



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

---

**Caracterización Molecular de Actinomicetes Provenientes de Ecosistemas  
Antárticos**

---

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

**Autor:** Daniela Giovanna Navas León

**Tutor:** Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza; Ph.D.

AMBATO - ECUADOR

Abril - 2016

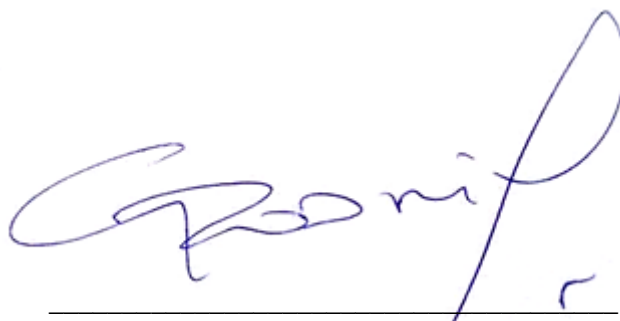
## APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza; Ph.D.

CERTIFICA:

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

Ambato, 18 de Febrero de 2016



---

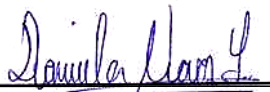
Dr. Carlos Alberto Rodríguez Meza; Ph.D.

C.I. 1802166502

TUTOR

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

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



---

Daniela Giovanna Navas León

C.I. 1803077450

**AUTORA**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:



---

**Ing. Alex Fabián Valencia Silva, Mg.**

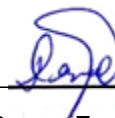
C.I. 180312108-4



---

**Ing. Mirari Yosune Arancibia Soria; Ph.D.**

C.I. 180214246-1



---

**Lic. Mg. Danae Fernández Rivero**

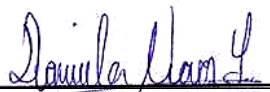
C.I. 175718120-9

Ambato, 5 de Abril del 2016

## DERECHOS DE AUTOR

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

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



---

Daniela Giovanna Navas León

C.I. 180307745-0

**AUTORA**

## **DEDICATORIA**

A mi Ma, mi Abuelito Juan y mis hermanos Josué, Alef y Abrahany.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por todas las bendiciones q me ha dado; porque a pesar de no haber tenido todo lo que he querido, he querido todo lo que he tenido.

A la Universidad Técnica de Ambato, a mis profesores de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por todo el conocimiento y apoyo brindado.

Al Dr. Carlos Rodríguez, por ser la guía de este trabajo y más que todo, por la confianza, paciencia y amistad que ha compartido conmigo.

A mi Pa, Mami Mery, Katy y toda mi familia, que han sido el pilar fundamental en mi vida.

Y por todo lo vivido durante la carrera: Mary, Cris, Caro, Álvaro, JuanJo, José, Gato, Carlitos, Osito, Mayrita, Malu y Chirlo; gracias por el cariño y el apoyo incondicional.

# ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

## A. PAGINAS PRELIMINARES

Portada	I
Aprobación por el tutor	II
Declaración de Autenticidad	III
Aprobación del tribunal de grado	IV
Derechos de Autor	V
Dedicatoria	VI
Agradecimiento	VII
Índice general de contenidos	VIII
Índice de tablas	XI
Índice de figuras	XIII
Resumen	XIV
Abstract	XV

## B. TEXTO

### CAPÍTULO I

#### EL PROBLEMA

1.1 Tema de Investigación	3
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	4

### CAPÍTULO II

#### MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos	5
2.1.1 Biodiversidad microbiana en la Antártida	5
2.1.2 Biodiversidad microbiana en los Páramos Andinos	5
2.1.3 Generalidades de los actinomicetes	6
2.1.3.1 Rol ecológico	6



2.1.3.2 Taxonomía	6
2.1.4 Importancia biotecnológica	9
2.1.4.1 Para uso humano	9
2.1.4.2 Para uso en agricultura	9
2.1.5 Identificación molecular de actinomicetes	10
2.1.5.1 Técnicas moleculares que se usan para identificar actinomicetes	10
2.1.5.2 Aislamiento de ADN	11
2.1.5.3 PCR 16S	12
2.1.5.4 Análisis filogenético de actinomicetes	12
2.2 Hipótesis	13
2.2.1. Hipótesis nula	13
2.2.2. Hipótesis alternante	13
2.3 Señalamiento de variables de las hipótesis	13

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1 Recuperación, purificación y almacenamiento de microorganismos	14
3.2 Grupos de color	15
3.3 Extracción de ADN genómico	16
3.4 Determinación de la concentración y pureza del ADN genómico extraído	17
3.5 Documentación de ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa	17
3.6 Identificación molecular	18
3.6.1 Amplificación de los fragmentos de ADN 16S	18
3.6.2 Purificación y secuenciación de los productos de ARNr 16S PCR-amplificados	19
3.6.3 Alineamiento y análisis filogenético	19
3.6.4 Descripción taxonómica de las especies de actinomicetes identificadas molecularmente	20

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. Análisis y discusión de los resultados	21
4.1.1 Separación en grupos de color	21
4.1.2 Aislamiento y determinación de la concentración y pureza del ADN genómico	22

4.1.3 Amplificación de los fragmentos de ADNr 16S	23
4.1.4 Identificación molecular de los actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y el norte del Chimborazo	26
4.1.5 Descripción taxonómica	32
4.1.6 Discusión general del trabajo	36
4.2. Verificación de hipótesis	38

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1. Conclusiones	39
5.2. Recomendaciones	39

## **C. MATERIALES DE REFERENCIA**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	
Anexo A. Medios de cultivo y soluciones	46
Anexo B. Actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo	49
Anexo C. Origen y características de las muestras de suelo	50
Anexo D. Tablas de colores	53
Anexo E. Caracterización colorimétrica – código binario	59
Anexo F. Porcentaje de similitud y número de nucleótidos diferentes entre actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo y varias especies tipo del género <i>Streptomyces</i>	60
Anexo G. Secuencia parcial del gen ADNr 16s correspondiente a actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de algunos actinomicetes rizosféricos y sus funciones a las plantas	10
Tabla 2. Comparación de procedimientos de varios métodos moleculares	11
Tabla 3. Origen de Muestras	15
Tabla 4. Códigos de Colores	16
Tabla 5. Mezcla para reacción de PCR	18
Tabla 6. Primers de oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR y secuenciación del gen ADNr 16S	18
Tabla 7. Condiciones para PCR	19
Tabla 8. Caracterización por grupos de color	22
Tabla 9. Concentración de ADN de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo	23
Tabla 10. Concentración de productos amplificados por PCR de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo	25
Tabla 11. Identificación de géneros y especies de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo	26
Tabla 12. Agrupación según la identificación molecular	27
Tabla 13. Cepas asociadas a <i>Streptomyces sannanensis</i>	28
Tabla 14. Cepas asociadas a <i>Streptomyces olivochromogenes</i>	28
Tabla 15. Cepas asociadas a <i>Streptomyces griseus/flavogriseus</i>	29
Tabla 16. Cepas asociadas a <i>Streptomyces fildesensis</i>	30
Tabla 17. Diámetros de inhibición en milímetros (mm) frente a microorganismos de control	49
Tabla 18. Arena Antártida 2010	50
Tabla 19. Suelo Antártida 2010	50
Tabla 20. Arena Antártida 2011	50
Tabla 21. Suelo Antártida 2011	51
Tabla 22. Arena Antártida 2012	51
Tabla 23. Suelo Antártida 2012	51
Tabla 24. Suelo Chimborazo <4500 msnm	52
Tabla 25. Suelo Chimborazo >4500 msnm	52
Tabla 26. Características físico-químicas de las muestras medioambientales	52
Tabla 27. Caracterización macroscópica agar avena – Código binario	59

Tabla 28. Caracterización macroscópica agar GYM – Código binario	59
Tabla 29. Porcentaje de similitud y número de nucleótidos diferentes entre actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo y varias especies tipo del género <i>Streptomyces</i>	60
Tabla 30. Secuencia parcial del gen ADNr 16S correspondiente a actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol Filogenético Universal. Construido a partir de la comparación de las secuencias de los ARNr 16S y 18S	7
Figura 2. Relación intraclase de Actinobacterias, muestra la presencia de seis órdenes, así como los 10 subórdenes de Actinomicetes basados en la comparación de secuencias ADNr/ARNr 16S	8
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico extraído de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo	24
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR de la región 16S de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo	25
Figura 5. Análisis filogenético de las dieciséis especies aisladas de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo	35

## RESUMEN

La caracterización molecular de dieciséis cepas de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de suelo y arena del archipiélago Islas Shetland del Sur de Antártida y el suelo del páramo del Chimborazo, capaces de producir compuestos bioactivos, formó cinco grupos-especie comparando el porcentaje de similitud y el número de nucleótidos diferentes con varias especies del género *Streptomyces*. Diez cepas pertenecen a *Streptomyces fildesensis* GW25-5<sup>T</sup> (DQ408297), tres cepas a *Streptomyces griseus* ISP 5236<sup>T</sup> (AY094371)/*Streptomyces flavogriseus* DSM 40323<sup>T</sup> (AJ494864), una cepa a *Streptomyces olivochromogenes* DSM 40451<sup>T</sup> (AY094370) y las últimas dos cepas a *Streptomyces sannanensis* NBRC 14239<sup>T</sup> (AB184579). Es notable que los tres grupos multi-miembros mostraran microorganismos que fueron recuperados de los dos ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo. Esto podría representar evidencia de la adaptación evolutiva de los individuos que pertenecen a una misma especie, a las mismas condiciones ambientales, separados miles de kilómetros uno del otro. En cualquier caso, queda por resolver cómo estos microorganismos llegaron a lugares geográficos opuestos y prosperaron en las condiciones ambientales similares.

**Palabras clave:** ADNr 16S, Identificación molecular, Extracción de ADN, *Streptomyces*, Ecosistemas glaciares, Análisis filogenético.

## ABSTRACT

The molecular characterization of sixteen actinomycete strains isolated from glacier ecosystems of soil and sand from the South Antarctic Shetland Islands and soil from Mount Chimborazo, capable of producing bioactive compounds, formed five species-groups by comparing the percentage of similarity and the number of different nucleotides with several type species of the genus *Streptomyces*. Phylogenetic analyses showed that ten strains belong to *Streptomyces fildesensis* GW25-5<sup>T</sup> (DQ408297), three to *Streptomyces griseus* ISP 5236<sup>T</sup> (AY094371)/*Streptomyces flavogriseus* DSM 40323<sup>T</sup> (AJ494864), one to *Streptomyces olivochromogenes* DSM 40451<sup>T</sup> (AY094370) and the last two strains were closed to *Streptomyces sannanensis* NBRC 14239<sup>T</sup> (AB184579). It is remarkable that the three-multimembered groups showed individuals that were recovered from both Antarctic and Equatorial glacier ecosystems. This could represent evidence of adaptative evolution of individuals that belong to the same species, the same environmental conditions, thousands of kilometers apart from each other. In any case, it remains to be solved how these microorganisms reached to opposite geographical locations and thrived under the similar environmental conditions.

**Key words:** 16S rRNA, Molecular identification, DNA extraction, *Streptomyces*, Glacier ecosystems, Phylogenetic analysis.

## INTRODUCCIÓN

El continente antártico posee las condiciones climáticas más difíciles de la Tierra, lo que limita la diversidad biológica en comparación con otros ecosistemas. Sin embargo, los ecosistemas de la Antártida, representan una oportunidad para la vida (Camacho & Fernández-Valiente, 2005).

Al ser el continente más frío y seco del planeta, representa un área importante para la ciencia. Lo que recibe una atención creciente debido al cambio climático que se produce por efecto de la destrucción de la capa de ozono que se encuentra sobre ella. Además proporciona información relevante sobre la evolución y adaptación de los organismos a ambientes extremos (Carrión, 2014).

Recientemente se han realizado numerosas investigaciones sobre la taxonomía bacteriana basada en el aislamiento y clasificación de nuevos microorganismos de origen antártico a partir de muestras de sedimentos, aguas y lodos (Carrión, 2014).

Los actinomicetes son bacterias Gram positivas que tienen un alto contenido de G+C en su ADN (>55 %). Son fenotípicamente diversos y se encuentran en la mayoría de ecosistemas naturales, pudiendo ser aislados del suelo, agua y material vegetal; muchos de ellos producen una amplia variedad de metabolitos secundarios utilizados en medicina y agricultura. Al tener varios usos en el campo de la biotecnología, tienen una particular importancia en la producción de antibióticos de uso humano y veterinario, ya que inhiben el crecimiento o destruyen otros microorganismos. Generalmente, estos antibióticos son producidos en bajas concentraciones en etapas específicas durante el ciclo de crecimiento, no son esenciales para el crecimiento del actinomicete pero le garantizan una ventaja de supervivencia en el ecosistema natural (Krsek *et al.*, 2000).

