	20	14	18
450	25	27	28	26
452	32	32	29	30
456	25	24	25	25
457	16	16	15	18
470	18	19	21	19
478	27	26	27	27
479	26	28	30	32
482	15	13	20	18
483	35	36	35	36
486	35	36	35	36
487	32	30	30	31
497	20	21	16	20
355b	20	22	20	18
Control	35	36	35	36

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A10. Diámetros de inhibición en mm frente a la Bacteria gram negativa (G-).

ID actinomicete	R1	R2	R3	R4
210	34	35	33	35
221	18	19	18	19
223	35	36	36	35
227	14	18	19	15
241	17	13	21	19
249	30	30	29	28
263	17	18	18	20
266	12	13	11	13
269	15	15	14	17
274	14	12	12	13
288	13	12	13	12
314	13	12	16	15
325	15	17	18	22
332	19	19	20	20
337	20	21	23	20
339	17	22	20	19
341	16	15	17	18
342	13	14	16	16
343	14	14	15	14
348	17	16	21	20
352	18	17	18	19
365	20	20	18	17
374	14	15	18	15

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A10. Continuación...

ID actinomicete	R1	R2	R3	R4
383	16	16	16	15
389	14	12	16	15
394	18	18	19	18
416	20	19	21	22
435	24	23	23	23
436	29	28	24	25
442	28	30	29	30
444	13	14	18	17
450	11	13	12	13
456	21	20	20	22
478	16	16	15	16
479	20	25	24	22
486	28	30	29	30
487	25	23	23	24
495	16	20	16	20
355b	18	17	20	19
Control 1	36	35	36	35

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A11. Diámetros de inhibición en mm frente a *Fusarium*.

ID actinomicete	R1	R2	R3	R4
210	17	18	20	18
223	15	13	17	19
225	19	19	20	21
227	14	13	14	14
233	11	13	12	13
234	15	13	15	17
241	12	10	15	14
249	15	14	15	14
263	20	18	17	15
269	13	11	12	10
279	20	22	24	25
287	13	15	10	16
310	18	17	19	20
314	11	11	14	15
324	20	20	25	24
325	20	21	20	20
333	12	11	12	13
337	16	15	17	16
339	16	15	15	16
342	15	15	15	16
343	11	12	15	14

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A11. Continuación...

ID actinomicete	R1	R2	R3	R4
352	12	13	16	14
365	14	15	13	15
374	13	11	14	13
383	9	11	12	13
389	13	14	14	15
394	16	13	11	16
405	12	12	12	14
408	20	20	22	20
438	11	12	12	11
444	17	15	15	18
449	25	25	15	14
457	12	12	11	13
460	15	15	16	17
464	17	15	18	20
478	8	9	9	9
482	15	14	18	17
489	16	17	16	16
495	10	9	12	14
355b	15	13	18	17
Control 1	20	19	20	19

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A12. Diámetros de inhibición en mm frente a *Botrytis*.

ID actinomicete	R1	R2	R3	R4
210	13	14	10	12
222	14	12	15	13
223	10	11	12	11
241	11	10	10	8
249	8	7	6	7
269	21	20	21	20
270	12	11	12	12
279	17	16	12	13
301	24	23	21	20
310	20	18	17	19
314	10	9	10	11
324	15	15	12	14
325	23	20	17	18
333	16	12	16	13
337	17	16	15	16
339	23	25	27	25
342	12	10	10	9
343	15	18	16	19

Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Tabla A12. Continuación...

ID actinomicete	R1	R2	R3	R4
352	12	14	15	12
365	8	7	6	7
374	9	10	11	10
383	14	8	7	12
389	9	10	8	9
394	10	10	10	10
405	25	25	25	24
436	12	14	14	15
444	8	9	7	9
449	20	20	19	23
457	20	19	15	18
460	20	25	23	24
464	20	25	20	21
470	11	12	12	10
482	20	18	16	18
487	9	10	11	10
355b	8	7	6	7
Control 1	11	12	11	12

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A13. Datos originales del aislamiento selectivo y procedencia de los actinomicetes.

ID actinomicete	Muestra	Lugar de Recolección	pH	Medio
210	Suelo	Pastaza	8.0	Agar Almidón Caseína
215	Suelo	Pastaza	6.0	Agar Almidón Caseína
216	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	8.0	Agar Almidón Caseína
221	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar Czapeck
222	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar GYM
223	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar GYM
224	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar GYM
225	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar GYM
227	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar GYM
228	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar GYM
233	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar Almidón Caseína
234	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar Almidón Caseína
241	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar Almidón Caseína
242	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar Almidón Caseína
246	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar Bennett
247	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.0	Agar Bennett
249	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	5.0	Agar Almidón Caseína
255	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	5.0	Agar Almidón Caseína
262	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	5.0	Agar Almidón Caseína
263	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	5.0	Agar Almidón Caseína

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A13. Continuación...

ID actinomicete	Muestra	Lugar de Recolección	pH	Medio
266	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	5.0	Agar Almidón Caseína
269	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	5.0	Agar Almidón Caseína
270	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	5.0	Agar Almidón Caseína
271	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	5.0	Agar Almidón Caseína
272	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	5.0	Agar Almidón Caseína
273	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	5.0	Agar Almidón Caseína
274	Sedimentos	Laguna de Colta	5.0	Agar GYM
279	Sedimentos	Laguna de Colta	5.0	Agar GYM
286	Sedimentos	Laguna de Colta	5.0	Agar Bennett
287	Sedimentos	Laguna de Colta	5.0	Agar Bennett
288	Sedimentos	Laguna de Colta	5.0	Agar GYM
297	Sedimentos	Laguna de Colta	5.0	Agar Almidón Caseína
301	Sedimentos	Laguna de Colta	5.0	Agar Almidón Caseína
302	Sedimentos	Laguna de Colta	5.0	Agar Almidón Caseína
310	Sedimentos	Laguna de Colta	5.0	Agar Bennett
314	Suelo	San Francisco - Guayllabamba	5.0	Agar Czapeck
322	Rizósfera de Leguminosa	Ambato	5.0	Agar GYM
323	Sedimentos	Laguna de Colta	7.5	Agar Almidón Caseína

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A13. Continuación...

ID actinomicete	Muestra	Lugar de Recolección	pH	Medio
324	Raíz de Alcachofa	ND	ND	Agar Avena
325	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar Czapeck
328	Rizoplano	San Francisco - Guayllabamba	5.5	Agar GYM
330	Sedimentos	Laguna de Colta	7.5	Agar GYM
332	Suelo	EsPOCH – Riobamba	5.5	Agar Almidón Caseína
333	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar Czapeck
335	Suelo	Páramo Bajo - Urbina	ND	ND
336	Suelo	Páramo Bajo - Urbina	7.5	ND
337	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar Almidón Caseína
339	Suelo	Hcda. La Rioja	7.5	Agar Almidón Caseína
340	Suelo	Páramo Bajo - Urbina	ND	ND
341	Suelo	Páramo Bajo - Urbina	ND	ND
342	Suelo	Páramo Bajo - Urbina	ND	ND
343	Suelo	Páramo Bajo - Urbina	ND	ND
348	Suelo	Páramo Bajo - Urbina	ND	ND
349	Suelo	Páramo Bajo - Urbina	ND	ND
351	Suelo	Páramo Bajo - Urbina	ND	ND
352	Suelo	Páramo Bajo - Urbina	ND	ND
354	Sedimentos	Lago San Pablo	5.5	Agar GYM
355a	Sedimentos	Lago San Pablo	7.0	Agar GYM

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A13. Continuación...

ID actinomicete	Muestra	Lugar de Recolección	pH	Medio
355b	Sedimentos	Lago San Pablo	7.0	Agar GYM
361	Sedimentos	Laguna de Cuicocha	7.0	Agar GYM
365	Sedimentos	Lago San Pablo	7.0	Agar GYM
366	Sedimentos	Lago San Pablo	5.5	Agar GYM
374	Sedimentos	Laguna de Cuicocha	7	Agar Bennett
378	Sedimentos	Lago San Pablo	5.5	Agar Almidón Caseína
383	Sedimentos	Lago San Pablo	7	Agar Bennett
389	Sedimentos	Lago San Pablo	7	Agar Bennett
394	Sedimentos	Lago San Pablo	7	Agar GYM
396	Sedimentos	Laguna de Cuicocha	5.5	Agar GYM
398	Sedimentos	Lago San Pablo	5.5	Agar Bennett
399	Sedimentos	Lago San Pablo	5.5	Agar Bennett
400	Sedimentos	Lago San Pablo	7	Agar Bennett
405	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
406	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar Ácido Húmico
407	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar Ácido Húmico
408	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar Almidón Caseína
411	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
412	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
413	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar Ácido Húmico
414	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar Ácido Húmico
415	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar Ácido Húmico

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A13. Continuación...

ID actinomicete	Muestra	Lugar de Recolección	pH	Medio
416	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar Ácido Húmico
417	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
418	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
424	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
429	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
430	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
431	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
432	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
434	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
435	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
436	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
437	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
438	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
439	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
440	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
441	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
442	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
443	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
444	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
446	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
448	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A13. Continuación...

ID actinomicete	Muestra	Lugar de Recolección	pH	Medio
449	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
450	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
451	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
452	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar Almidón Caseína
454	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar Almidón Caseína
456	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
457	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
459	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
460	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
462	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
463	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
464	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
465	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar Ácido Húmico
468	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
469	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar Ácido Húmico
470	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar Ácido Húmico
477	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar Almidón Caseína
478	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
479	Sedimentos	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
480	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	7.0	Agar Almidón Caseína
482	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla A13. Continuación...

ID actinomicete	Muestra	Lugar de Recolección	pH	Medio
483	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
486	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
487	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM
489	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	7.0	Agar Ácido Húmico
490	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	7.0	Agar Ácido Húmico
494	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
495	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	5.5	Agar GYM
497	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	7.0	Agar Ácido Húmico
498	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	7.0	Agar Ácido Húmico
499	Suelo de Ladera	Laguna de Colta	7.0	Agar Nutritivo
500	Sedimentos	Laguna de Colta	7.0	Agar GYM

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

ANEXO B
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tabla B1. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram +.

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	44	6849.08	155.661	28,98	0,0000
Error	135	725.25	5.372		
Total	179	7574.33			

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla B2. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram +.

Tratamiento	ID actino	Diámetro (mm)	Rango
39	483	35.50	a
40	486	35.50	a
44	Control	35.50	a
6	249	35.50	a
27	435	35.50	a
2	223	35.00	ab
0	210	31.75	abc
7	263	31.25	abcd
32	452	30.75	abcde
41	487	30.75	abcde
28	436	30.50	abcdef
15	341	29.75	abcdefg
37	479	29.00	abcdefgh
1	222	28.75	bcdefgh
10	314	28.25	cdefgh
14	337	27.00	cdefghi
36	478	26.75	cdefghi
31	450	26.50	cdefghij
17	343	26.00	cdefghijk

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla B2. Continuación...

Tratamiento	ID actino	Diámetro (mm)	Rango
19	352	25.75	cdefghijkl
23	399	25.25	cdefghijkl
33	456	24.75	defghijkl
18	348	24.75	defghijkl
12	325	24.50	efghijkl
16	342	24.00	fghijklm
11	322	24.00	fghijklm
20	374	23.50	ghijklmn
5	241	23.50	ghijklmn
8	266	22.75	hijklmno
24	414	22.50	hijklmno
26	431	21.25	ijklmno
25	416	21.00	ijklmnop
13	332	21.00	ijklmnop
29	440	20.50	ijklmnop
43	355b	20.00	jklmnop
3	227	19.50	klmnop
42	497	19.25	lmnop
35	470	19.25	lmnop
4	233	17.75	mnopq
30	449	17.25	nopq
38	482	16.50	opq
22	394	16.50	opq
34	457	16.25	opq
21	389	14.50	pq
9	269	12.50	q

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla B3. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram -

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	39	6118.97	156.897	67.24	0.0000
Error	120	280.00	2.333		
Total	159	6398.97			

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla B4. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram -

Tratamiento	ID actino	Diámetro (mm)	Rango
39	Control	35.50	a
2	223	35.50	a
0	210	34.25	a
35	486	29.25	b
5	249	29.25	b
29	442	29.25	b
28	436	26.50	bc
36	487	23.75	cd
27	435	23.25	cd
34	479	22.75	cde
14	337	21.0	def
32	456	20.75	defg
26	416	20.50	defg
15	339	19.5	defgh
13	332	19.5	defgh
21	365	18.75	efghi
38	355b	18.50	efghij
19	348	18.50	efghij
1	221	18.50	efghij

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla B4. Continuación...

Tratamiento	ID actino	Diámetro (mm)	Rango
25	394	18.25	fghijk
6	263	18.25	fghijk
37	495	18.00	fghijk
20	352	18.00	fghijk
12	325	18.00	fghijk
4	241	17.50	fghijk
16	341	16.50	ghijkl
3	227	16.50	ghijkl
33	478	15.75	hijkl
23	383	15.75	hijkl
22	374	15.50	hijkl
30	444	15.50	hijkl
8	269	15.25	hijkl
17	342	14.75	ijkl
24	389	14.25	jkl
18	343	14.25	jkl
11	314	14.00	kl
9	274	12.75	l
10	288	12.50	l
7	266	12.25	l
31	450	12.25	l

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla B5. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium*.

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	40	1705.90	42.6476	13.36	0.0000
Error	123	392.75	3.1930		
Total	163	2098.65			

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla B6. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium*

Tratamiento	ID actino	Diámetro (mm)	Rango
10	279	22.75	a
14	324	22.25	ab
28	408	20.50	abc
15	325	20.25	abcd
31	449	19.75	abcde
2	225	19.75	abcde
40	Control	19.50	abcdef
12	310	18.50	abcdefg
0	210	18.25	abcdefg
34	464	17.50	bcdefgh
8	263	17.50	bcdefgh
37	489	16.25	cdefghi
30	444	16.25	cdefghi
17	337	16.00	cdefghi
1	223	16.00	cdefghi
36	482	16.00	cdefghi
33	460	15.75	cdefghi
39	355b	15.75	cdefghi
18	339	15.50	cdefghi

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla B6. Continuación...

Tratamiento	ID actino	Diámetro (mm)	Rango
19	342	15.25	defghi
5	234	15.00	efghi
7	249	14.50	fghi
22	365	14.25	ghi
25	389	14.00	ghi
26	394	14.00	ghi
3	227	13.75	ghij
21	352	13.75	ghij
11	287	13.50	ghij
20	343	13.00	hij
23	374	12.75	hij
6	241	12.75	hij
13	314	12.75	hij
27	405	15.50	hij
4	233	12.25	ij
32	457	12.00	ij
16	333	12.00	ij
9	269	11.50	ij
29	438	11.50	ij
24	383	11.25	ij
38	495	11.25	ij
35	478	8.75	j

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla B7. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis*

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	35	3850.19	110.005	48.25	0.0000
Error	108	246.25	2.2800		
Total	143	4096.44			

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla B8. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis*

Tratamiento	ID actino	Diámetro (mm)	Rango
15	339	25.00	a
24	405	24.75	a
29	460	23.00	ab
8	301	22.00	abc
30	464	21.50	abc
5	269	20.50	bcd
27	449	20.50	bcd
12	325	19.50	bcde
9	310	18.50	cdef
32	482	18.00	cdefg
28	457	18.00	cdefg
17	343	17.00	defgh
14	337	16.00	efghi
7	279	14.50	fghij
13	333	14.25	ghijk
11	324	14.00	ghijkl
25	436	13.75	hijklm
1	222	13.50	hijklm
18	352	13.25	hijklm

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Tabla B8. Continuación...

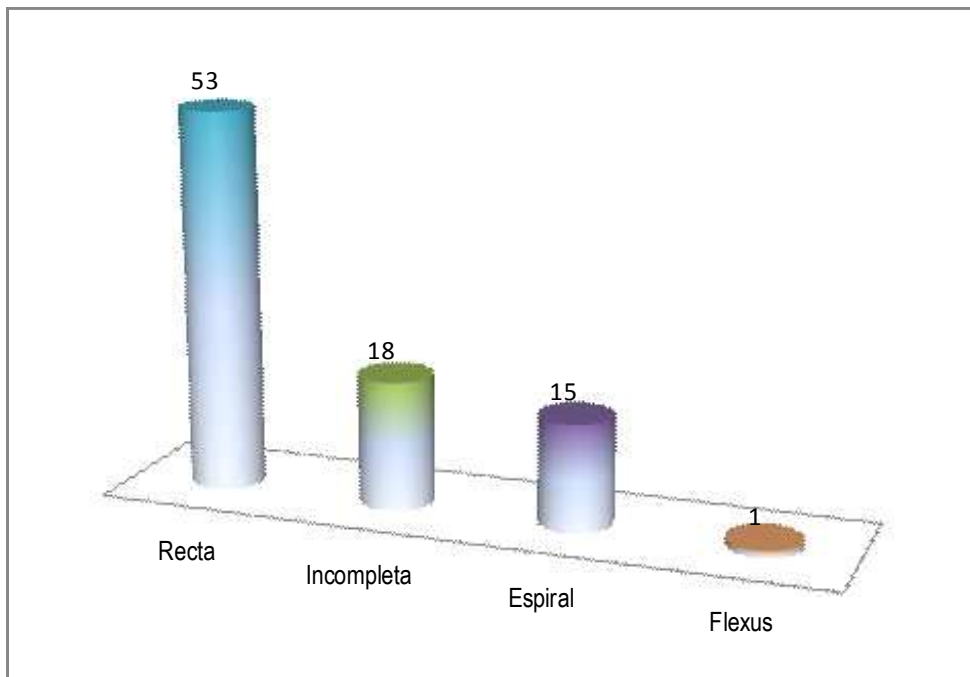
Tratamiento	ID actino	Diámetro (mm)	Rango
0	210	12.25	ijklmn
6	270	11.75	ijklmn
35	Control	11.50	ijklmn
31	470	11.25	ijklmn
2	223	11.00	ijklmno
16	342	10.25	klmno
21	383	10.25	klmno
33	487	10.00	lmno
23	394	10.00	lmno
20	374	10.00	lmno
10	314	10.00	lmno
3	241	9.75	mno
22	389	9.00	no
26	444	8.25	no
34	355b	7.00	o
4	249	7.00	o
19	365	7.00	o

Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

ANEXO C

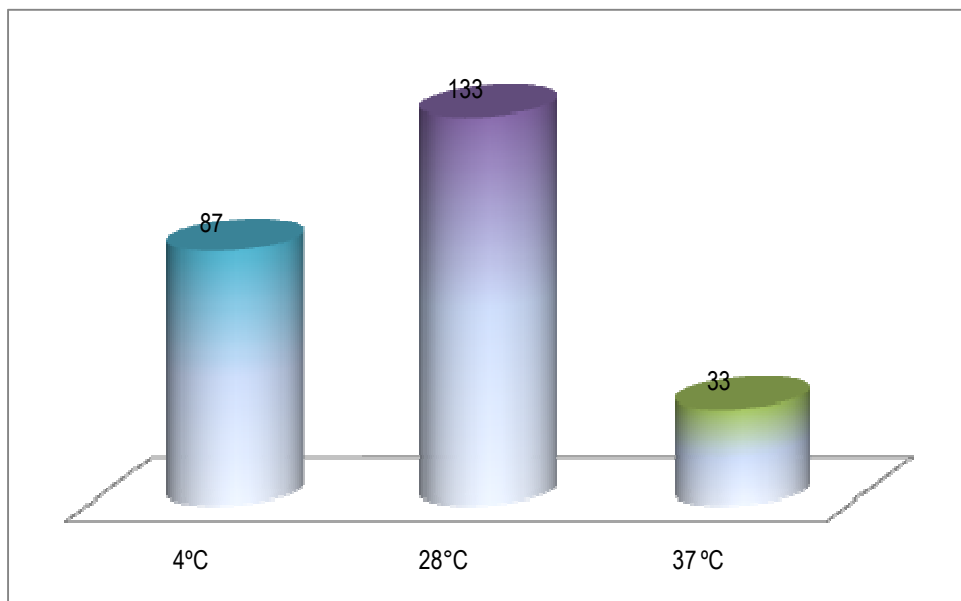
GRÁFICOS

Figura C1. Caracterización microscópica.



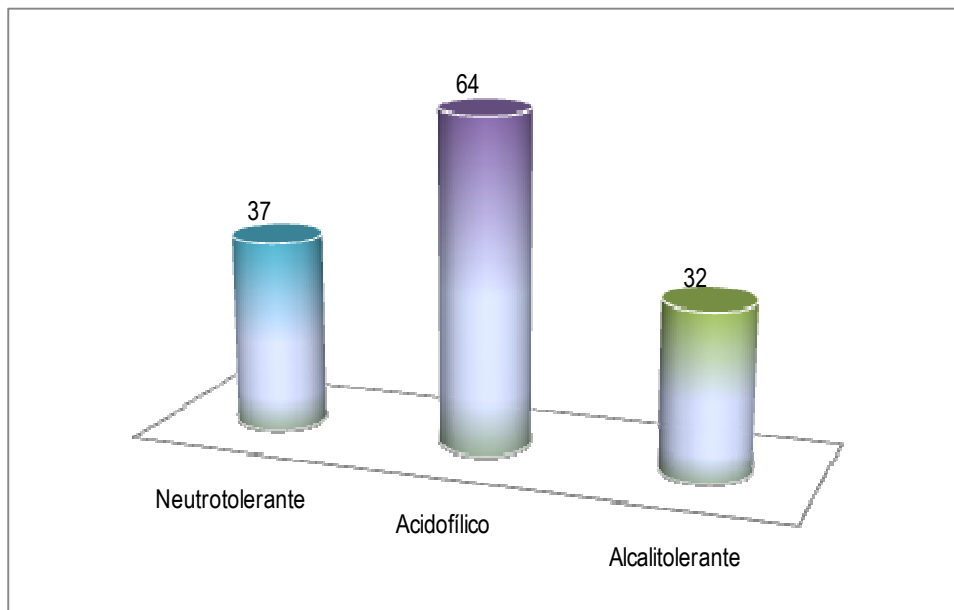
Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C2. Crecimiento en función de la temperatura.