Los avances en las técnicas de secuenciación de ADN han permitido obtener secuencias de genomas completos de organismos vivos. Los rangos de genomas bacterianos tienen un tamaño desde 0,5 hasta al menos 10 Mb ( $1 \times 10^6$  pares de bases) y están compuestos por aproximadamente 90 % de regiones codificantes, lo que es de gran importancia para el descubrimiento de nuevas especies (Dougherty, 2000).



Las técnicas moleculares para la detección y caracterización de los microorganismos han revolucionado la microbiología de diagnóstico y ahora forman parte de procesamiento de muestras de rutina; en la que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido la líder, al permitir la detección rápida de microorganismos que anteriormente eran difíciles o imposibles de detectar por métodos microbiológicos tradicionales (Speers, 2006).

El presente trabajo supone un estudio sobre la diversidad de actinomicetes asociados a ecosistemas glaciares aislados de la Antártida y del Chimborazo. Se realizó también un análisis filogenético para determinar las relaciones evolutivas entre estos microorganismos y clasificarlos biológicamente. Además, se contó con un trabajo previo que proporcionó información que dichos actinomicetes poseen actividad antimicrobiana que pueden ser útiles para procesos biotecnológicos.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1. Tema De Investigación

Caracterización Molecular de Actinomicetes Provenientes de Ecosistemas Antárticos.

### 1.2. Justificación

La búsqueda de compuestos bioactivos producidos por microorganismos se ha convertido en una de las prioridades en el campo de la biotecnología. En este caso, se hará énfasis en los actinomicetes debido a la producción de metabolitos secundarios, algunos con un alto potencial en actividad biológica (Vinueza & Rodríguez, 2010).

Las utilidades que se pueden obtener a partir de microorganismos, tienen una gran aplicación en biotecnología para ayudar a un desarrollo sostenible, lo que permite que sean factibles en un desarrollo técnico y científico, brindando beneficios tangibles, como seguridad ambiental, favoreciendo así a la socioeconomía incentivando el empleo de recursos genéticos. (Montaño *et al.*, 2010).

Los actinomicetes juegan un papel significativo en la producción de agentes antimicrobianos y otras sustancias con importancia a nivel industrial como enzimas; es esencial tener un buen conocimiento sobre su taxonomía y ecología para la exploración máxima, al ser de gran utilidad para el desarrollo económico e industrial (Adegboye & Babalola, 2012).

Un factor que ha influido significativamente en la comercialización de nuevos antibióticos por parte de la industria farmacéutica ha sido el lento desarrollo de los mismos, por lo que la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana producidos por microorganismos se ha constituido como una alternativa viable, encontrándose poblaciones únicas capaces de producir nuevas sustancias antagonistas (Gavilánez & Rodríguez, 2013).

Los resultados que se alcanzarán en este proyecto de investigación, serán una base para identificar nuevas/existentes especies de actinomicetes, con rutas metabólicas especiales que permitan el estudio de compuestos bioactivos (Gavilánez & Rodríguez, 2013).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

- Determinar la diversidad molecular de actinomicetes con potencial para biocontrol de microorganismos fitopatógenos.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Separar los actinomicetes mediante grupos de color.
- Identificar molecularmente los actinomicetes.
- Describir taxonómicamente las especies encontradas.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Antecedentes Investigativos**

##### **2.1.1. Biodiversidad microbiana en la Antártida**

El ecosistema de la Antártida es altamente endémico, donde la biodiversidad y abundancia de grupos taxonómicos se diferencian de los encontrados en cualquier otra parte del planeta. Tales características son el resultado de la evolución en un ambiente cada vez más extremo (Rogers, 2007).

La adaptación de los microorganismos a condiciones ambientales extremas los obliga a desarrollar componentes celulares y estrategias bioquímicas únicas, lo que les permite sobrevivir y proliferar a bajas temperaturas; esto implica que han superado barreras importantes para adaptarse a ecosistemas permanentemente fríos, como los que se encuentra en la Antártida (Garzón & Rodríguez, 2013).

Los microorganismos psicrófilos y psicrótrofos en los ambientes antárticos presentan estrategias de adaptación al frío que resultan interesantes por su aplicación en la industria biotecnológica; por ejemplo, en el área alimenticia, como aditivos, o la producción de fármacos y detergentes (Comerio *et al.* (2007); Castillo *et al.* (2005)).

##### **2.1.2. Biodiversidad microbiana en los Páramos Andinos.**

En las zonas tropicales de las Américas, el ecosistema de páramo se distribuye de forma discontinua entre latitudes 11 °N y 8 °S. Se concentra en el extremo noroeste de América del Sur, sobre todo en Venezuela, Colombia y Ecuador, y en menor proporción en Costa Rica, Panamá, y el norte de Perú. Los páramos de Colombia y norte de Ecuador se ven influidos por la convergencia intertropical de masas de aire (un canal de baja presión); debido a su ubicación geográfica cerca de la zona ecuatorial. Por lo general, son húmedos todos o la mayoría de los meses del año de forma continua por lluvia, nubes, niebla y, sobre todo debido a la elevación orográfica causada por Los Andes (Luteyn, 1999).

### **2.1.3. Generalidades de los actinomicetes**

#### **2.1.3.1. Rol Ecológico**

Los actinomicetes están ampliamente distribuidos en varios ecosistemas, entre los que se incluyen los marinos, terrestres y acuáticos. El principal reservorio de este grupo de bacterias filamentosas es el suelo, donde juegan un papel crucial en el reciclaje de los biomateriales producto de la descomposición y son responsables de la formación de humus (Goodfellow & Williams (1983); Stach & Bull (2005)).

La distribución de los diferentes géneros de actinomicetes dependen del tipo de suelo, asociados principalmente al contenido de materia orgánica y pH (Alexander (1977); Araragi (1979)).

Estos microorganismos juegan un papel ecológico importante en la mineralización de los nutrientes en el suelo ayudando a su reciclaje mediante la degradación de materia orgánica en el suelo, encontrándose más comúnmente en compost. Además, actúan como promotores del crecimiento vegetal, ayudando en la fijación de nitrógeno, solubilizando e inmovilizando nutrientes, como control biológico y mantenimiento en la estructura del suelo (Kekuda *et al.* (2010); Macagnan *et al.* (2008); Rascio *et al.* (2008); Vargas Gil *et al.* (2009)).

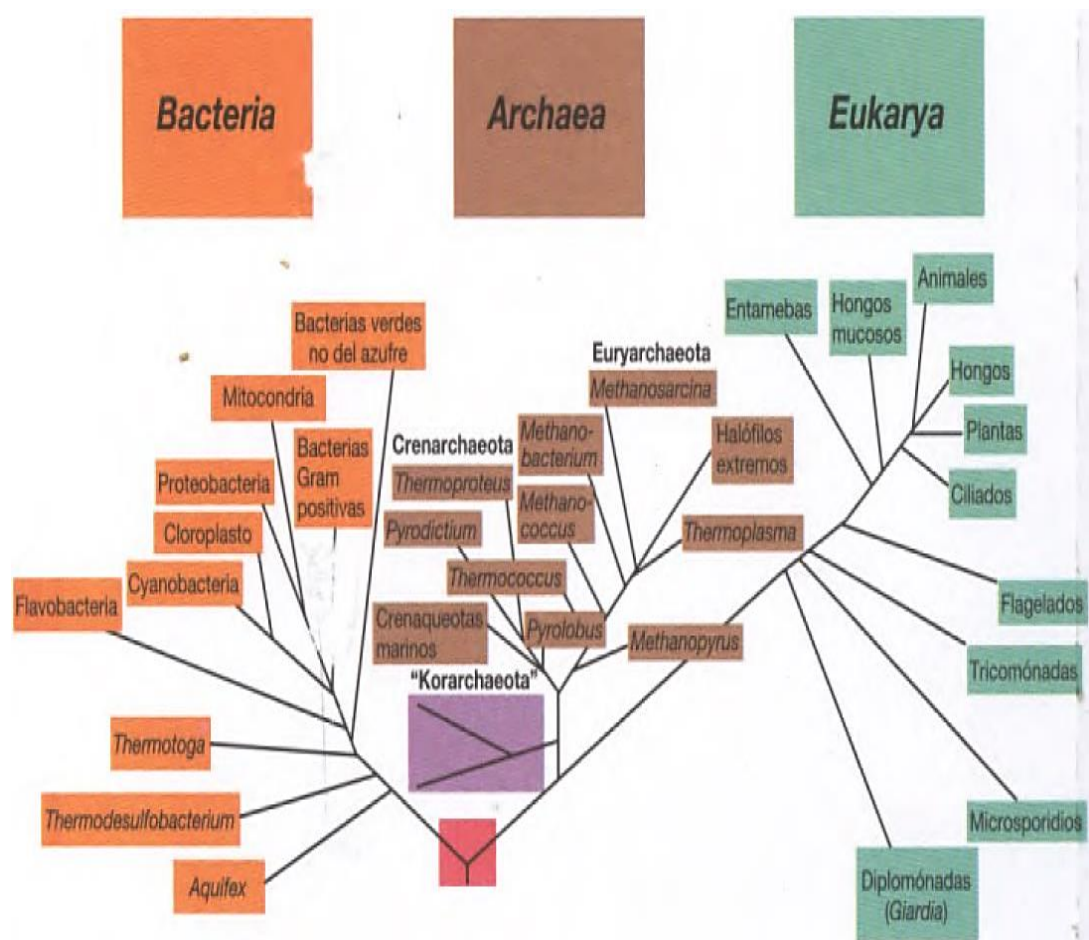
#### **2.1.3.2. Taxonomía**

Microbiólogos de inicio del siglo XX como Drechsler (1918) aseveraban que los actinomicetes eran una conexión intermedia entre las bacterias y los hongos. Este tipo de afirmaciones erróneas se basaban en el hecho de que tanto actinomicetes como hongos comparten características morfológicas como la formación de hifas, micelio y esporas, sin embargo, la demostración que los actinomicetes tienen una naturaleza procariota y los avances en biología molecular se expusieron en el árbol universal de la vida (Figura 1), los mismos que permitieron establecer que los actinomicetes se encuentran dentro del dominio *Bacteria* (Rodríguez, 2004).

Los actinomicetes están filogenéticamente agrupados como bacterias Gram positivas con alto contenido de guanina-citosina en su material genético, perteneciendo al orden *Actinomycetales* que comprende 14 subórdenes, 49 familias y más de 140 géneros (Figura 2). Son morfológicamente diversos y van desde bacilos a cocos, fragmentando formas de hifas

con un micelio ramificado altamente diferenciado. Muchos actinomicetes también producen esporas externas, con una composición de la pared celular de valor taxonómico significativo que permite la diferenciación entre subórdenes (Adegboye & Babalola (2012); Berd (1973); Trujillo (2008)).

Hay cuatro tipos de paredes celulares que se distinguen en base a las características de composición y estructura de peptidoglicano, como son el tipo de aminoácidos en posición lateral tetrapéptido de cadena 3, la presencia de glicina en puentes interpeptídicos, y el contenido de azúcar de peptidoglicano (Willey *et al.*, 2010).



**Figura 1. Árbol Filogenético Universal. Construido a partir de la comparación de las secuencias de los ARNr 16S y 18S.** Se observan los tres dominios de seres vivos: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*. La distancia evolutiva entre dos grupos de organismos es proporcional a la suma de las distancias desde el final de las ramas hasta el punto donde se unen los dos grupos.