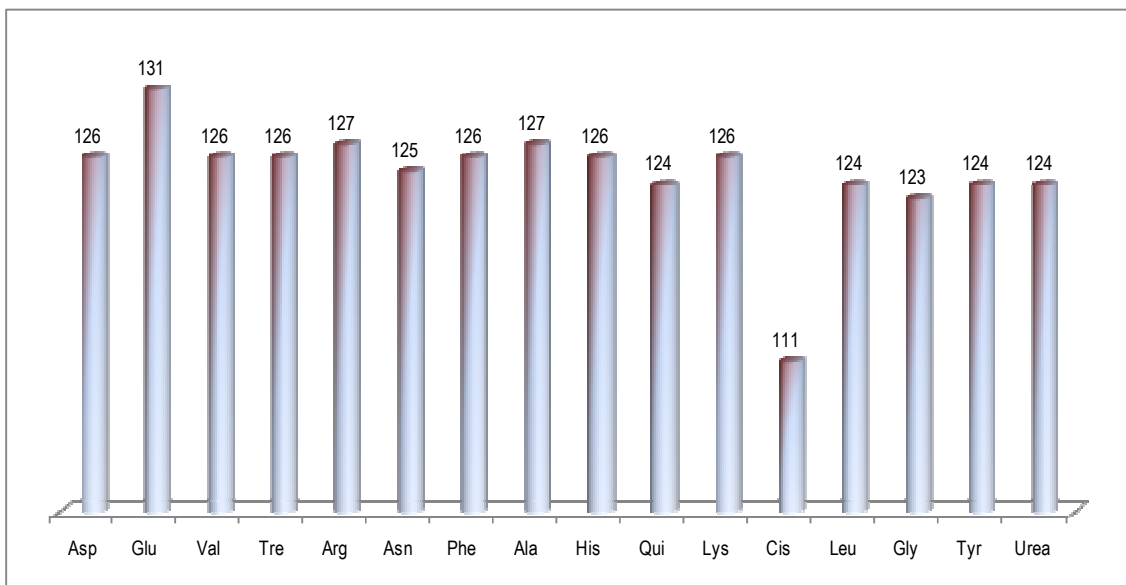
Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C3. Crecimiento en función del pH.



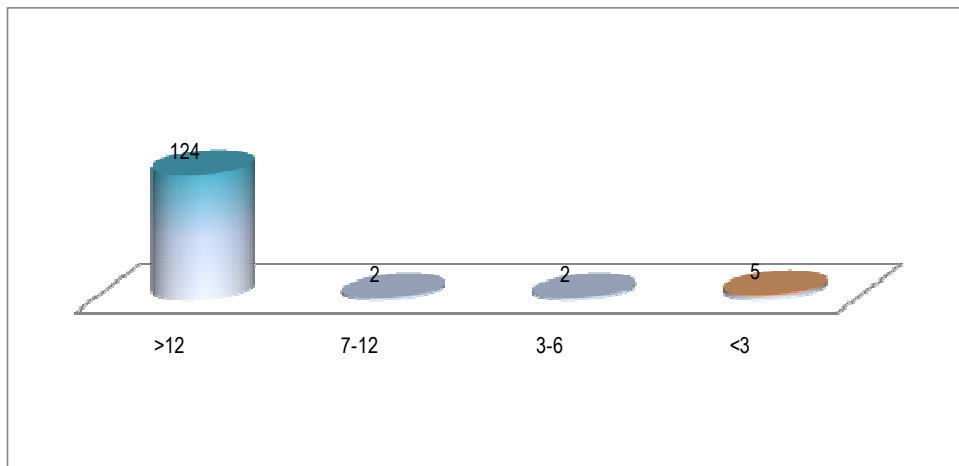
Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C4. Crecimiento en diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno.



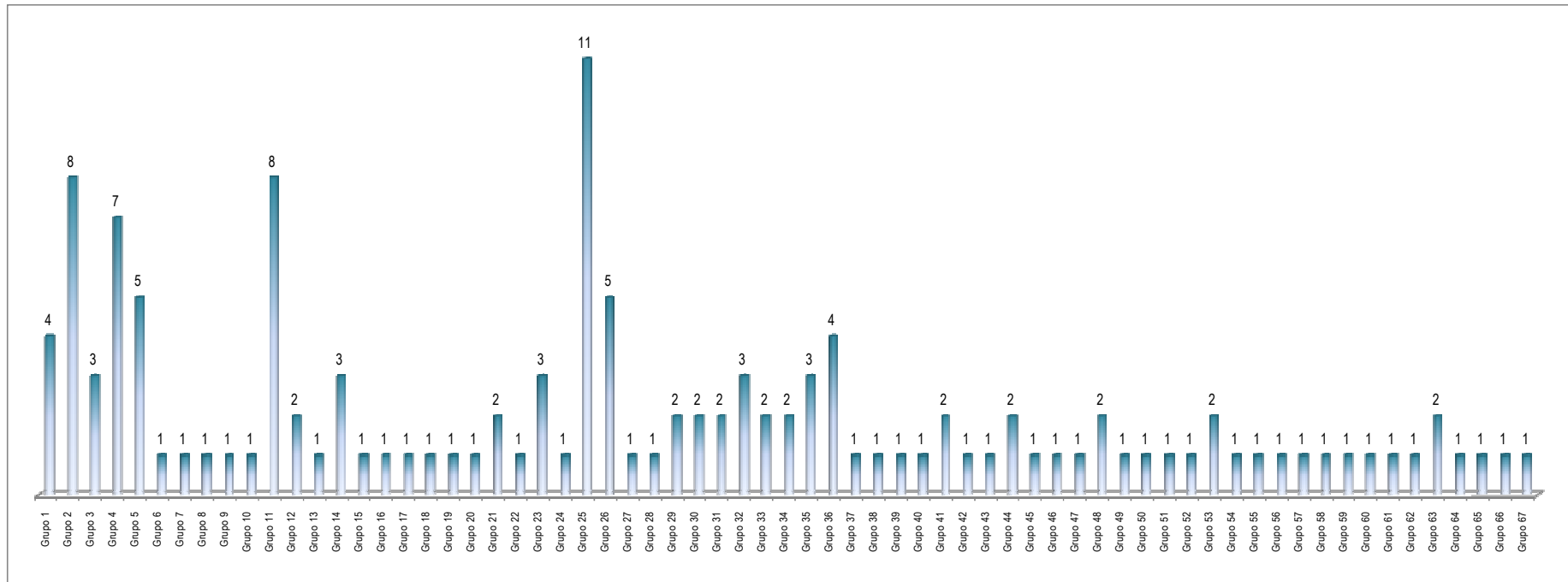
Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C5. Número de fuentes de Carbono y Nitrógeno utilizados.



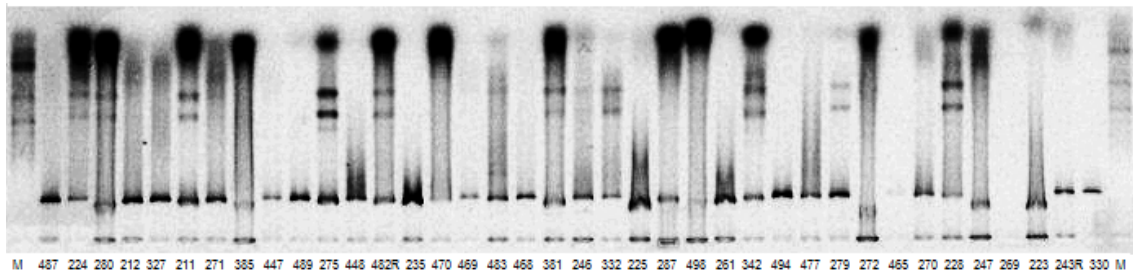
Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Figura C7. Grupos especie formados a partir de datos fenotípicos.



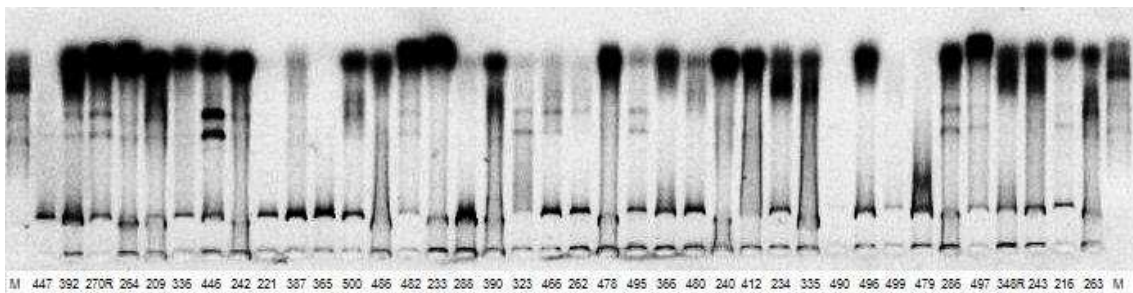
Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Figura C8. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (I).



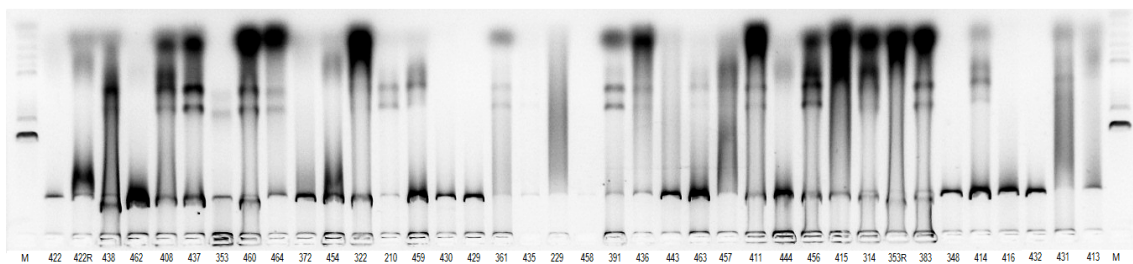
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C9. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (II).



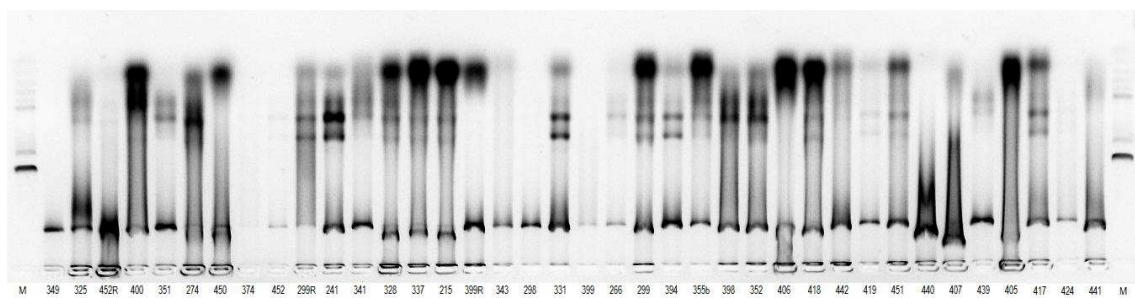
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C10. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (III).



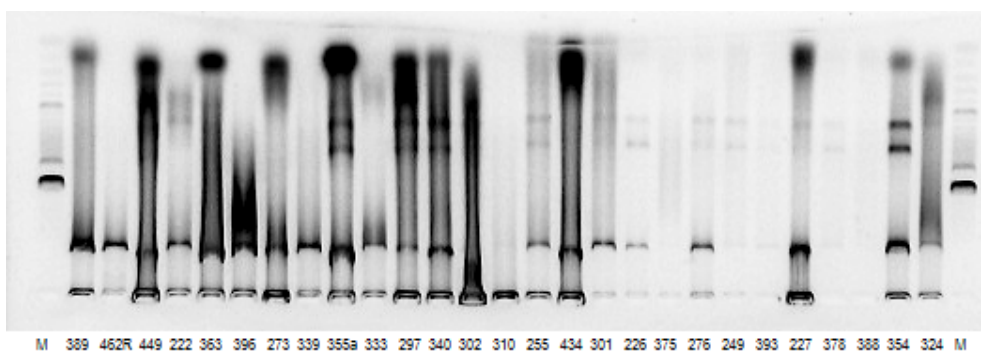
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C11. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (IV).



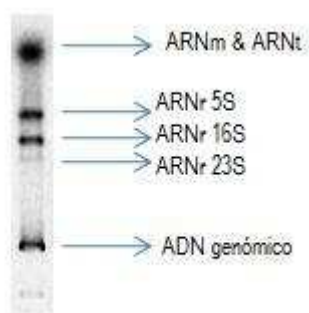
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C12. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa para determinar la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico (V)



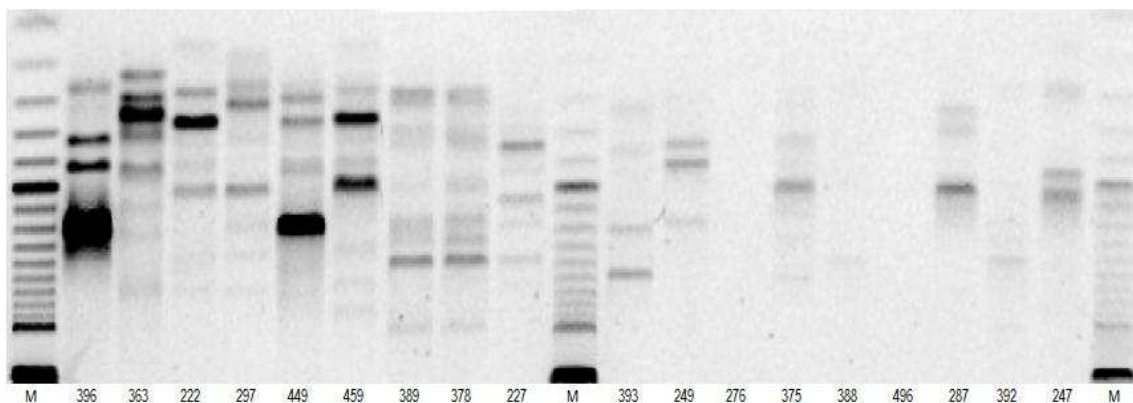
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C13. Posición del ADN genómico.



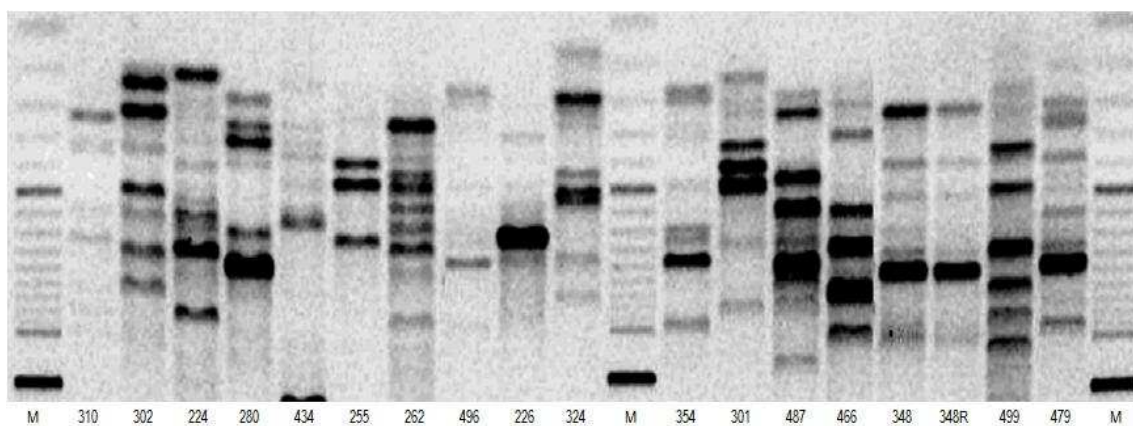
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C14. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (I).



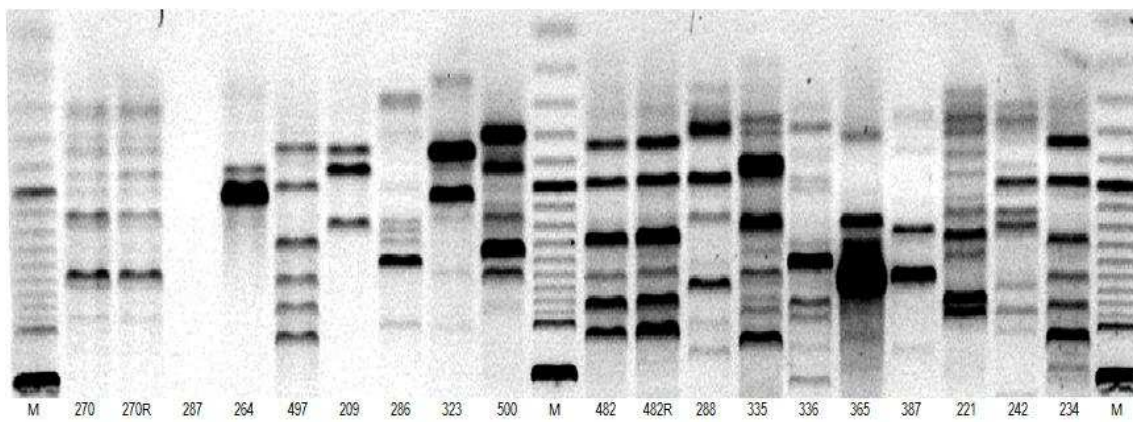
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C15. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (II).



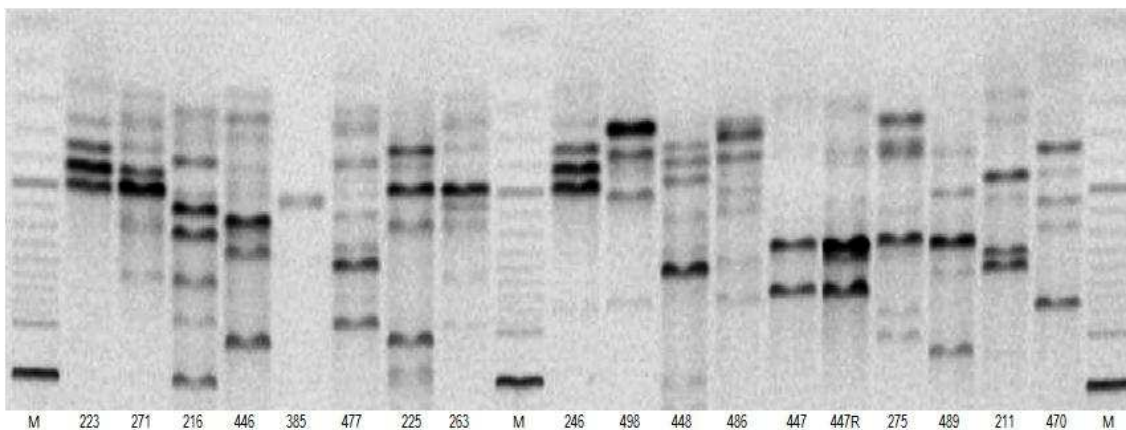
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C16. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (III).



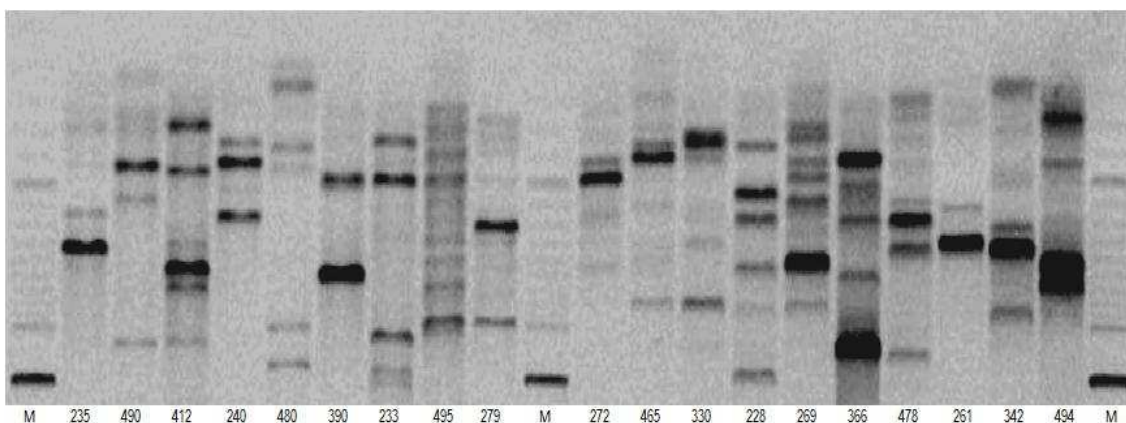
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C17. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (IV).



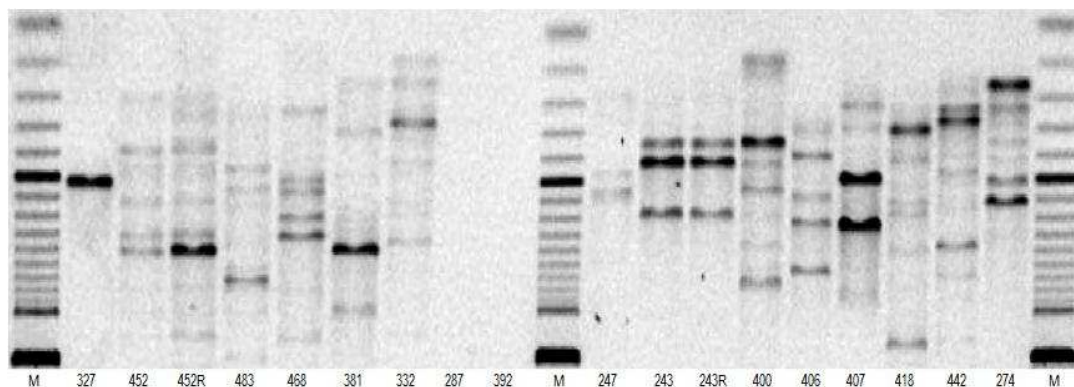
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C18. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (V).