**Fuente. (Madigan *et al.*, 2003).**

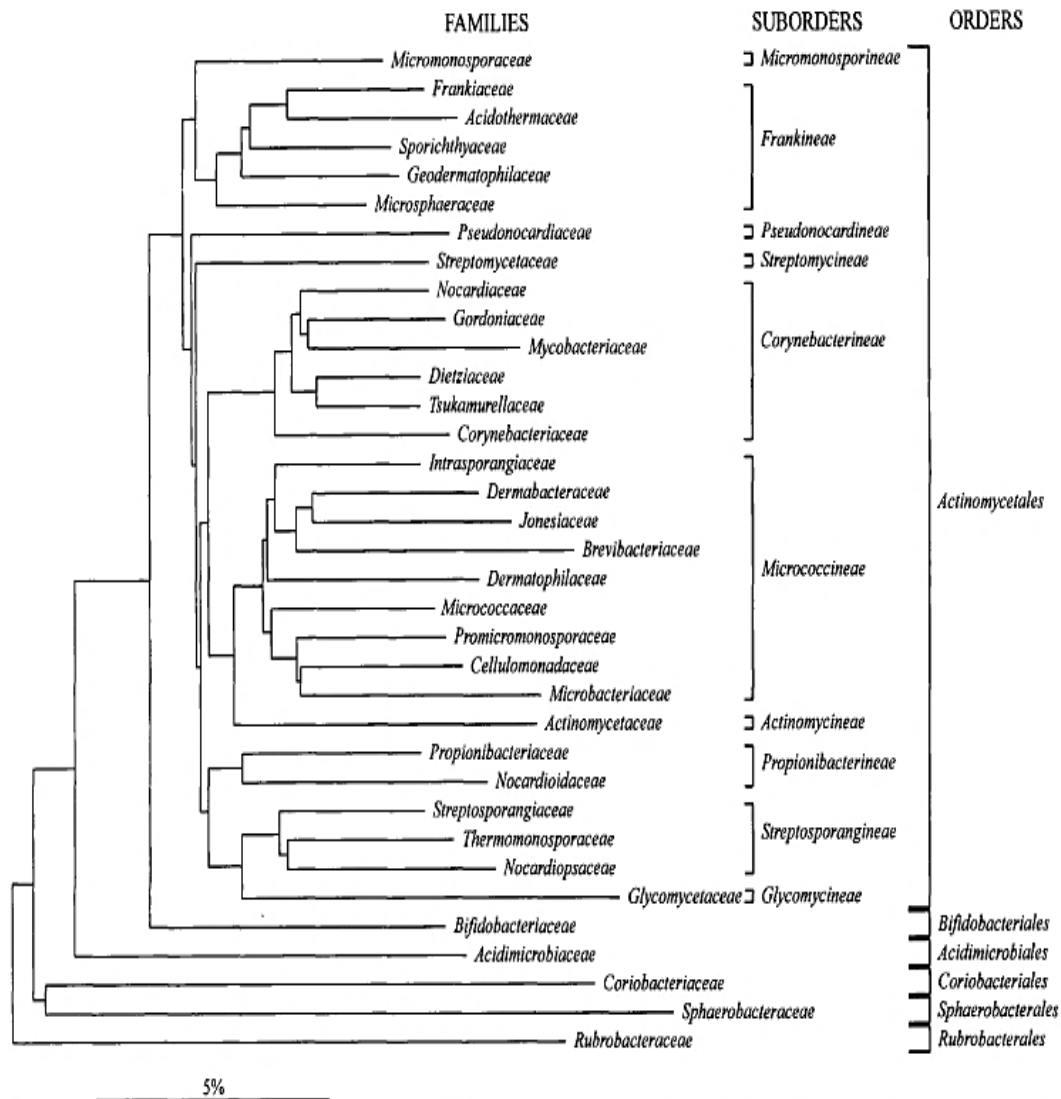


Figura 2. Relación intraclasses de Actinobacterias, muestra la presencia de seis órdenes, así como los 10 subórdenes de Actinomycetes basados en la comparación de secuencias ADNr/ARNr 16S. La relación filogenética de las familias de la clase Actinobacteria se perfila. La barra de escala representa 5 sustituciones de nucleótidos por cada 100 nucleótidos.

Fuente. (Stackebrandt *et al.*, 1997).

Las técnicas modernas que se han aplicado a la taxonomía de actinomicetes son las comparaciones de las secuencias de 16S rRNA que han demostrado tener valiosos resultados (Zhi *et al.*, 2009).

El patrón de firmas de ARNr 16S consta de los nucleótidos en las posiciones 184: 193 (A-C), 195 (A), 196 (U), 582: 758 (U-A), 601: 637 (G-U), 602: 636 (C-G), 841 (C), 952: 1229 (U-A), 986: 1219 (A-U), 1059: 1198 (C-G) y 1308: 1329 (C-G) (Zhi *et al.*, 2009). En base a los datos de composición molecular y químicas, los actinomicetes se agrupan en 14 subórdenes, siendo: *Actinomycineae*, *Actinopolysporineae*, *Catenulisporineae*, *Corynebacterineae*,

*Frankineae, Glycomycineae, Jiangellineae, Kineosporineae, Micrococineae, Micromonosporineae, Propionibacterineae, Pseudonocardineae, Streptomycineae y Streptosporangineae* (Euzéby, 1997).

#### **2.1.4. Importancia Biotecnológica**

Los microorganismos ofrecen un sinnúmero de metabolitos secundarios para sondear enzimas, antibióticos, antioxidantes, citotóxicos entre otros (Gurung *et al.* (2009); Singh & Pelaez (2008); Williams (2009)). La diversidad de actinomicetes tiene impacto excepcional en varias áreas de la industria farmacéutica, médica y agrícola, sobre todo, en la producción de antibióticos (Blodgett *et al.*, 2010), además poseen la capacidad de producción de geosmina, el compuesto responsable del olor de suelo labrado (Kieser *et al.*, 2000), y de moléculas biosurfactantes, que son agentes activos de la superficie sintetizadas por las células microbianas (Gandhimathi *et al.*, 2009).

##### **2.1.4.1. Para uso humano**

Los grupos más comunes de los actinomicetes tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios con actividades biológicas como anticancerígenos, antibióticos, antivirales, antifúngicos, enzimas, inmunosupresores y otros compuestos industrialmente beneficiosos (Baltz (2007); Kekuda *et al.* (2010); Naine *et al.* (2011)). Algunos se utilizan como ingredientes activos dentro de la categoría de alimentos funcionales debido a sus propiedades probióticas como la protección contra ciertos patógenos a través del proceso de exclusión competitiva, la actividad hidrolasa de sales biliares, la modulación inmune, y la capacidad de adherirse al moco o el epitelio intestinal (Liévin *et al.* (2000); Ouwehand *et al.* (2002); Stanton *et al.* (2005)).

También exhiben diversas propiedades fisiológicas y metabólicas, tales como la producción de enzimas extracelulares (Schrempf, 2001).

##### **2.1.4.2. Para uso en agricultura**

En la ecología del suelo, los actinomicetes son utilizados para biorremediación como biofertilizantes para control biológico de plagas y como promotores del crecimiento vegetal, haciéndolos indispensables en la práctica agrícola (Adegboye & Babalola, 2012). Son los microbios del suelo más prominentes y crecen en estrecha asociación con los órganos de la



planta, forman filamentos filiformes en la tierra, lo que les da una ventaja en la colonización de la rizosfera como rizobacterias, influyendo en el crecimiento de las plantas antagonizando patógenos y haciendo que los nutrientes estén disponibles para las mismas (Shimizu, 2011).

Varios informes han demostrado que los actinomicetes son uno de los grupos importantes de microorganismos que colonizan las raíces como se observa en la Tabla 1 (Franco-Correa *et al.* (2010); Nimnoi *et al.* (2010)).

**Tabla 1. Ejemplos de algunos actinomicetes rizosféricos y sus funciones a las plantas**

<b>Actinomicetes Rizosféricos</b>	<b>Función</b>	<b>Especies de Plantas</b>	<b>Referencias</b>
<i>Micromonospora endolithica</i>	Solubilización de fosfato para promover el crecimiento de plantas	Frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	(El-Tarabili <i>et al.</i> , 2008)
<i>Streptomyces griseus</i>	Protección contra la enfermedad de amortiguación causada por <i>Pythium ultimum</i>	Trigo ( <i>Triticum</i> spp.)	(Hamdali <i>et al.</i> , 2008)
<i>Frankia</i> spp.	Fijación biológica de nitrógeno	Planta actinorrícicas ( <i>Casuarina equisetifolia</i> )	(Rascio <i>et al.</i> , 2008).
<i>Nocardia levis</i>	Control biológico de marchitamiento producido por <i>Fusarium oxysporum</i>	El sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> )	(Kavitha <i>et al.</i> , 2010)
<i>Streptomyces</i> spp.	Biocontrol contra <i>Rhizoctonia solani</i>	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	(Patil <i>et al.</i> , 2011)
<i>Streptomyces</i> spp.	Biorremediación de suelos contaminados	Maíz ( <i>Zea mays</i> )	(Benimeli <i>et al.</i> , 2008)

Fuente. (Adegboye & Babalola, 2012).

## 2.1.5. Identificación Molecular de Actinomicetes

### 2.1.5.1. Técnicas moleculares que se usan para identificar actinomicetes

Existen varios métodos genotípicos para identificación molecular utilizados para el secuenciamiento de ADN como se detallan en la Tabla 2 (Olive & Bean, 1999).

**Tabla 2. Comparación de procedimientos de varios métodos moleculares**

PFGE	RFLP	REP-PCR	RAPD	CFLP	AFLP	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 proteinasa	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 en 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).

### 2.1.5.2. Aislamiento de ADN

Los pasos básicos en el aislamiento de ADN implican la ruptura celular o lisis por el tratamiento con detergentes, la eliminación de las proteínas celulares ya sea por digestión enzimática con una proteasa o extracción con fenol-cloroformo y precipitación del ADN por una mezcla de etanol y sal. El ADN precipita como un material fibroso que se puede recoger y se purifica adicionalmente por digestión enzimática selectiva de cualquier ARN contaminante que pueda haber coprecipitado durante el proceso de aislamiento. La presencia de detergentes, agentes quelantes de metales divalentes y proteasas estables, tales como proteinasa K durante el proceso de aislamiento, impide cualquier hidrólisis de ADN por las nucleasas celulares y garantiza el aislamiento de ADN intacto (Mitra, 2003).

### 2.1.5.3. PCR 16S

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica científica en biología molecular para amplificar una sola o unas pocas copias de un fragmento de ADN a través de varios órdenes de magnitud, por lo que genera de miles a millones de copias de una secuencia de ADN particular. Fue desarrollada en 1984 por el bioquímico estadounidense Kary Mullis. Sin embargo, el principio básico de reproducir una pieza de ADN utilizando dos primers ya había sido descrita anteriormente por Gobind Khorana en 1971 (Bartlett & Stirling, 2003).

Una mezcla típica de reacción de PCR consiste en una plantilla de ADN, un par de primers específicos, cuatro desoxirribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), enzima ADN polimerasa termoestable, el búfer apropiado y cloruro de magnesio como cofactor. Los ciclos de reacción de PCR consisten en la desnaturalización térmica del templete de ADN, seguido por la hibridación de los primers específicos a las cadenas de ADN complementarias en direcciones opuestas y elongación de la cadena de ADN por la enzima. Estos ciclos se repiten exponencialmente, alrededor de 30 a 40 ciclos (Mitra, 2003).

### 2.1.5.4. Análisis Filogenético de Actinomicetes

La clasificación de actinomicetes se basó originalmente en gran medida en las observaciones morfológicas y características fisiológicas (Shirling & Gottlieb, 1966), por lo que la primera clasificación formal se dio en 1943 por Waksman y Henrici, al considerar dichos microorganismos como un puente evolutivo entre bacterias y hongos. Transcurrieron varias décadas considerando a este grupo microscópico como parte del reino *Fungi* debido a su similitud morfológica. Su nombre proviene del griego *actis*: rayo de sol y *mykes*: hongo, por lo que dada su forma era fácil denominarlos “hongos radiados” (Soler Hernández, 2012).

Posteriormente se propone que pertenecen a la clase *Actinobacteria* y tienen su origen en tres fuentes. Primero, el establecimiento de quimiotaxonomía que detecta diferencias en la composición química celular como peptidoglicano, lípidos polares y ácidos grasos, quinonas isoprenoides, citocromos, y la composición de bases de ADN. Segundo, la introducción de los experimentos de reasociación de ADN-ADN que miden las similitudes netas entre el ADN de una sola hebra de cepas de especies estrechamente relacionadas. Tercero, la determinación de las secuencias similares de ARNr y ADNr 16s (Stackebrandt *et al.*, 1997).

Para establecer la adecuada caracterización de estos microorganismos y lograr identificar el género e incluso especie, es necesario el uso de herramientas como la microscopia de luz para determinar cada uno de los aspectos descritos anteriormente, además, estudios fisiológicos para determinar el tipo de peptidoglicano, realizar de pruebas de correlación de la composición de la pared celular y, a nivel molecular mediante el análisis del contenido y relación de guanina-citosina presente en el ADN. Principalmente, las técnicas moleculares han aportado al avance en la clasificación bacteriana en la actualidad y los diferentes métodos de clasificación han surgido debido a la gran variedad dentro de la familia *Actinomycetaceae*, especialmente dentro del género *Streptomyces*, el cual difiere mucho en su morfología, fisiología, bioquímica y actividades como productores de antibióticos (González, 2010).

## **2.2. Hipótesis**

### **2.2.1. Hipótesis Nula ( $H_0$ )**

No existe diversidad molecular de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciales con potencial uso como agentes de biocontrol.

### **2.2.2. Hipótesis Alternativa ( $H_1$ )**

Existe gran diversidad molecular de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciales con potencial uso como agentes de biocontrol.

## **2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis**

- Aislamiento y purificación de ADN genómico
- Cuantificación de ADN genómico por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa
- Secuenciamiento de los productos de amplificación del ADNr 16S para la identificación de géneros y especies de actinomicetes.

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Recuperación, Purificación y Almacenamiento de Microorganismos**

Los dieciséis actinomicetes que se utilizaron en este trabajo fueron aislados por Villacís & Rodríguez (2015) en cuatro tipos de agar: Agar Arginina con Vitaminas (AAV), Agar Almidón Caseína (AAC), Agar GYM y Agar Agua de Llave (Anexo A). Cada uno suplementado con nistatina a una concentración de 75 µg/mL y ajustando su pH a 7. En el Anexo B se muestra la identificación en cuanto al potencial para biocontrol de microorganismos fitopatógenos realizado por Villacís & Rodríguez (2015). Los actinomicetes se recibieron en viales como suspensión de esporas y biomasa en una solución de glicerol al 20 % y fueron conservados a -20 °C, aislados de muestras de arena y suelo de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo por Villacís & Rodríguez (2015). Se detalla el origen de cada muestra compuesta en el Anexo C. Las características físico-químicas de las muestras de suelo se describen en la Tabla 26 (Anexo C) donde se refieren los valores de pH, conductividad eléctrica (µS), humedad (%) y materia orgánica (%) de cada una de las muestras de suelo y arena de la Antártida, y de suelo de páramo del norte del Chimborazo. Una vez en el laboratorio, se transfirieron 100 µL de cada suspensión a platos de Petri en agar extracto de malta y levadura (GYM) y en agar avena (Anexo A) y se inocularon mediante estría compuesta incubándolos a 20 °C por 8 días.

Una vez crecidos los actinomicetes, se verificó la pureza de los cultivos y aquellos puros fueron almacenados en glicerol (20 %), y recodificados (Tabla 3) para mantenerlos a largo plazo en un congelador a -20 °C.

**Tabla 3. Origen de Muestras**

<b>CÓDIGO RECIBIDO</b>	<b>CÓDIGO ASIGNADO</b>	<b>ORIGEN</b>
CA1.029	JD029	Suelo del Chimborazo a <4500 msnm
CA2.040	JD040	Suelo del Chimborazo a >4500 msnm
CA2.041	JD041	Suelo del Chimborazo a >4500 msnm
CA2.049	JD049	Suelo del Chimborazo a >4500 msnm
CA2.050	JD050	Suelo del Chimborazo a >4500 msnm
CA2.053	JD053	Suelo del Chimborazo a >4500 msnm
CA2.054	JD054	Suelo del Chimborazo a >4500 msnm
DW015	JV015	Suelo Antártida 2011
DW019	JV019	Suelo del Chimborazo a <4500 msnm
DW022	JV022	Suelo del Chimborazo a <4500 msnm
DW029	JV029	Suelo del Chimborazo a >4500 msnm
DW034	JV034	Suelo Antártida 2010
DW036	JV036	Suelo Antártida 2011
DW039	JV039	Arena Antártida 2012
DW043	JV043	Suelo del Chimborazo a <4500 msnm
S10.013	JD013	Suelo Antártida 2010

**Fuente. Adaptación de Villacís & Rodríguez (2015)**

### **3.2. Grupos de Color**

Los colores del micelio aéreo, esporas y pigmento difusible fueron determinados usando las tablas estándar de colores ACRILEX® y British Standard Specification of Colours for Identification Coding and Special Purposes (Anexo D). Aquellos actinomicetes que presentaron características cromáticas similares fueron ubicados en un mismo grupo de color. En la Tabla 4 se detallan los códigos de los colores para su mejor identificación.

**Tabla 4. Códigos de Colores**

<b>COLOR</b>	<b>CÓDIGO</b>
Light brown 320 (410)	Lbr
Manilla 367	Man
Primrose 310	Prm
Pale cream 352	Pcr
Amarillo Limón 504	Ali
Biscuit 369	Bis
Light stone 361	Lst
Light buff 358	Lbf
Light straw 384	Lsw
Deep cream 353	Dcr
Service brown 499	Sbr
Incoloro 500	Inc
Camouflage beige 389	Cbg
Marfil 529	Mar
Vellum 365	Vel
Blanco 519	Bla
Plata 533	Plt
Rosa 537	Ros

**Fuente. (Villacís & Rodríguez, 2015)**

### **3.3. Extracción de ADN Genómico**

Se inoculó cada muestra de micelio de actinomicetes encima de una membrana de nitrato de celulosa de 0,2 µm de diámetro de poro colocada sobre la superficie de agar no esporulante (Anexo A) por 6 días a 20 °C. Posterior a eso se transfirió suficiente biomasa mediante el uso de puntas estériles a un tubo de centrifugación de 1,5 mL con 0,05 g de microesferas de vidrio (106 µm de diámetro), se añadió 400 µL de búfer de extracción (Anexo A) y se agitó.

Las muestras se congelaron a -20 °C por 24 horas, se descongelaron a temperatura ambiente y fueron agitados utilizando un vórtex Labnet S0200 por 10 minutos seguido de centrifugación a máxima velocidad (15000 rpm) por 20 minutos y se transfirieron 200 µL del sobrenadante a un nuevo tubo estéril de 1,5mL junto con 200 µL (v/v) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitaron los tubos manualmente hasta que se homogenizó el contenido formando una solución blanquecina, y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos; se transfirieron 150 µL del sobrenadante a un nuevo tubo de centrifugación de 1,5 mL. El ADN se precipitó añadiendo 150 µL (v/v) de etanol (100%, 4°C), formando fibras blanquecinas. Los tubos con ADN se centrifugaron a 15000 rpm por 20 minutos y se descartó el sobrenadante teniendo cuidado de no perder el ADN precipitado en la base del tubo. El

ADN se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de etanol (70%, 4°C), y fue centrifugado a 15000 rpm por 15 minutos más, descartando el sobrenadante. Este lavado 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 – 4 horas, hasta que el olor a etanol desapareció. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 40  $\mu\text{L}$  de búfer TE 1X (Anexo A).

### **3.4. Determinación de la concentración y pureza del ADN genómico extraído**

La cuantificación de la cantidad de ADN presente en las muestras se realizó utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Nanodrop 2000) escogiendo el programa ácidos nucleicos-ADN el cual está calibrado para permitir la determinación de la concentración del ADN genómico obtenido para los aislados de actinomicetes estudiados. Se cargó el detector con 1  $\mu\text{L}$  de solución blanco (Búfer TE 1X) posteriormente se midió las concentraciones de cada una de las muestras de ADN genómico. Las concentraciones de ADN genómico medidas en el Nanodrop se expresaron en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (Cevallos & Rodríguez, 2014).

Dado que las soluciones de ADN absorben parcialmente la luz a 260 nm y las que contienen proteínas hacen lo propio a 280 nm, el cociente de los valores obtenidos a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260/280}$ ) proporcionaron una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes  $A_{260/280}$  respectivos del ADN puros son de 1,8 a 2,0 (Cevallos & Rodríguez, 2014).

### **3.5. Documentación de ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa (1 % p/v) en búfer 1X TBE (Anexo A). La agarosa y el búfer se fundieron en microondas (cada 20 segundos hasta lograr una solubilización completa evitando que llegue al punto de ebullición). Una vez que la temperatura descendió aproximadamente  $\pm 40^\circ\text{C}$  se añadió 1  $\mu\text{L}$  de 10000X SYBRsafe por cada 10 mL de gel de agarosa líquido y se agitó suavemente hasta que el coloide se tiñó de rosa pálido, se vertió en una bandeja para electroforesis y se colocó los peines respectivos cuidando tener suficientes pocillos de acuerdo al número de muestras más dos extra en cada fila para el marcador molecular. Una vez que el gel solidificó, se lo colocó en una cámara de electroforesis (Labnet E1010-10) asegurándose que los pocillos se encuentren del lado del ánodo (extremo negro de la cámara de electroforesis).

Se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra de ADN genómico con 2  $\mu\text{L}$  de búfer de cargado (Invitrogen) en un plato multiwell (Eppendorf) y se cargó cada pocillo con 7  $\mu\text{L}$  de la mezcla



además de dos pocillos independientes con 5 µL de marcador molecular de 1000bp (Invitrogen). Se corrió el gel a 90 voltios, 200 mA por 1 hora y las bandas de ADN se visualizaron con la ayuda de luz azul del transiluminador Enduro™ GDS Touch. Las imágenes se capturaron, se editaron para una mejor visualización y se guardaron en formato .TIF mediante el software Enduro™ GDS Touch incluido en el equipo.

Se identificó un ADN genómico observado como una banda visible a poca distancia de los pocillos. Contaminaciones de carbohidratos y proteínas fueron observadas cuando un anillo se forma en los pocillos de cargado de las muestras. Finalmente, la cantidad de ADN fue considerada como adecuada cuando las bandas fueron claramente visibles.

### 3.6. Identificación Molecular

#### 3.6.1. Amplificación de los fragmentos de ADN 16S

El ADN genómico aislado fue utilizado como template para la amplificación de los fragmentos de ADNr 16S utilizando una reacción de PCR de 50 µL como se detalla en la Tabla 5. Se emplearon dos primers universales 27f y 1525r, especificándose las secuencias en la Tabla 6.

**Tabla 5. Mezcla para reacción de PCR**

Agua destilada	Hasta 50 µL
10X Taq búfer	5 µL
12,5mM dNTPs	0,8 µL
50mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µL
27f (20µM)	1,2 µL
1525r (20µM)	1,2 µL

Fuente. (Rodríguez, 2004).

**Tabla 6. Primers de oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR y secuenciación del gen 16S rRNA.**

Primer	Secuencia (5' – 3')*	Fuente
<b>27f</b>	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	Lane (1991)
<b>1525r</b>	5'-AAGGAGGTGTCCARCC-3'	Lane (1991)

\*Degeneraciones de acuerdo con Lane (1991): M= A/C, R = A/G, W = A/T.

Fuente. Adaptada de Rodríguez (2004).

Se preparó el máster mix en un tubo de centrifugación de 1,5 mL manteniendo en hielo y se dispensaron alícuotas de 49  $\mu$ L utilizando tubos de PCR de 0,5 mL. Se añadió 1  $\mu$ L de ADN genómico a cada tubo y se colocaron los tubos en un Termociclador BIORAD T100 previamente configurado. Después de una primera etapa de desnaturalización a 94 °C durante 10 minutos (arranque en caliente), se mantuvo la temperatura a 80 °C para añadir 0,4  $\mu$ L de Taq polimerasa a cada tubo de reacción y se utilizaron las siguientes condiciones (Tabla 7).

**Tabla 7. Condiciones para PCR**

		°C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial		94	10'	1
Hold		80	$\infty$	
Activación Taq Polimerasa		94	2'	1
Amplificación	Desnaturalización	94	1' 30"	35
	Alineamiento	48	1' 30"	
	Extensión	72	1'30"	
Extensión Final		72	10'	1
Hold		4	$\infty$	

Fuente. Adaptada de Rodríguez (2004).

Los productos de ADNr 16S fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa (1 % p/v) mediante el proceso indicado anteriormente. Añadiendo un marcador molecular de 100bp (Invitrogen) para confirmar el tamaño del gen (1,6kb).

### 3.6.2. Purificación y secuenciación de los productos de ADNr 16S PCR-amplificados

Los productos de las reacciones ADNr 16S fueron purificados utilizando PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen, USA) y directamente enviados a secuenciar a través de la empresa MacroGen USA, la cual utiliza el equipo Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer. Para las reacciones de secuenciación se utilizaron los mismos primers que para la amplificación por PCR (27f y 1525r).

### 3.6.3. Alineamiento y análisis filogenético

El alineamiento y análisis filogenético fue realizado en función de lo que Ruiz (2013) reportó, donde la secuencia parcial del gen del ADNr 16S obtenida fue alineada manualmente usando

la opción "pairwise alignment" y la información acerca de la estructura secundaria del programa para análisis filogenéticos PHYDIT desarrollado por Chun en 1995. Estas secuencias fueron comparadas con otras secuencias correspondientes a géneros relacionados identificados mediante la opción BLAST-N, disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y obtenidas de la base de datos del GenBank. Se obtuvo un árbol filogenético mediante "neighbour-joining", calculado mediante el algoritmo desarrollado por Jukes y Cantor en 1969. La topología de los árboles filogenéticos obtenidos fue evaluada usando el análisis de "bootstrap" desarrollado por Felsenstein en 1985. Los resultados fueron calculados con el algoritmo "neighbour-joining", basado en 1500 grupos de datos, usando el software TREECON desarrollado por Van Der Peer en 2001.

#### **3.6.4. Descripción taxonómica de las especies de actinomicetes identificadas molecularmente.**

Se tomó en referencia las características taxonómicas de los artículos técnicos en los que se describieron inicialmente las especies encontradas y se realizó una actualización de la información en función de los resultados encontrados en este estudio y en el de Villacís & Rodríguez (2015).

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.1. Análisis y discusión de los resultados**

##### **4.1.1. Separación en grupos de color**

Se encontraron 15 grupos de color, donde solamente dos cepas (JD040 y JV029), fueron ubicadas en un mismo grupo, al compartir características colorimétricas en los dos medios de cultivo. Los demás poseían características completamente diferentes por lo que se los ubicó individualmente como se detalla en la Tabla 8. Los datos originales de caracterización se encuentran descritos en código binario en el Anexo E.