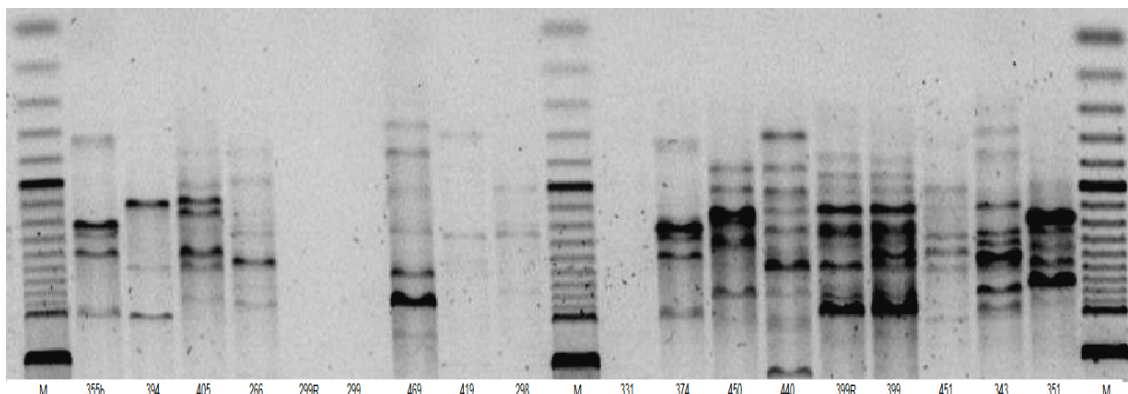
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C19. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (VI).



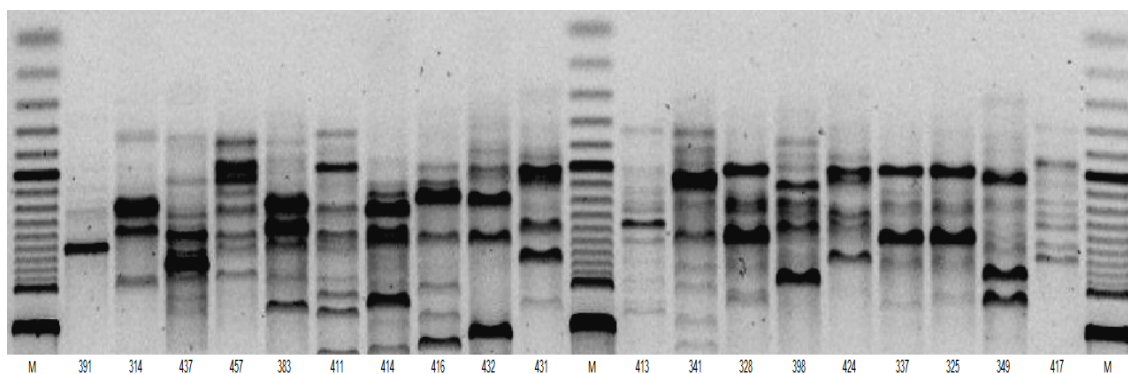
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C20. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (VII).



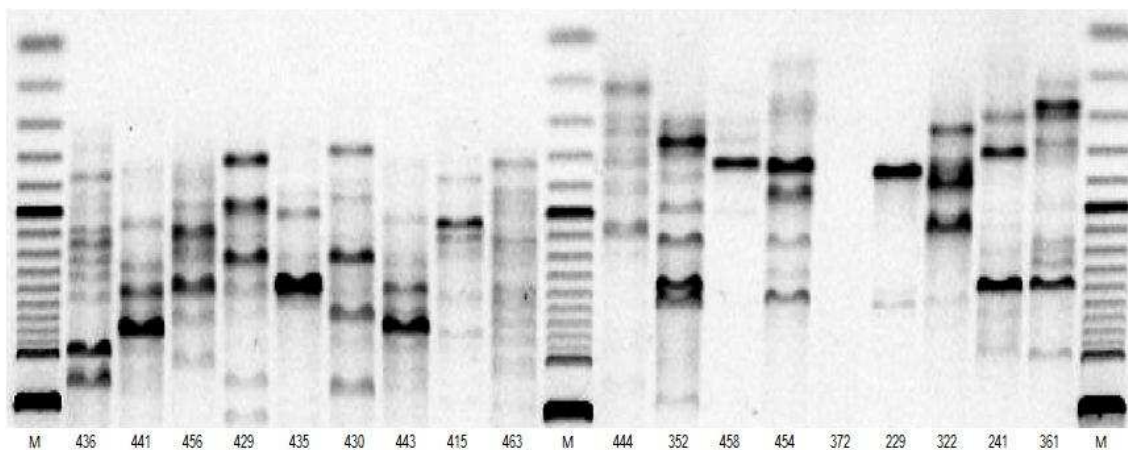
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C21. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (VIII).



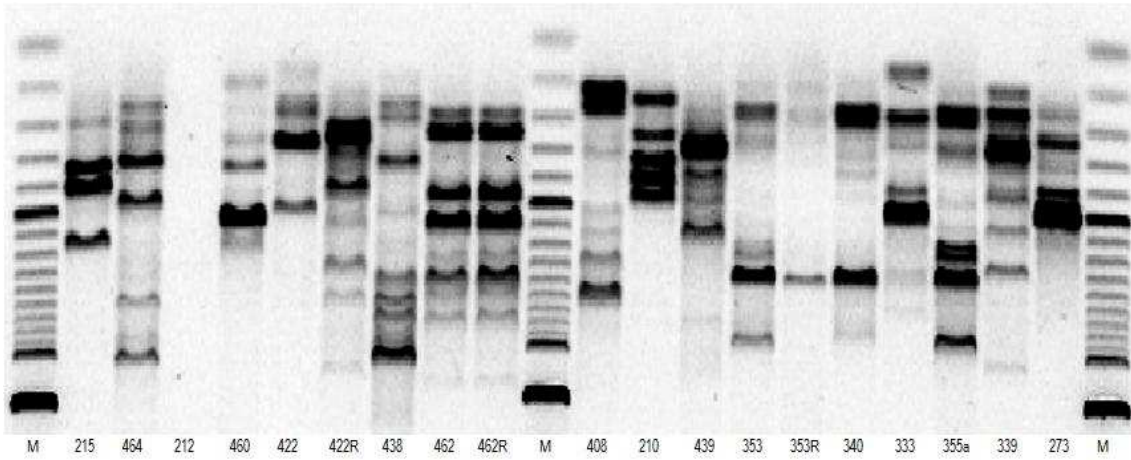
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C22. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (IX).



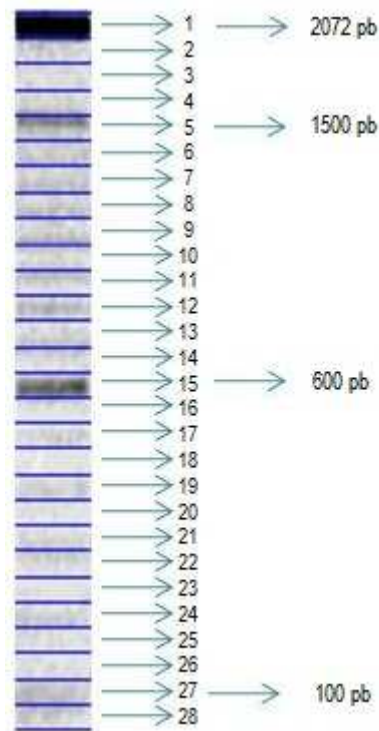
* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C23. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR (X).



* Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

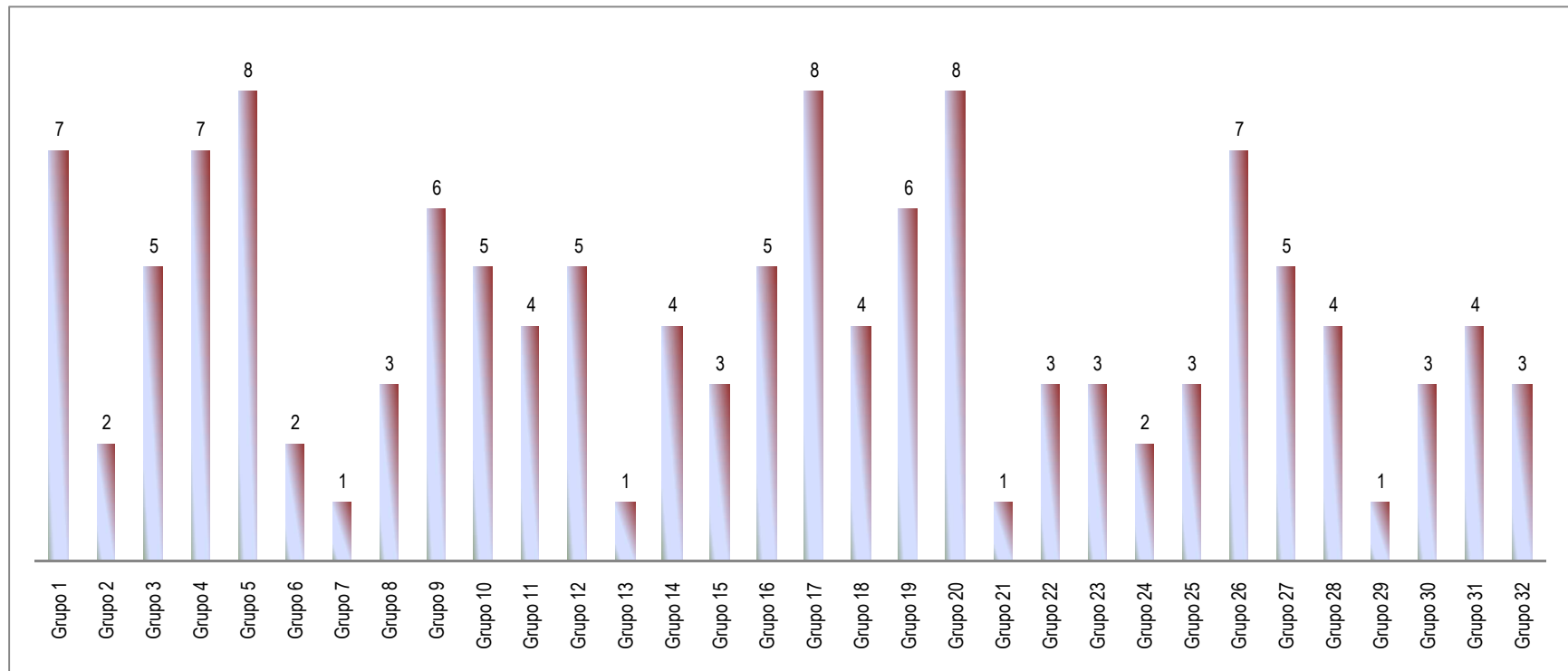
Figura C24. Bandas de ADN.



Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

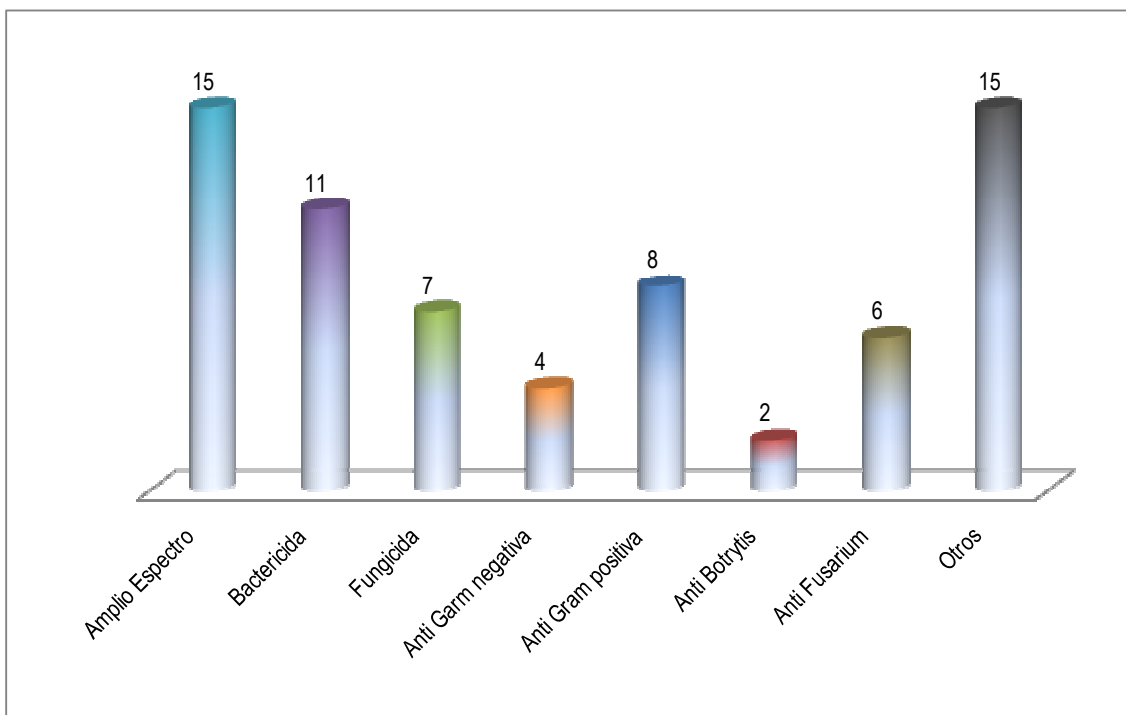
* Todos las fotografías de electroforesis en gel de agarosa para la determinación de la cantidad, integridad y pureza del ADN genómico y de los fingerprintings obtenidos por Rep-PCR se realizaron en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales (ESPOCH).

Figura C26. Grupos especie obtenidos de los datos genotípicos.



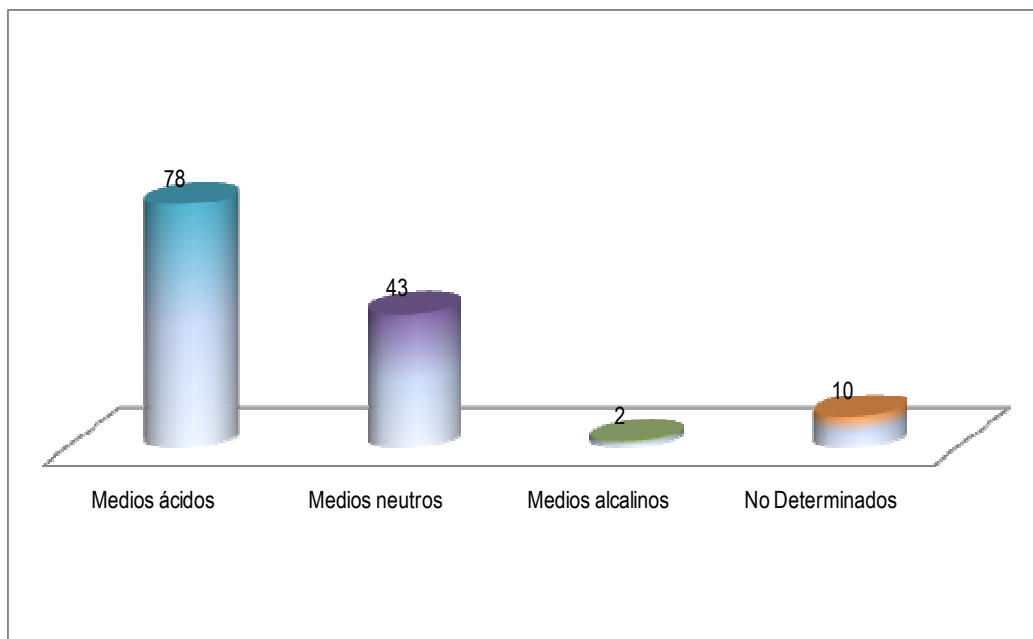
Elaborado por: Adriana Vinuesa, 2010.

Figura C27. Tipos de actividad de los metabolitos secundarios producidos por actinomicetes.



Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

Figura C28. pH de los medios de cultivo del aislamiento selectivo original.



Elaborado por: Adriana Vinueza, 2010.

ANEXO D

MEDIOS DE CULTIVO Y

SOLUCIONES

MEDIOS DE CULTIVO

Agar GYM

Glucosa	4.00 g
Extracto de levadura	10.00 g
Extracto de malta	10.00 g
CaCO ₃	2.00 g
Agar	15.00 g
Agua	1000.00 ml

Agar Avena Modificado

Avena	20.00 g
Glucosa	4.00 g
Solución de sales traza	2.00 ml
Agar	15.00 g
Agua	1000.00 ml

Agar No Esporulante

Casaminoácidos	20.00 g
Almidón Soluble	20.00 g
Extracto de Levadura	4.00 ml
Agar	15.00 g
Agua	1000.00 ml

Medio Basal para Fuentes de Carbono y Nitrógeno

Aminoácido	1.00 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50 g
Agar	15.00 g
Agua	1000.00 ml

Agar PDA

Agar Papa Dextrosa	39.00 g
Agua	1000.00 ml

Agar Nutritivo

Agar Nutritivo	23.00 g
Agua	1000.00 ml

BUFERS

Búfer de Fosfato di Básico de Sodio y Ácido Cítrico

Solución de Ácido cítrico 0.1 M (PM: 210.14 g)

Solución de Fosfato di básico de Sodio 0.2 M (PM: 141.98 g)

Se prepara un volumen final de 100 ml:

pH	0.1 M Ácido Cítrico (ml)	0.2 M Na₂HPO₄ (ml)
2.6	89.10	10.90
3.0	79.45	20.55
3.5	69.75	30.25
4.0	61.45	38.55
4.5	54.57	45.43
5.0	48.50	51.50
5.5	43.13	56.87
6.0	36.85	63.15
6.5	29.04	70.96
7.0	17.65	82.35
7.5	7.62	92.38

Búfer de Hidróxido de Sodio y Ácido Bórico

Solución de Hidróxido de Sodio 0.2 M (PM: 40.00 g)

Solución de Ácido Bórico 0.2 M (PM: 61.80 g)

Se prepara un volumen final de 100 ml:

pH	0.2 M Ácido Bórico (ml)	0.2 M NaOH (ml)
8.5	75.00	25.00
9.5	55.00	45.00

Búfer de extracción de ADN

Glucosa	50 mM
Tris HCl, pH 8	25 mM
EDTA, pH 8	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 0.1 M y para el búfer EDTA una 0.05M. 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, pH 8	1 mM