Probablemente, cuando dos o más microorganismos comparten el mismo grupo de color poseen la misma tonalidad tanto en esporas, micelio aéreo y pigmento difusible, lo que indica que pueden pertenecer a una misma línea filogenética. Demostrando así que las variaciones morfológicas que puede presentar el mismo microorganismo en dos medios de cultivos totalmente diferentes se basa en la disponibilidad de nutrientes en cada medio. Este comportamiento está asociado únicamente a la caracterización morfológica macroscópica que están incluidos en cambios en la forma, margen, elevación y coloración de esporas, micelio aéreo y pigmento difusible mas no en la caracterización microscópica como en la forma de la cadena de esporas (Villacís & Rodríguez, 2015).

Además, existe una correlación directa de los medios de cultivo utilizados con la velocidad de formación de estructuras de resistencia únicas que presentan estos microorganismos. Visualmente, la producción de esporas en agar avena se dio antes que en agar GYM. Esto se puede explicar por los mecanismos metabólicos de emergencia que pueden ser activados en el momento en que el microorganismo detecta cambios o un descenso en la biodisponibilidad de elementos básicos para su crecimiento (Salazar *et al.*, 2014).

**Tabla 8. Caracterización por grupos de color**

Grupo de Color	Código	Medio de Cultivo	Color esporas	Color micelio aéreo	Color pigmento difusible
1	JD029	Avena	Blanco 519	Pale cream 352	Incoloro 500
		GYM	Blanco 519	Service brown 499	Light buff 358
2	JD040	Avena	Blanco 519	Blanco 519	Pale cream 352
	JV029				
	JD040	GYM	Blanco 519	Light brown 320 (410)	Light brown 320 (410)
	JV029				
3	JD041	Avena	Marfil 529	Plata 533	Incoloro 500
		GYM	Biscuit 369	Biscuit 369	Incoloro 500
4	JD049	Avena	Marfil 529	Manilla 367	Incoloro 500
		GYM	Marfil 529	Service brown 499	Light brown 320 (410)
5	JD050	Avena	Marfil 529	Blanco 519	Pale cream 352
		GYM	Service brown 499	Light brown 320 (410)	Light brown 320 (410)
6	JD053	Avena	Marfil 529	Rosa 537	Incoloro 500
		GYM	Marfil 529	Light stone 361	Light brown 320 (410)
7	JD054	Avena	Marfil 529	Manilla 367	Incoloro 500
		GYM	Marfil 529	Marfil 529	Light brown 320 (410)
8	JV015	Avena	Camouflage beige 389	Primrose 310	Incoloro 500
		GYM	Light straw 384	Camouflage beige 389	Incoloro 500
9	JV019	Avena	Marfil 529	Vellum 365	Pale cream 352
		GYM	Marfil 529	Light brown 320 (410)	Light stone 361
10	JV022	Avena	Blanco 519	Plata 533	Incoloro 500
		GYM	Plata 533	Plata 533	Light buff 358
11	JV034	Avena	Marfil 529	Vellum 365	Primrose 310
		GYM	Marfil 529	Light stone 361	Light brown 320 (410)
12	JV036	Avena	Marfil 529	Blanco 519	Deep cream 353
		GYM	Marfil 529	Light stone 361	Light brown 320 (410)
13	JV039	Avena	Vellum 365	Amarillo Limón 504	Primrose 310
		GYM	Vellum 365	Vellum 365	Pale cream 352
14	JV043	Avena	Marfil 529	Rosa 537	Biscuit 369
		GYM	Marfil 529	Service brown 499	Light brown 320 (410)
15	JD013	Avena	Biscuit 369	Marfil 529	Incoloro 500
		GYM	Light buff 358	Light buff 358	Light buff 358

Elaborado por. (Navas, 2016)

#### 4.1.2. Aislamiento y determinación de la concentración y pureza del ADN genómico

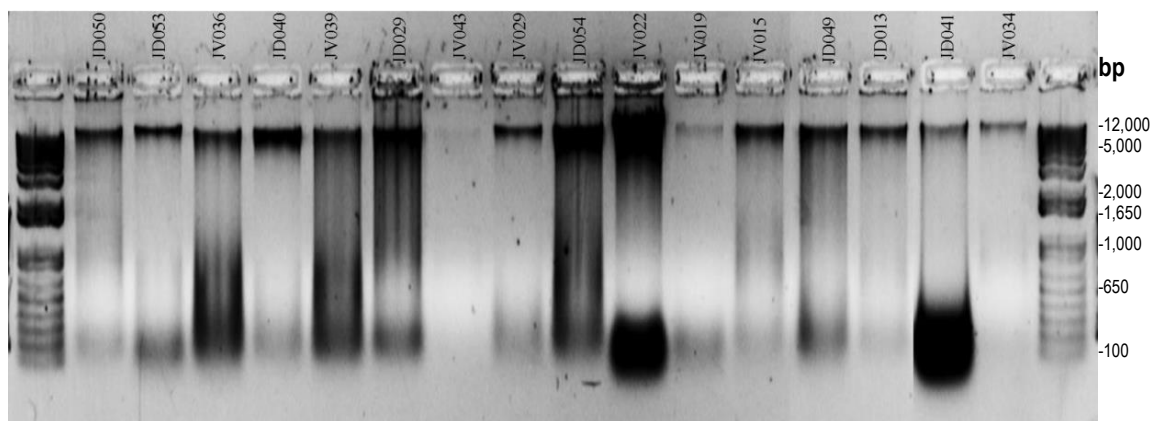
Se logró extraer ADN de los actinomicetes usados en el presente estudio. La Tabla 9 muestra los resultados de la cuantificación del ADN genómico obtenido. Se obtuvo un rango necesario

de concentración de ADN para poder realizar la amplificación variando desde 4,1 ng/μL (JV043) hasta 732,8 ng/μL (JV022). La Figura 3 de electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) del ADN mostró coherencia con los resultados obtenidos en la determinación de concentración con el NanoDrop indicando que la cepa JV043 que presentó 4,1 ng/μL generó una banda casi imperceptible. De la misma forma se identificó una gran cantidad de ARNm debido al tamaño de banda que se encontró entre los 100 y 200 nucleótidos. El hecho que las bandas mostraron un barrido significa que el ADN pudo haber sido fragmentado debido al proceso de aislamiento y purificación. Sin embargo ninguna de estas características interfirió en la PCR al permitir la amplificación de todos los microorganismos.

**Tabla 9. Concentración de ADN de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo**

Código	[Ácidos Nucleicos]	Unidad	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
JD029	185,2	ng/μL	3,704	1,752	2,11	2,46
JD040	118,3	ng/μL	2,366	1,044	2,27	3,25
JD041	160,4	ng/μL	3,209	1,667	1,93	1,82
JD049	49,8	ng/μL	0,997	0,46	2,17	3,08
JD050	72,6	ng/μL	1,452	0,711	2,04	3,37
JD053	53,3	ng/μL	1,066	0,728	1,47	0,63
JD054	262,5	ng/μL	5,25	2,383	2,20	1,76
JV015	53	ng/μL	1,06	0,482	2,20	2,32
JV019	22,1	ng/μL	0,442	0,35	1,26	0,59
JV022	732,8	ng/μL	14,657	7,341	2,00	1,45
JV029	29,2	ng/μL	0,585	0,271	2,16	1,07
JV034	24,5	ng/μL	0,49	0,213	2,30	1,41
JV036	93,2	ng/μL	1,864	1,419	1,31	0,74
JV039	578,7	ng/μL	11,575	6,036	1,92	1,4
JV043	4,1	ng/μL	0,082	0,052	1,56	0,23
JD013	42,5	ng/μL	0,851	0,516	1,65	0,85

Elaborado por. (Navas, 2016)



**Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico extraído de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo.** Se utilizó un gel de agarosa al 1 %. En la parte superior se muestra la codificación de cada cepa y a la derecha de la foto se indican los valores (pb) del ladder utilizado (1Kb).

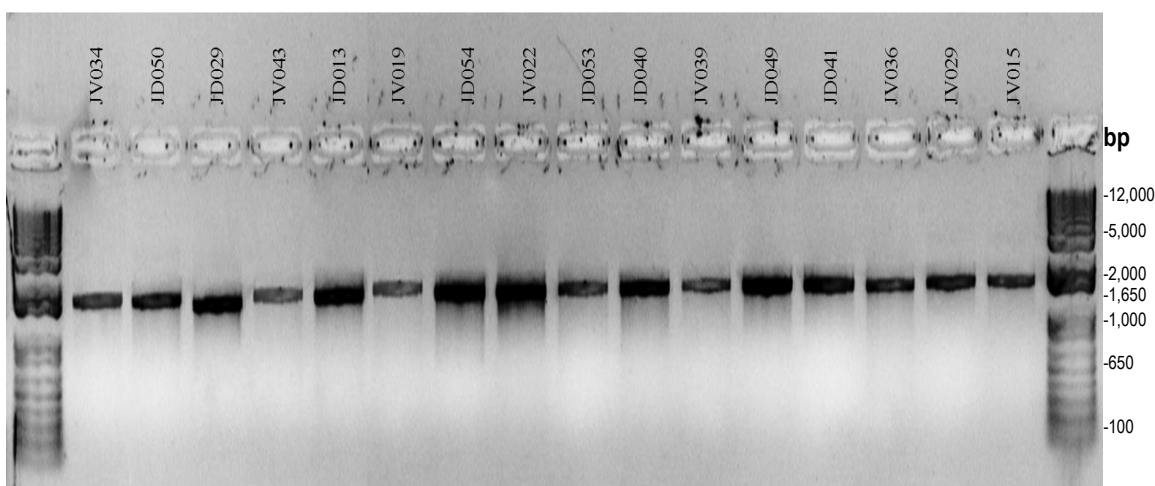
#### 4.1.3. Amplificación de los fragmentos de ADNr 16S

La Tabla 10 muestra los valores de concentración de los fragmentos de PCR correspondientes luego del procedimiento de amplificación. Al igual que la sección anterior en la Figura 4 se observa el gel de agarosa al 1 % (p/v) que comprobó la existencia de una sola banda y garantizó el secuenciamiento. Es importante mencionar que a pesar de que el ADN genómico utilizado como template tanto por los datos obtenidos en los coeficientes  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  y en la fotografía de visualización del gel de agarosa, evidenció posible contaminación con carbohidratos, proteínas, ARN y solventes, sin embargo, éstos factores no interfirieron en la amplificación del ADNr 16S.

**Tabla 10. Concentración de productos amplificados por PCR de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo**

Código	[Ácidos Nucleicos]	Unidad	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
JD029	22,4	ng/μL	0,448	0,249	1,8	1,28
JD040	93,8	ng/μL	1,876	1,422	1,32	0,83
JD041	43,1	ng/μL	0,862	0,489	1,76	1,03
JD049	75,9	ng/μL	1,517	1,005	1,51	0,19
JD050	31,8	ng/μL	0,636	0,39	1,63	0,35
JD053	18,3	ng/μL	0,366	0,223	1,64	0,48
JD054	14,6	ng/μL	0,291	0,158	1,84	1,03
JV015	27,4	ng/μL	0,547	0,296	1,85	1,03
JV019	60,3	ng/μL	1,206	0,901	1,34	0,8
JV022	31,3	ng/μL	0,625	0,348	1,8	0,42
JV029	101,3	ng/μL	2,025	1,538	1,32	0,87
JV034	42,8	ng/μL	0,855	0,539	1,59	0,15
JV036	15,9	ng/μL	0,319	0,176	1,81	0,79
JV039	60,3	ng/μL	1,206	0,912	1,32	0,46
JV043	17,4	ng/μL	0,349	0,184	1,9	1,23
JD013	74,8	ng/μL	1,496	1,119	1,34	0,93

Elaborado por. (Navas, 2016).



**Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR de la región 16S de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo. Se utilizó un gel de agarosa al 1 %. En la parte superior se muestra la codificación de cada cepa y a la derecha de la foto se indican los valores (pb) del ladder utilizado (1Kb).**



#### 4.1.4. Identificación molecular de los actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y el norte del Chimborazo

El secuenciamiento de los productos de PCR permitió la identificación género-especie de las dieciséis cepas aisladas de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo siendo todas identificadas molecularmente en el género *Streptomyces* donde se obtuvo un total de cinco especies diferentes *Streptomyces fildesensis*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces flavogriseus*, *Streptomyces olivochromogenes* y *Streptomyces sannanensis*.

En la Tabla 11 se detalla la identificación de cada cepa, el tamaño del gen y el primer con el cual fueron secuenciadas. Determinando que solamente dos cepas (JV022 y JV039) fueron secuenciadas por los dos primers 27f y 1525r mientras que las otras solamente fueron secuenciadas con el primer 1525r. Probablemente se dio un problema al momento de la alineación con el primer 27f, lo que provocó que no se obtenga una secuencia clara, lo que no ocurrió con el primer 1525r en el que todas las cepas presentaron una secuencia identificable. Tanto el fragmento más pequeño como el fragmento más grande de ADN pertenecieron a *Streptomyces fildesensis* teniendo la cepa JV019 con 772 nucleótidos y la cepa JD040 con 1339 nucleótidos, respectivamente.

**Tabla 11. Identificación de géneros y especies de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo.**

CÓDIGO	27f	1525r	ID	Longitud del ADNr 16S
JD029	NO	SI	<i>Streptomyces sannanensis</i>	1134
JD040	+/-	+/-	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1339
JD041	NO	SI	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1326
JD049	NO	SI	<i>Streptomyces fildesensis</i>	775
JD050	NO	+/-	<i>Streptomyces griseus/flavogriseus</i>	728
JD053	NO	SI	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1177
JD054	NO	SI	<i>Streptomyces fildesensis</i>	849
JV015	NO	SI	<i>Streptomyces griseus/flavogriseus</i>	1146
JV019	NO	SI	<i>Streptomyces fildesensis</i>	772
JV022	SI	SI	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	1195
JV029	NO	SI	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1242
JV034	NO	SI	<i>Streptomyces fildesensis</i>	775
JV036	NO	SI	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1080
JV039	SI	SI	<i>Streptomyces griseus/flavogriseus</i>	1258
JV043	NO	SI	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1305
JD013	NO	SI	<i>Streptomyces sannanensis</i>	1207

\*+/- La secuencia emitida por el primer proporcionó un número corto de nucleótidos

Elaborado por. (Navas, 2016)

En la Tabla 29 (Anexo F) se comparó el porcentaje de similitud y el número de nucleótidos diferentes entre los actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo con varias especies tipo del género *Streptomyces*, lo que determinó la identificación de un total de cinco especies diferentes.

La Tabla 12 hace referencia a los nuevos grupos formados a partir de la identificación molecular.

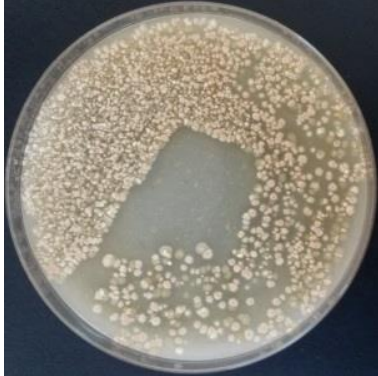
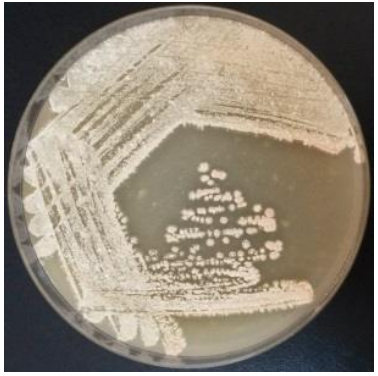


**Tabla 12. Agrupación según la identificación molecular**

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NÚMERO DE INTEGRANTES	CEPAS	GRUPO DE COLOR
<i>Streptomyces fildesensis</i>	10	JD040	2
		JV029	
		JD041	3
		JD049	4
		JV034	11
		JD053	6
		JD054	7
		JV036	12
		JV019	9
		JV043	14
<i>Streptomyces sannanensis</i>	2	JD029	1
		JD013	15
<i>Streptomyces griseus/flavogriseus</i>	3	JD050	5
		JV039	13
		JV015	8
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	1	JV022	10

Elaborado por. (Navas, 2016)


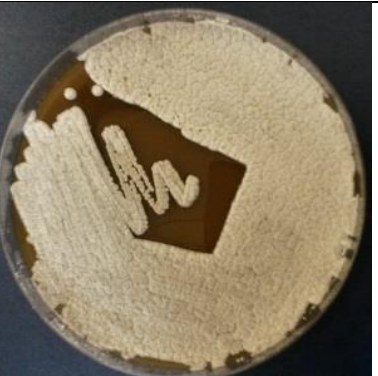
En las Tablas 13 a 16, se comparó fotográficamente la clasificación por grupos de color con la caracterización molecular donde las diferencias visuales evidenciaron variaciones morfológicas que están asociadas a la diversidad encontrada en las secuencias. De esta manera se puede vincular que basándose solamente en la percepción visual se pueden generar errores en la interpretación colorimétrica, de tal forma que de 15 grupos de color diferentes se tienen tan solo cuatro grupos de identificación molecular. A estos grupos se los podría considerar como “no compactos”, pero se puede sugerir que están asociados de alguna manera, por tal motivo, es importante sugerir la realización de más estudios para comprobar que se trata de un solo grupo.

Tabla 13. Cepas asociadas a *Streptomyces sannanensis*

CEPAS		ID
 JD029 Avena	 JD013 Avena	<i>Streptomyces sannanensis</i>
 JD029 GYM	 JD013 GYM	

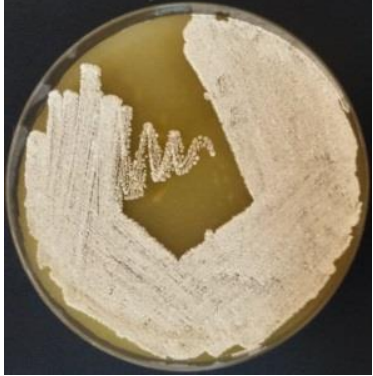


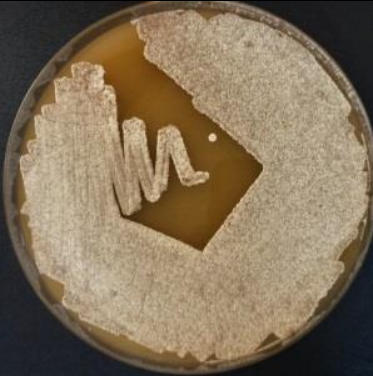


Elaborado por. (Navas, 2016)

Tabla 14. Cepas asociadas a *Streptomyces olivochromogenes*

CEPA		ID
 JV022 Avena	 JV022 GYM	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>

Elaborado por. (Navas, 2016)

Tabla 15. Cepas asociadas a *Streptomyces griseus/flavogriseus*

CEPAS		ID
 JD050 Avena	 JD050 GYM	<i>Streptomyces griseus/flavogriseus</i>
 JV039 Avena	 JV039 GYM	
 JV015 Avena	 JV015 GYM	

Elaborado por. (Navas, 2016)

Tabla 16. Cepas asociadas a *Streptomyces fildesensis*



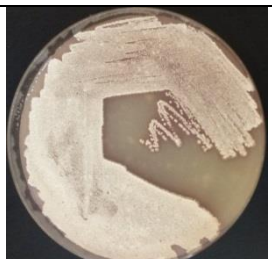
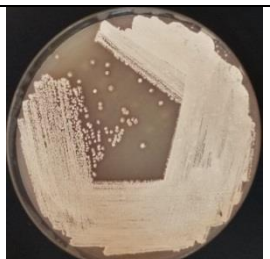








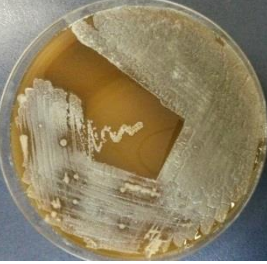


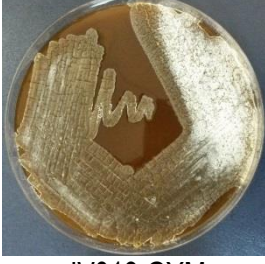

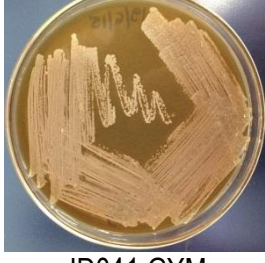
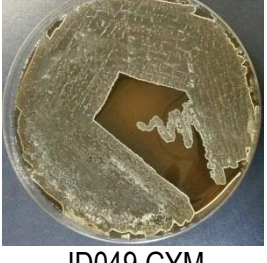

CEPAS		ID
 JD040 Avena	 JV029 Avena	<i>Streptomyces fildesensis</i>
 JD053 Avena	 JD054 Avena	
 JV034 Avena	 JV019 Avena	
 JV043 Avena	 JD041 Avena	
 JD049 Avena	 JV036 Avena	



Tabla 16. (Continuación)

CEPAS		ID
 JD040 GYM	 JV029 GYM	<i>Streptomyces fildesensis</i>
 JD053 GYM	 JD054 GYM	
 JV034 GYM	 JV019 GYM	
 JV043 GYM	 JD041 GYM	
 JD049 GYM	 JV036 GYM	

Elaborado por. (Navas, 2016).

#### 4.1.5. Descripción taxonómica

*Streptomyces fildesensis* es una nueva cepa de actinomicetes aislada de una muestra de suelo recogida de la península Fildes, perteneciente a la isla King George en Antártida Occidental. La cepa se caracteriza por su color de micelio aéreo que va de blanco a gris, permitiendo diferenciar directamente cadenas de esporas flexuosas, con esporas lisas en forma de barra y esporas no móviles. El crecimiento óptimo se observó a 28 °C y a un pH de 7.0 y en ausencia de sal. Los rangos de temperatura, pH y de tolerancia a NaCl son de 10 a 37 °C, pH 6-9 y 0-3 % (p/v), respectivamente (Jing *et al.*, 2011).

Según la descripción de Villacís & Rodríguez (2015) todas las cepas pertenecientes a esta especie presentaron una cadena de esporas recta, crecimiento a un rango de pH de 4,5 hasta 8,5. Se confirmó el crecimiento a 28 °C. En cuanto a la salinidad, nueve cepas soportaron hasta 1% de concentración de NaCl en el medio, y solo una cepa (JV043) demostró crecimiento hasta con 15% de salinidad en el medio de cultivo. Probablemente esta cepa tiene un mecanismo de regulación osmótica lo que le permite controlar la pérdida de agua al encontrarse en una alta concentración de sal. No es posible establecer si las nueve cepas identificadas en este estudio como *Streptomyces fildesensis* soportan el valor máximo de 3 % de salinidad indicado al no haber realizado pruebas en el rango de 1 a 10% por lo que deberían desarrollarse estudios posteriores.

Las cepas de este estudio identificadas en esta especie fueron aisladas de muestras de suelo y arena de la isla Greenwich en Antártida encontrándose en una localización más al sur que la isla King George. Además se amplió su distribución geográfica al encontrar cepas provenientes de los glaciares del norte del Chimborazo.

*Streptomyces sannanensis* es un actinomicete descubierto en 1981 durante un estudio para detección de nuevos antibióticos. Encontrando que este produce el complejo sannamycin, los componentes de los cuales tienen estructuras relacionadas con los aminoglucósidos conocidos, como fortimicina, sporaricinas, istamycinas, y dactinomycinas. Los colores del micelio aéreo producido en varios tipos de agar se identificaron como pertenecientes a la serie de color gris. Observándose un crecimiento entre 17 y 37 °C, sin embargo, el crecimiento óptimo se produjo entre 27 y 34 °C. (Iwasaki *et al.*, 1991).

*Streptomyces griseus*, descubierto por Krainsky en 1914, es un amplio grupo que posee cadenas de esporas que son rectiflexibles; la superficie de las esporas es lisa. Poseen un contenido de G+C en el ADN es de 71-72% en moles. Se observó crecimiento de 18 a 35 °C y un rango de pH de 6 a 9. Las esporas del micelio aéreo se encuentran en una serie de color gris; el reverso de las colonias es de color gris-amarillo y no produce pigmentos difusibles (Liu *et al.*, 2005).

*Streptomyces flavogriseus*, fue descubierto por Duché en 1934, es una cepa en el que las colonias son de crecimiento lento, el micelio aéreo es de color gris blanquecino a amarillo en la producción de esporas sin producir pigmento difusible. Soporta temperaturas de hasta 28 °C mostrando un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram- y Gram+ y algunos hongos. (Khandan & Gottravalli, 2015).

Se comprueba que las cepas identificadas como *Streptomyces griseus/flavogriseus* poseen la misma forma en la cadena de esporas (rectiflexibles), se observa crecimiento a 28 °C y un rango de pH de 4,5 a 7,5. Siendo halófilas débiles soportando hasta 1% de salinidad en el medio de cultivo (Villacís & Rodríguez, 2015).

*Streptomyces olivochromogenes* descubierto por Walksman en 1923 fue determinado como agente de biocontrol contra enfermedades del suelo aislado originalmente de raíces de la superficie esterilizada de col china procedentes de diversas regiones en Corea. (Lee *et al.* (2008); Shimizu (2011)).