Búfer TBE 10X

Tris Base	107.78 g
Acido Bórico	7.44 g
EDTA-Na	55.00 g

ANEXO E

FOTOGRAFÍAS

Pruebas Fenotípicas

Caracterización Macroscópica

Agar GYM

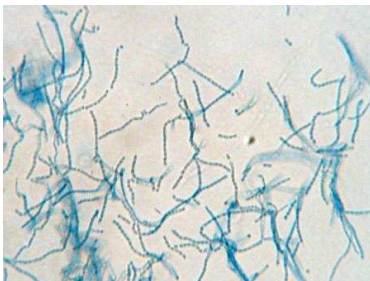


Agar Avena



Caracterización Microscópica

Tipos de cadenas de esporas



a) Cadenas rectas



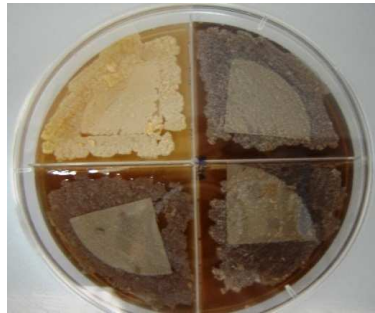
b) Cadenas espirales



c) Cadenas incompletas

Almacenamiento de biomasa microbiana

Actinomicetes crecidos sobre membranas de celulosa



Rango de crecimiento en función de la Temperatura

Crecimiento a 37°C y 4°C

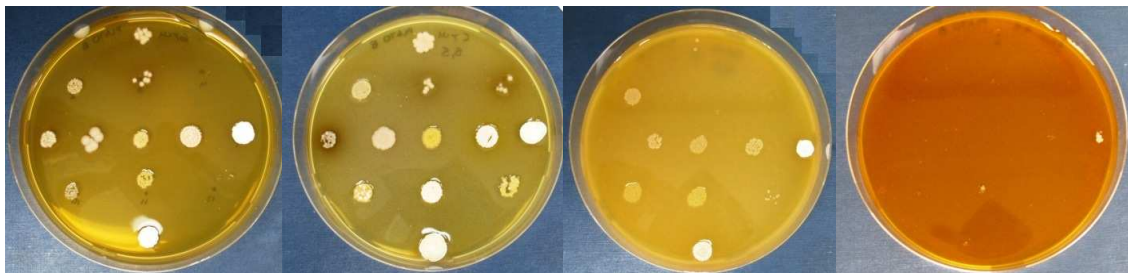


a) 37°C

b) 4°C

Rango de crecimiento en función del pH

Crecimiento a pH 4.5, 5.5, 6.5 y 7.5



a) 4.5

b) 5.5

c) 6.5

d) 7.5

Crecimiento a pH 8.5 y 9.5

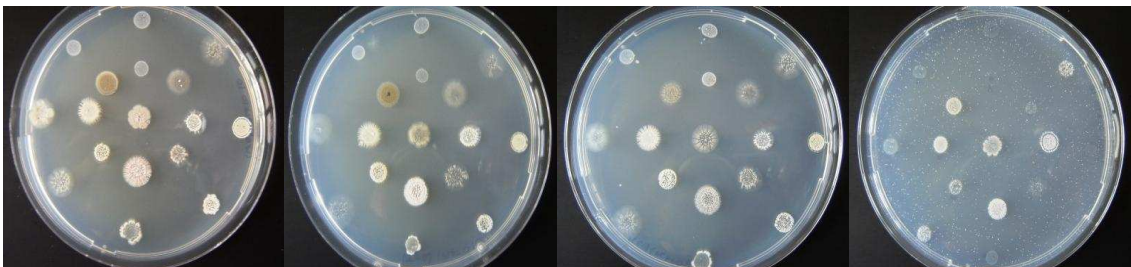


a) 8.5

b) 9.5

Uso de Distintas Fuentes de Carbono y Nitrógeno

Crecimiento en Ácido aspártico, Asparagina, Fenilalanina y Valina



a) Asp

b) Asn

c) Phe

d) Val

Crecimiento en Alanina, Quitina, Histidina y Treonina



a) Ala

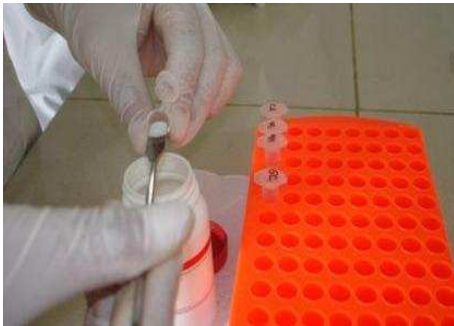
b) Qui

c) His

d) Tre

Extracción de ADN

Paso 1



Paso 2



Paso 3



Paso 4



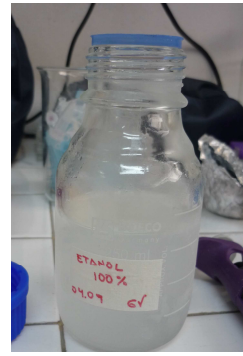
Paso 5



Paso 6



Paso 7



Paso 8

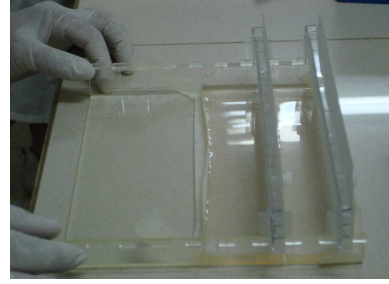


Paso 9



Determinación de cantidad, integridad y pureza del ADN genómico

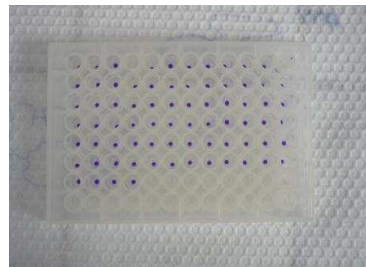
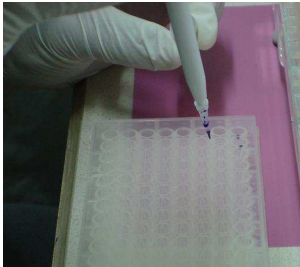
Preparación del gel de agarosa



Cámara de electroforesis con el gel de agarosa



Búfer de cargado (loading buffer)



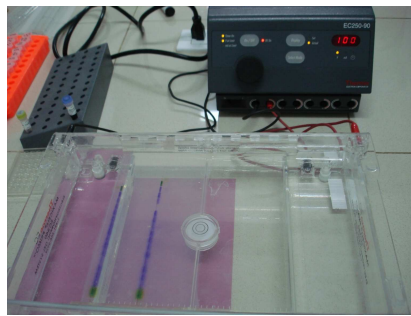
Marcador de ADN (marker)



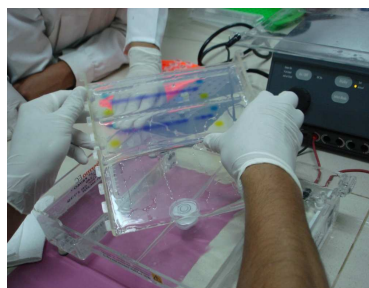
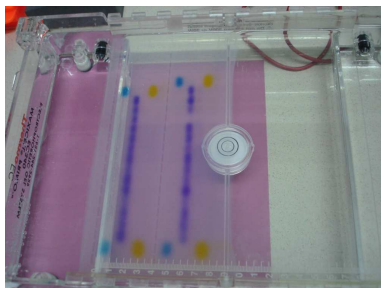
Cargado en pozuelos



Corrida de gel



Finalización de la corrida de gel



Visualización del gel



Rep- PCR

Tubos para PCR con ADN genómico con solución master mix



Tubos en el termobloque del termociclador



Taq polimerasa



Corrida de gel

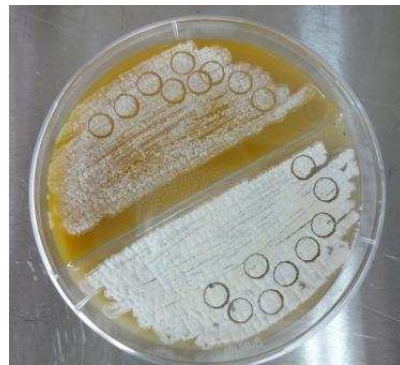


Antagonismo Microbiano

Cultivos de actinomicetes utilizados para el antagonismo



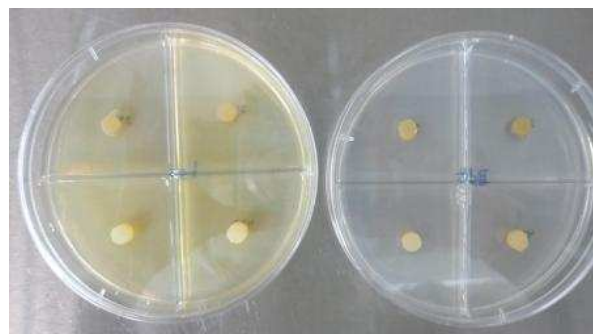
Utilización del sacabocados para extraer bloques cilíndricos



Instalación del experimento



a) Medios de cultivo con microorganismos modelo



b) Posición de los cilindros

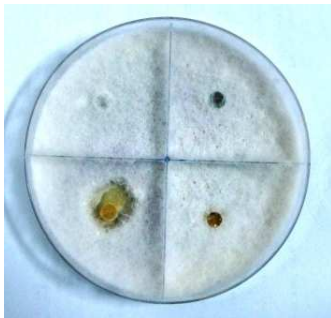
Actividad frente a la bacteria Gram positiva



Actividad frente a la bacteria Gram negativa



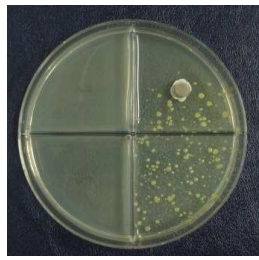
Actividad frente a *Fusarium*



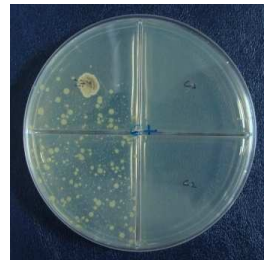
Actividad frente a *Botrytis*



Control experimental (rifampicina) para la bacteria Gram positiva

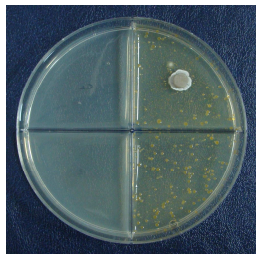


a) Frente de la caja

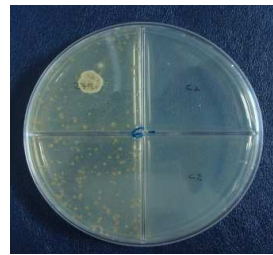


b) Reverso de la caja

Control experimental (rifampicina) para la bacteria Gram negativa

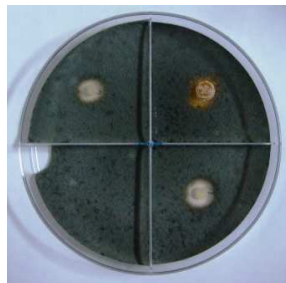


a) Frente de la caja

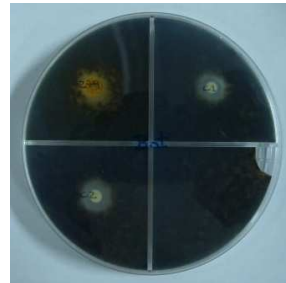


b) Reverso de la caja

Control experimental (nystatin) para *Botrytis*



a) Frente de la caja

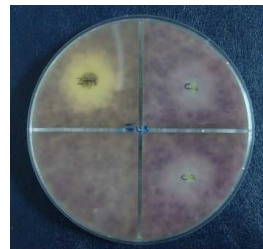


b) Reverso de la caja

Control experimental (nystatin) para *Fusarium*



a) Frente de la caja



b) Reverso de la caja

ANEXO F

TABLA DE COLORES

**(British Standard
Specification for colours for
identification, coding and
special purposes)**

Table 1. Standard colours

Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference	Page with colour sample
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β		
			x	y			
101	Sky blue	gloss	0.287	0.351	0.345	5BG 6/4	7
103	Peacock blue	gloss	0.240	0.302	0.116	5B 3/6	7
104	Azure blue	gloss	0.226	0.233	0.083	5PB 3/6	7
		matt	0.218	0.223	0.073	5PB 3/6	—
105	Oxford blue	gloss	0.248	0.245	0.049	7.5PB 2/6	7
106	Royal blue	gloss	0.291	0.296	0.039	10PB 1/1	7
107	Strong blue	gloss	0.209	0.240	0.148	2.5PB 4/10	17
108	Aircraft blue	gloss	0.219	0.196	0.060	7.5PB 2/10	17
		matt	0.221	0.199	0.057	7.5PB 2.5/8	—
109	Middle blue	gloss	0.214	0.249	0.095	10B 3/8	7
110	Roundel blue	gloss	0.232	0.214	0.064	7.5PB 2/8	7
		matt	0.230	0.212	0.059	7.5PB 2.5/6	—
112	Arctic blue	gloss	0.246	0.300	0.314	7.5B 6/6	7
113	Deep Saxe blue	gloss	0.239	0.292	0.112	7.5B 3/6	7
166	French blue	gloss	0.205	0.195	0.120	7.5PB 3.5/12	17
		matt	0.202	0.190	0.115	7.5PB 3/12	—
172	Pale roundel blue	matt	0.265	0.287	0.431	2.5PB 7/4	7
175	Light French blue	gloss	0.215	0.227	0.191	5PB 4.5/12	17
210	Sky	gloss	0.331	0.366	0.426	5GY 7/2	9
		matt	0.331	0.368	0.437	5GY 7/2	—
216	Eau-de-Nil	gloss	0.335	0.405	0.444	7.5GY 7/4	9
217	Sea green	gloss	0.343	0.441	0.326	7.5GY 6/6	9
218	Grass green	gloss	0.328	0.459	0.177	7.5GY 4.5/8	17
220	Olive green	gloss	0.338	0.406	0.085	5GY 3/6	9
221	Brilliant green	gloss	0.309	0.457	0.136	10GY 4/8	17
		matt	0.307	0.457	0.133	10GY 4/8	—
223	Middle bronze green	gloss	0.334	0.383	0.078	5GY 3/2	9
224	Deep bronze green	gloss	0.324	0.368	0.061	2.5GY 2/4	9
		matt	0.323	0.365	0.063	2.5GY 2/2	—
225	Light Brunswick green	gloss	0.314	0.441	0.105	7.5GY 3.5/7	9
226	Middle Brunswick green	gloss	0.292	0.389	0.073	5G 2/6	9
227	Deep Brunswick green	gloss	0.294	0.364	0.060	10GY 2/4	9
228	Emerald green	gloss	0.259	0.414	0.173	7.5G 4/8	17
241	Dark green	gloss	0.330	0.361	0.090	10Y 3/2	9
		matt	0.331	0.360	0.086	10Y 3/2	—
262	Bold green	gloss	0.262	0.438	0.191	2.5G 5/8	17
267	Deep chrome green	gloss	0.288	0.391	0.104	2.5G 3/4	9
280	Verdigris green	gloss	0.283	0.403	0.251	5G 5/6	9
283	Aircraft grey green	gloss	0.322	0.376	0.207	7.5GY 5/2	9
		matt	0.321	0.379	0.195	7.5GY 5/2	—
285	NATO green	matt	0.334	0.362	0.091	10Y 3/1	9
298	Olive drab	gloss	0.341	0.375	0.078	10Y 3/2	9
		matt	0.339	0.375	0.075	10Y 3/2	—