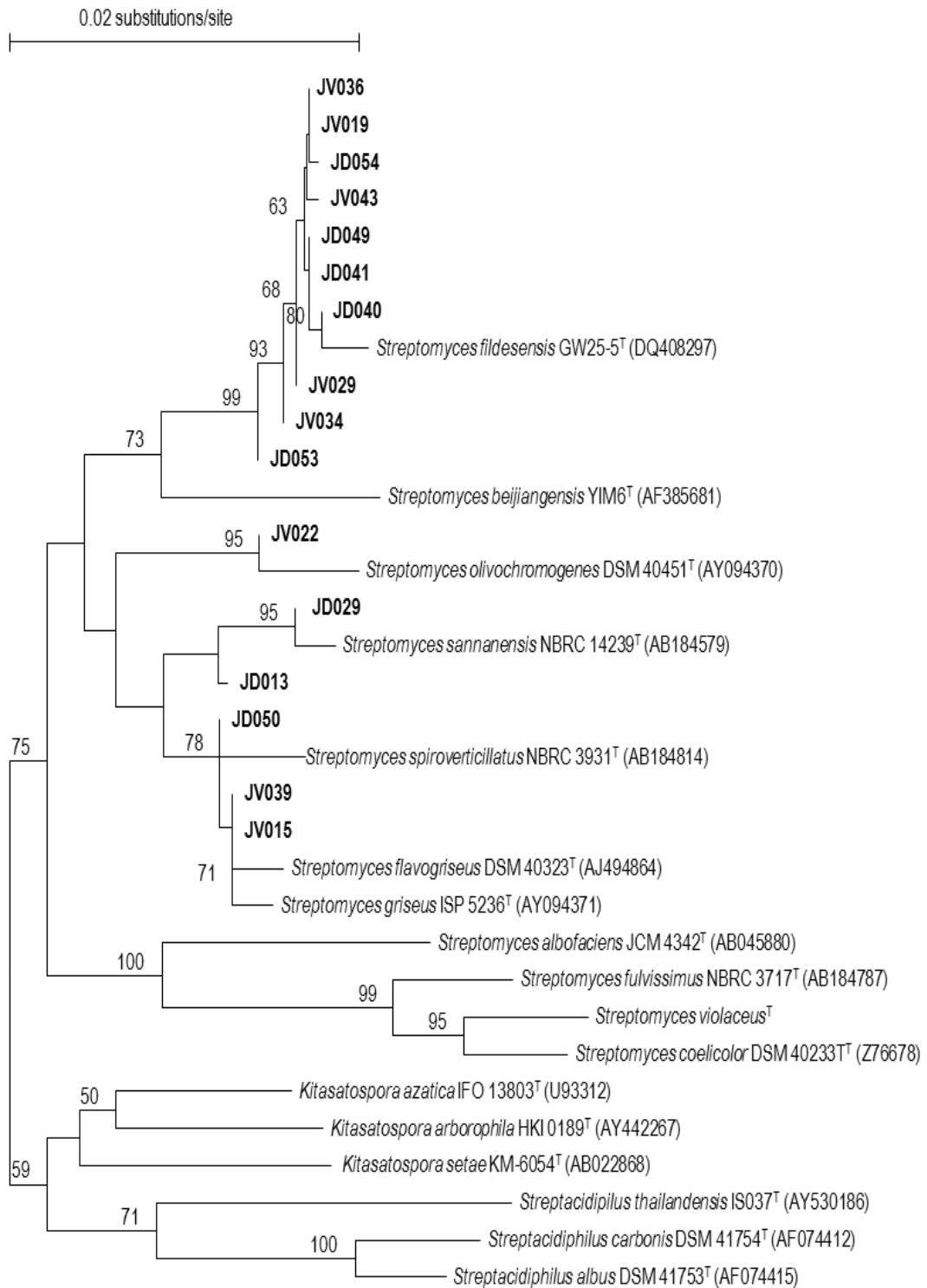
Las características que presenta esta cepa en el estudio de Villacís & Rodríguez (2015) son cadenas de esporas flexous, un crecimiento a 28 °C y un rango de pH de 4,5 a 7,5 soportando hasta 1% de salinidad en el medio de cultivo.

Como información complementaria del trabajo de Villacís & Rodríguez (2015) se evidenció en la Tabla 17 (Anexo B) la capacidad antagónica que poseen todos los actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares contra ciertos microorganismos fitopatógenos demostrando la producción de ciertos metabolitos secundarios.



Se elaboró un árbol filogenético preliminar (Figura 5), debido a que la gran mayoría de secuencias del ADNr 16S obtenidas fueron parciales. En algunos casos, estas secuencias presentaron menor número de nucleótidos y en otros, se tuvo un alto número de los mismos (Tabla 30, Anexo G), lo que debería permitir estudios posteriores en donde se complemente la información obtenida para saber con seguridad si estos microorganismos pertenecen o no a las especies descritas en este árbol filogenético.

Se observaron grupos filogenéticamente homogéneos, sin embargo dentro del grupo hay variaciones que probablemente se las puede revisar mediante comparaciones macroscópicas y microscópicas. El grupo con mayor número de integrantes fue el de *Streptomyces fildesensis* con cepas provenientes de los dos ecosistemas glaciares, el cual demostró ser un grupo homogéneo debido a que el valor de bootstrap en el árbol filogenético indicó que está soportado en un 90% existiendo coherencia en los análisis basados en la distancia filogenética. Además, se encontró otro grupo de tres cultivos perteneciente a *Streptomyces griseus/flavogriseus* que, de la misma forma, provienen de los dos ecosistemas glaciares y otro grupo con 2 cultivos, uno aislado de la Antártida y otro del norte del Chimborazo, pertenecientes a *Streptomyces sannanensis* y el último microorganismo aislado del norte del Chimborazo perteneciente a *Streptomyces olivochromogenes*.



**Figura 5. Análisis filogenético de las dieciséis especies aisladas de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo.** Entre paréntesis se detalla el número de acceso a la base de datos NCBI. Obtenido mediante “neighbour-joining”, calculado mediante el algoritmo desarrollado por Jukes y Cantor en. La topología fue evaluada usando el análisis de “bootstrap” desarrollado por Felsenstein en. Los resultados fueron calculados con el algoritmo “neighbour-joining”, basado en 1500 grupos de datos, usando el software TREECON desarrollado por Van Der Peer. La escala indica el número de sustituciones por cada 100 nucleótidos.

Se debe resaltar el hecho que al tener representantes en los grupos aislados tanto de ecosistemas glaciares de la Antártida como del norte del Chimborazo, se evidencia adaptación evolutiva de estos microorganismos hacia condiciones climatológicas similares que existen en estos dos ecosistemas, pero separados por decenas de miles de kilómetros. Además, que se convierte en una paradoja encontrar *Streptomyces* en condiciones medioambientales únicas de la línea ecuatorial cuando se sabe que existe mayor intensidad de radiación y se posee un subtipo de clima tropical, el mismo que se caracteriza por altas temperaturas (la media anual siempre es superior a 27 °C a nivel del mar) y casi constante durante todo el año (amplitud térmica anual inferior a 3 °C), además de lluvias abundantes y regulares (Podwojewski & Poulénard, 2011). Mientras que en la Antártida impera el clima polar donde la temperatura promedio del mes más cálido no supera los 0 °C teniendo condiciones excepcionalmente frías, secas, ventosas. La forma predominante de precipitaciones es la nieve debido a que la lluvia se presenta solo esporádicamente (Takeuchi, 2011).

#### **4.1.6. Discusión general del trabajo**

El enfoque principal de este trabajo fue identificar molecularmente actinomicetes provenientes de muestras de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo, resumiéndose todos los resultados en un árbol filogenético donde se establece una relación con varias especies pertenecientes al género *Streptomyces*, como son *Streptomyces fildesensis*, *Streptomyces griseus/ flavogriseus*, *Streptomyces olivochromogenes* y *Streptomyces sannanensis*.

Comparando los resultados de la caracterización por color con la caracterización molecular no se encontró una relación directa al establecer que cepas ubicadas en diferentes grupos de color fueron identificadas en una misma especie, lo que según Urdaneta (2009) se denominan variaciones, al encontrar características diferentes entre individuos pertenecientes a una misma especie, además que estas variaciones fenotípicas son producto de la interacción entre los genes y el medio ambiente en el que se desarrollan.

Analizando los datos previos de capacidad antagónica de los actinomicetes se puede demostrar la producción de metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento total y/o parcial de varios hongos fitopatógenos como *Alternaria*, *Phoma*, *Botrytis* y *Fusarium*, además de una bacteria Gram+ y una bacteria Gram-. Sin embargo, existen ciertas cepas que no

demonstraron actividad, ratificando la diversidad de microorganismos dentro de una misma especie.

Por otro lado, este estudio sirve como un análisis preliminar para comprobación de los resultados al obtener secuencias parciales de ADN y características macroscópicas diferentes. Se podrá además seguir evaluando su capacidad antagónica contra microorganismos patógenos, para encontrar aplicaciones útiles en biotecnología tanto en la industria farmacéutica, alimentaria y/o agricultura, dado que según (Juárez-Becerra *et al.*, 2010) las pérdidas de cultivos por hongos fitopatógenos son aproximadamente del 5 al 25 % en países desarrollados y del 20 al 50 % en países en desarrollo. Para reducir así el uso de agentes químicos dañinos para el medio ambiente y con efectos secundarios para la salud.

Es importante recalcar que al realizar una comparación de los datos obtenidos en la caracterización fenotípica de Villacís & Rodríguez (2015) junto con los resultados de identificación molecular de este estudio, se puede evidenciar claramente que existen ciertas diferencias con la descripción taxonómica original realizada por los investigadores citados anteriormente, permitiendo explicar que pueden existir variaciones morfológicas asociadas al medio en el que se desarrollan, a las condiciones climáticas, disponibilidad de nutrientes y capacidad de osmoregulación de los actinomicetes, pero que genéticamente corresponden a una misma especie.

*Streptomyces fildesensis*, descubierto recientemente por Jing *et al.* (2011) fueron aislados de muestras de suelo y arena de la Isla King George, que se encuentra en una latitud 62°23'00"S, sin embargo, las cepas aisladas en la isla Greenwich se ubican en una latitud mucho más al sur (62°31'00"S), lo que demuestra que se amplía la distribución geográfica de este microorganismo desde el nivel del mar, hasta una altura mayor a 4500 msnm donde se encuentra el volcán Chimborazo con una latitud 01°28'09"S en la zona ecuatorial, extendiendo su ubicación tanto vertical como horizontalmente.

Un factor importante en el desarrollo del trabajo es el origen de las muestras, las que provinieron tanto de la Isla Greenwich, en las Shetland del Sur y del Norte del Monte Chimborazo en Ecuador. Si bien estos dos ecosistemas tienen características glaciares, están en dos regiones geográficas completamente diferentes, separadas entre sí por miles de kilómetros. Por lo que al encontrar dos microorganismos de una misma especie a partir de los dos orígenes se puede pensar en la posibilidad de una adaptación evolutiva de los

microorganismos, cuyo metabolismo probablemente habrá desarrollado vías metabólicas, primarias y sobretodo secundarias, únicas que les permita sobrevivir en un ambiente tan extremo.

Se establece además que este estudio junto con el de Villacís & Rodríguez (2015) son precursores para poder avanzar y encontrar otro tipo de microorganismos, ya sean actinomicetes, bacterias, o eucariotes que puedan tener vías metabólicas de gran importancia para biotecnología. El hecho de encontrar en estos microorganismos una diversidad biológica y metabólica tan amplia, demuestra la riqueza genética que se encuentra en estos ecosistemas, por lo tanto, se tiene un precedente para estudios posteriores que permitan descubrir y desarrollar productos a partir de estos organismos.

## **4.2. Verificación de Hipótesis**

### **4.2.1. Hipótesis nula ( $H_0$ )**

- No existe diversidad molecular de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciales con potencial uso como agentes de biocontrol.

### **4.2.2. Hipótesis alternativa ( $H_1$ )**

- Existe gran diversidad molecular de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciales con potencial uso como agentes de biocontrol.

Después del análisis molecular de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares se acepta la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) afirmando que existe diversidad molecular de actinomicetes pertenecientes al género *Streptomyces* que podrían sintetizar metabolitos secundarios con capacidad antagónica.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Del total de actinomicetes secuenciados se los separó en 15 grupos de color, siendo solamente dos los que comparten las mismas características colorimétricas de esporas, micelio aéreo y pigmento difusible.
  
- En base a la extracción de ADNr 16S se logró identificar que todas las cepas pertenecen al género *Streptomyces*, siendo diez cepas *Streptomyces fildesensis*, tres cepas *Streptomyces griseus/ flavogriseus*, dos cepas *Streptomyces sannanensis* y una cepa *Streptomyces olivochromogenes*; demostrando una variedad tomando en cuenta que los actinomicetes fueron aislados de dos ecosistemas glaciares diferentes; de la Antártida y del norte del Chimborazo.
  
- Taxonómicamente, los dieciséis actinomicetes analizados fueron ubicados en cinco grupos especie basados en una similitud del 90%. Cuatro de éstos incluyeron a más de un espécimen y el grupo restante fue individual.
  
- Se obtuvo dentro de un mismo grupo-especie varias cepas provenientes de diferentes ecosistemas glaciares, del suelo y arena de la Antártida y del norte del Chimborazo.

#### 5.2. Recomendaciones

- Ampliar el campo de acción para la promoción de proyectos de investigación sobre biodiversidad microbiana en ecosistemas con temperaturas extremas para utilizar su potencial biotecnológico.
  