Table 1. (continued)							
Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference	Page with colour sample
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β		
			x	y			
309	Canary yellow	gloss	0.447	0.483	0.624	5Y 9/14	17
		matt	0.448	0.487	0.657	5Y 9/14	—
310	Primrose	gloss	0.403	0.448	0.664	7.5Y 8.5/8	11
320	Light brown	gloss	0.429	0.398	0.179	7.5YR 4.5/6	11
337	Very dark drab	gloss	0.336	0.357	0.081	7.5Y 2/2	11
		matt	0.338	0.358	0.079	7.5Y 3/2	—
352	Pale cream	gloss	0.380	0.401	0.626	5Y 9/6	11
353	Deep cream	gloss	0.409	0.421	0.648	2.5Y 8.5/8	11
355	Lemon	gloss	0.471	0.471	0.532	2.5Y 8/12	17
		matt	0.467	0.468	0.553	2.5Y 8/12	—
356	Golden yellow	gloss	0.485	0.454	0.496	10YR 7/14	17
		matt	0.485	0.456	0.484	10YR 7/12	—
358	Light buff	gloss	0.415	0.407	0.470	10YR 7/6	11
		matt	0.416	0.406	0.459	10YR 7/6	—
361	Light stone	gloss	0.384	0.388	0.393	10YR 7/4	11
		matt	0.389	0.392	0.376	10YR 7/4	—
363	Bold yellow	gloss	0.471	0.475	0.615	2.5Y 8/14	17
365	Vellum	gloss	0.344	0.369	0.627	7.5Y 8.5/2	11
		matt	0.345	0.371	0.606	7.5Y 8.5/2	—
367	Manilla	gloss	0.354	0.371	0.681	2.5Y 8.5/2	11
368	(See 568)						
369	Biscuit	gloss	0.373	0.380	0.651	10YR 8/4	11
384	Light straw	gloss	0.360	0.381	0.569	5Y 8/4	11
388	Beige	gloss	0.370	0.382	0.495	2.5Y 7/4	11
389	Camouflage beige	matt	0.343	0.364	0.315	5Y 6/2	11
410	(See 320)						
411	Middle brown	gloss	0.413	0.380	0.100	7.5YR 3/6	13
412	Dark brown	gloss	0.382	0.351	0.068	5YR 2/4	13
414	Golden brown	gloss	0.461	0.397	0.163	5YR 4/8	13
436	Dark camouflage brown	matt	0.345	0.346	0.074	5YR 3/1	13
437	(See 337)						
445	Venetian red	gloss	0.451	0.350	0.094	10R 3/8	13
447	Salmon pink	gloss	0.400	0.361	0.421	2.5YR 7/6	13
454	Pale roundel red	matt	0.378	0.327	0.360	10RP 7/6	13
499	Service brown	gloss	0.360	0.357	0.074	10YR 2.5/4	11
		matt	0.365	0.360	0.069	10YR 2.5/2	—
537	Signal red	gloss	0.548	0.334	0.144	7.5R 4.5/16	17
		matt	0.555	0.331	0.149	7.5R 4.5/14	—
538	Cherry	gloss	0.529	0.322	0.104	5R 3.5/16	17
		matt	0.534	0.325	0.116	5R 3.5/14	—
539	Currant red	gloss	0.539	0.325	0.123	7.5R 4/14	17
541	Maroon	gloss	0.353	0.325	0.046	5R 2/8	13
542	Ruby	gloss	0.403	0.274	0.087	7.5RP 3/10	13

Table 1. (concluded)

Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference	Page with colour sample
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β		
			x	y			
557	Light orange	gloss	0.517	0.393	0.274	2.5YR 6/14	17
		matt	0.517	0.392	0.284	2.5YR 6/14	—
564	Bold red	gloss	0.553	0.330	0.147	8.75R 4/14	17
568	Apricot	gloss	0.502	0.421	0.334	7.5YR 6/14	17
592	International orange	gloss	0.545	0.355	0.184	10R 5/16	17
593	Rail red	gloss	0.561	0.345	0.181	8.75R 5/17	17
626	Camouflage grey	matt	0.304	0.328	0.321	10B 6/1	15
627	Light aircraft grey	gloss	0.317	0.338	0.435	N 7.25	15
		matt	0.319	0.339	0.428	N 7	—
630	French grey	gloss	0.323	0.356	0.327	5GY 6/1	15
631	Light grey	gloss	0.308	0.341	0.310	7.5G 6/1	15
		matt	0.308	0.342	0.314	7.5G 6/1	—
632	Dark Admiralty grey	gloss	0.299	0.321	0.149	10B 4/0.5	15
		matt	0.300	0.322	0.146	10B 4/0.5	—
637	Medium sea grey	gloss	0.301	0.324	0.273	10B 5.5/1	15
		matt	0.303	0.326	0.270	10B 6/1	—
638	Dark sea grey	gloss	0.300	0.318	0.142	5PB 4/1	15
		matt	0.299	0.316	0.139	2.5PB 4/2	—
641	(See 241)						
642	Night	gloss	0.310	0.327	0.047	N 1	15
		matt	0.310	0.326	0.039	N 1.75	—
676	Light weatherwork grey	gloss	0.300	0.325	0.382	2.5PB 6.5/2	15
677	Dark weatherwork grey	gloss	0.296	0.315	0.146	5PB 4/2	15
692	Smoke grey	gloss	0.272	0.303	0.237	10B 5/4	15
693	Aircraft grey	gloss	0.307	0.334	0.234	10BG 5/1	15
694	Dove grey	gloss	0.313	0.339	0.261	5GY 5/1	15
697	Light Admiralty grey	gloss	0.297	0.334	0.479	10BG 7.5/2	15
		matt	0.298	0.336	0.490	10BG 7.5/2	—
796	Dark violet	gloss	0.304	0.244	0.092	7.5P 3/7	17
797	Light violet	gloss	0.304	0.286	0.359	5P 6.5/6	13

Table 2. Obsolescent colours						
Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β	
			x	y		
102	Turquoise blue	gloss	0.254	0.332	0.213	7.5BG 5/5
111	Pale blue	gloss	0.281	0.347	0.414	5BG 7/4
114	Rail blue	gloss	0.233	0.290	0.068	2.5B 2/6
115	Cobalt blue	gloss	0.236	0.250	0.221	5PB 5/8
174	Oriental blue	gloss	0.242	0.315	0.247	2.5B 5.5/6
222	Light bronze green	gloss	0.371	0.431	0.129	2.5GY 4/6
		matt	0.368	0.429	0.130	2.5GY 4/4
275	Opaline green	gloss	0.305	0.386	0.383	2.5G 7/6
278	Light olive green	gloss	0.352	0.413	0.232	5GY 5/4
350	Dark earth	gloss	0.367	0.370	0.145	10YR 4/2
		matt	0.374	0.374	0.141	10YR 4/2
359	Middle buff	gloss	0.435	0.413	0.349	10YR 6/8
360	(See 460)					
366	Light beige	gloss	0.371	0.385	0.593	2.5Y 8/4
446	Red oxide	gloss	0.428	0.348	0.081	10R 2.5/7
450	(See 350)					
453	Shell pink	gloss	0.335	0.332	0.594	10RP 8/3
460	Deep buff	gloss	0.420	0.394	0.270	7.5YR 5.5/6
473	Gulf red	gloss	0.429	0.335	0.073	10R 2/6
489	Leaf brown	gloss	0.421	0.367	0.120	5YR 3/6
540	Crimson	gloss	0.447	0.319	0.065	5R 2/8
633	RAF blue grey	gloss	0.291	0.315	0.073	7.5B 2/2
		matt	0.289	0.315	0.067	7.5B 2/2
634	Slate	gloss	0.325	0.358	0.146	5GY 4/1
635	Lead	gloss	0.309	0.344	0.010	5G 3/1
636	PRU blue	gloss	0.274	0.307	0.155	10B 4/3
		matt	0.273	0.308	0.151	10B 4/3
640	Extra dark sea grey	gloss	0.296	0.317	0.112	10B 3.5/1
		matt	0.296	0.315	0.108	10B 3.5/1
671	Middle graphite	gloss	0.303	0.323	0.092	10B 3/1



172 Pale roundel blue



112 Arctic blue



101 Sky blue



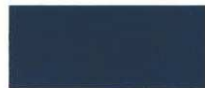
103 Peacock blue



104 Azure blue



109 Middle blue



113 Deep Saxe blue



110 Roundel blue



105 Oxford blue



106 Royal blue



216 Eau-de-Nil



210 Sky



217 Sea green



280 Verdigris green



283 Aircraft grey green



267 Deep chrome green



225 Light Brunswick green



285M NATO green



220 Olive green



241 (641) Dark green



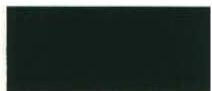
298 Olive drab



226 Middle Brunswick green



223 Middle bronze green



227 Deep Brunswick green



224 Deep bronze green



310 Primrose



367 Manilla



365 Vellum



353 Deep cream



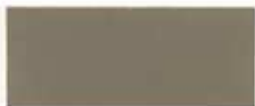
369 Biscuit



352 Pale cream



384 Light straw



389 Camouflage beige



388 Beige



358 Light buff



361 Light stone



320 (410) Light brown



337 (437) Very dark drab



499 Service brown



447 Salmon pink



797 Light violet



454 Pale roundel red



414 Golden brown



411 Middle brown



445 Venetian red



542 Ruby



436M Dark camouflage brown



796 Dark violet



108 Aircraft blue



166 French blue



175 Light French blue



107 Strong blue



228 Emerald green



262 Bold green



221 Brilliant green



218 Grass green



309 Canary yellow



363 Bold yellow



355 Lemon



356 Golden yellow



568 (368) Apricot



557 Light orange



592 International orange



593 Rail red



537 Signal red



564 Bold red



539 Currant red



538 Cherry