- Impulsar la aplicación biotecnológica de los actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adegboye, M. F., & Babalola, O. O. (2012). Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes *African Journal of Agricultural Research*, 7(15), 2255-2261. doi: 10.5897/AJARX11.071
- Alexander, M. (1977). *Introduction to Soil Microbiology*. New York: John Wiley and Sons, Inc.,.
- Araragi, M. (1979). Comparison of actinomycete flora between tropical and temperate upland farm soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 25(2), 245-254. doi: 10.1080/00380768.1979.10433165
- Baltz, R. H. (2007). Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future. *Microbe*, 2(3), 125-131.
- Bartlett, J. M., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology*, 226.
- Benimeli, C. S., Fuentes, M. S., Abate, C. M., & Amoroso, M. J. (2008). Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(3), 233-239. doi: 10.1016/j.ibiod.2007.09.001
- Berd, D. (1973). Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology*, 25(4), 665-681.
- Blodgett, J. A., Oh, D. C., Cao, S., Currie, C. R., Kolter, R., & Clardy, J. (2010). Common biosynthetic origins for polycyclic tetramate macrolactams from phylogenetically diverse bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11692-11697. doi: 10.1073/pnas.1001513107
- Camacho, A., & Fernández-Valiente, E. (2005). Un mundo dominado por los microorganismos. Ecología microbiana de los lagos antárticos. *Ecosistemas. Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*, 14(2), 66-78.
- Carrión, O. (2014). *Caracterización de una nueva bacteria antártica y estudio de una nueva vía de producción de dimetilsulfuro*. (Doctorado en Biotecnología Ph.D Thesis), Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno-Vivián, C., & Martínez, M. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Madrid (España): Editorial TÉBAR.
- Cevallos, C., & Rodríguez, C. (2014). *Determinación de la Biodiversidad y Distribución Geográfica de Levaduras Asociadas a Frutos de Mora de Castilla (Rubus glaucus) de Tres Localidades de la Provincia de Tungurahua*. (Ingeniera en Alimentos BSc Thesis), Universidad Técnica de Ambato, Ambato (Ecuador).
- Comerio, R., Tarapow, M., Vásquez, S., & Cormack, W. (2007). Bacterias Adaptadas al Frío. *Revista Ciencia Hoy en línea*, 17(99), 10-21.

- Dougherty, B. (2000). DNA Sequencing and Genomics. In J. Lederberg (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (Second ed., Vol. 2). United States: Editorial Academic Press.
- Drechsler, C. (1918). The Taxonomic Position Of The Genus *Actinomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 4(8), 221-224.
- El-Tarabili, K. A., Hassar, A. H., & Sivasithamparam, K. (2008). Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Applied Soil Ecology*, 39(2), 161-171.
- Euzéby, J. P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 590-592.
- Franco-Correa, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodríguez, M. X., & Barea, J. M. (2010). Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology*, 45(3), 209-217. doi: 10.1016/j.apsoil.2010.04.007
- Gandhimathi, R., Seghal Kiran, G., Hema, T. A., Selvin, J., Rajeetha Raviji, T., & Shanmughapriya, S. (2009). Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardioopsis alba* MSA10. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(6), 825-835. doi: 10.1007/s00449-009-0309-x
- Garzón, D. C., & Rodríguez, C. (2013). *Determinación de la Biodiversidad Bacteriana en Ecosistemas Glaciares de la Antártida*. (Ingeniera Bioquímica BSc Thesis), Universidad Técnica de Ambato, Ambato (Ecuador).
- Gavilánez, T., & Rodríguez, C. (2013). *Determinación de la Biodiversidad Bacteriana Presente en Suelos Contaminados con Hidrocarburos para Uso Potencial en Biorremediación*. (Ingeniera Bioquímica BSc Thesis), Universidad Técnica de Ambato, Ambato (Ecuador).
- González, Y. (2010). *Los Actinomicetos: Una Visión Como Promotores De Crecimiento Vegetal*. (Microbióloga Agrícola y Veterinaria BSc Thesis), Pontificia Universidad Javeriana Bogotá (Colombia).
- Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189-216. doi: 10.1146/annurev.mi.37.100183.001201
- Gurung, T. D., Sherpa, C., Agrawal, V. P., & Lekhak, B. (2009). Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal Journal of Science and Technology*, 10, 173-182. doi: 10.3126/njst.v10i0.2957
- Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M. J., & Ouhdouch, Y. (2008). Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Applied Soil Ecology*, 40(3), 510-517.



- Iwasaki, A., Itoh, H., & Mori, T. (1891). *Streptomyces sannanensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31(3), 280-284.
- Jing, L., Xin-Peng, T., Tian-Jiao, Z., Ling-Ling, Y., & Wen-Jun, L. (2011). *Streptomyces fildesensis* sp. nov., a novel streptomycete isolated from Antarctic soil. *Antoine Van Leeuwenhoek*, 100, 537-543. doi: 10.1007/s10482-011-9609-7
- Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E., & López-Malo, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 14-23.
- Kavitha, A., Prabhakar, P., Narasimhulu, M., Vijayalakshmi, M., Venkateswarlu, Y., Venkateswara Rao, K., & Balaraju Subba Raju, V. (2010). Isolation, characterization and biological evaluation of bioactive metabolites from *Nocardia levis* MK-VL\_113. *Microbiological Research*, 165(3), 199-210. doi: 10.1016/j.micres.2009.05.002
- Kekuda, T. R. P., Shobha, K. S., & Onkarappa, R. (2010). Fascinating diversity and potent biological activities of actinomycetes metabolites. *Journal of Pharmacy Research*, 3, 250-256.
- Khandan, N., & Gottravalli, J. (2015). Isolation, Identification and Evaluation of Antimicrobial Activity of *Streptomyces flavogriseus*, strain ACTK2 from Soil Sample of Kodagu, Karnataka State (India). *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(2), e15107. doi: 10.5812/jjm.15107
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics* (T. J. I. Foundation Ed.). Norwich, England.
- Krsek, M., Morris, N., Egan, S., & Wellington, E. M. H. (2000). Actinomycetes. In J. Lederberg (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (Second Edition ed., Vol. 1). United States: Editorial Academic Press.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (pp. 115-148): John Wiley & Sons.
- Lee, S. O., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Park, D.-J., Kim, C.-J., & Kim, J.-C. (2008). Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 1741-1746.
- Liévin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J. R., & Servin, A. L. (2000). Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, 47, 646-652. doi: 10.1136/gut.47.5.646
- Liu, Z., Shi, Y., Zhang, Y., Zhou, Z., Lu, Z., Li, W., Huang, Y., Rodríguez, C., & Goodfellow, M. (2005). Classification of *Streptomyces griseus* (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948 and related species and the transfer of '*Microstreptospora cinerea*' to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces yanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1605-1610. doi: 10.1099/ijs.0.63654-0

- Luteyn, J. (1999). Páramos: A Checklist of Plant Diversity, Geographical Distribution, and Botanical Literature. *Missouri Botanical Garden*. Retrieved December 10, 2016, from [http://www.mobot.org/mobot/research/paramo\\_ecosystem/introduction.shtml](http://www.mobot.org/mobot/research/paramo_ecosystem/introduction.shtml)
- Macagnan, D., Romeiro, R. d., Pomella, A. W. V., & De Souza, J. T. (2008). Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora (ex Crinipellis) pernicioso* by phylloplane actinomycetes. *Biological Control*, 47(3), 309-314. doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.08.016
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock Biología de los Microorganismos* (10ª ed.): Pearson Educación.
- Mitra, S. (2003). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. United States of America.
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). Los Microorganismos: Pequeños Gigantes. *Ciencia y Cultura Elementos*, 77, 15-23.
- Naine, S. J., Srinivasan, V. M., & Devi, C. S. (2011). Novel anticancer compounds from marine actinomycetes : A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 4(4), 1285.
- Nimnoi, P., Pongsilp, N., & Lumyong, S. (2010). Genetic diversity and community of endophytic actinomycetes within the roots of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by *Actinomycetes*-specific PCR and PCR-DGGE of 16S rRNA gene. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(4), 595-601.
- Olive, D. M., & Bean, P. (1999). Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1661-1669.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antoine Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 279-289. doi: 10.1023/A:1020620607611
- Patil, H., Srivastava, A. K., Singh, D. P., Chaudhari, B. L., & Arora, D. K. (2011). Actinomycetes mediated biochemical responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) enhances bioprotection against *Rhizoctonia solani*. *Crop Protection*, 30(10), 1269-1273.
- Podwojewski, P., & Poulénard, J. (2011). Los Suelos de los Páramos de Ecuador. *Páramo: Paisaje estudiado, habitado, manejado e institucionalizado*, 63-80.
- Rascio, N., La Rocca, N., Sven, E. J., & Brian, F. (2008). Biological Nitrogen Fixation *Encyclopedia of Ecology* (pp. 412-419): Academic Press: Oxford.
- Rodríguez, C. (2004). *Molecular and Phenotypic Characterization of Members of the Family Streptomyetaceae*. (Ph. D.), University of Newcastle, London.
- Rogers, A. D. (2007). Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362(1488), 2191-2214.

- Ruiz, M. (2013). *Identificación Y Evaluación De La Eficiencia En La Fijación De Nitrógeno Atmosférico De La Cepa Bg1 En Condiciones De Laboratorio, E Invernadero En El Cultivo De Rosa (Rosa sp. var. Ravel)*. (Ingeniera Agrónoma BSc Thesis), Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Salazar, A., Ordoñez, C., Hernández, D., Castaño, L., Peña, K., Rodríguez, J., & Bueno, L. (2014). Actinomicetos aislados del suelo del Jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. *Scientia et Technica Año XIX*, 19(2), 223-229.
- Schrenpf, H. (2001). Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antoine Van Leeuwenhoek*, 79(3-4), 285-289. doi: 10.1023/A:1012058205158
- Shimizu, M. (2011). Endophytic Actinomycetes: Biocontrol Agents and Growth Promoters. In Maheshwari D. K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Japan: Springer Berlin Heidelberg.
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods For Characterization of *Streptomyces* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340.
- Singh, S. B., & Pelaez, F. (2008). Biodiversity, chemical and drug discovery. *Progress In Drug Research*, 65(141), 143-174.
- Soler Hernández, A. (2012). *Biodiversidad De Actinomicetos Aislados De Plantas Depuradoras De Aguas Residuales. Estudio De La Capacidad De Biodegradación De Compuestos Tóxicos*. (PhD Thesis), Universidad Politécnica de Valencia, Valencia (España).
- Speers, D. J. (2006). Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. *The Clinical Biochemist Reviews*, 27(1), 39-51.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A., & Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 479-491.
- Stach, J. E., & Bull, A. T. (2005). Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antoine Van Leeuwenhoek*, 87(1), 3-9.
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 198-203. doi: 10.1016/j.copbio.2005.02.008
- Takeuchi, N. (2011). Glacial Ecosystems. In P. S. Vijay, S. Pratap & K. H. Umesh (Eds.), *Encyclopedia Of Snow, Ice And Glaciers*. Japan: Springer Netherlands.
- Trujillo, M. E. (2008). Actinobacteria Encyclopedia of Life Sciences. Chinchester: John Wiley & Sons. doi: 10.1002/9780470015902.a0020366
- Urdaneta, A. (2009). La Herencia y las Variaciones. Venezuela: Unidad Educativa "Tomás de Jesús Quintero".

- Vargas Gil, S., Pastor, S., & March, G. J. (2009). Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiological Research*, 164(2), 196-205. doi: 10.1016/j.micres.2006.11.022
- Villacís, J., & Rodríguez, C. (2015). *Diversidad Biológica y Metabólica de Actinomicetes Aislados de Suelo y Arena de Ecosistemas Glaciares de la Antártida y del Norte del Chimborazo*. (Ingeniero Bioquímico BSc Thesis), Universidad Técnica de Ambato, Ambato (Ecuador).
- Vinueza, G., & Rodríguez, C. (2010). *Determinación de la Relación entre la Caracterización Fenotípica y Genotípica de Actinomicetes como Mecanismo de Dereplicación de Microorganismos Útiles en Biotecnología*. (Ingeniera Bioquímica BSc Thesis), Universidad Técnica de Ambato, Ambato (Ecuador).
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2010). *Prescott's Microbiology* (7th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Williams, P. G. (2009). Panning for chemical gold; marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends in Biotechnology*, 27(1), 45-52. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.10.005
- Zhi, X. Y., Li, W. J., & Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 589-608. doi: 10.1099/ijs.0.65780-0

## ANEXOS

### ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

#### Medios de Cultivo

##### Agar Avena

Solución Sales Traza	1 mL
Avena	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

##### Solución Sales Traza

Sulfato de Magnesio ( $MgSO_4 - 7H_2O$ )	100 mg
Sulfato de Hierro ( $FeSO_4 - 7H_2O$ )	100 mg
Sulfato de Cobre ( $CuSO_4 - 4H_2O$ )	100 mg
Sulfato de Manganeso ( $MnSO_4 - 4H_2SO_4$ )	100 mg
Agua destilada	100 mL

##### Agar GYM

Glucosa	4 g
Extracto de levadura	10 g
Extracto de malta	10 g
Carbonato de calcio ( $CaCO_3$ )	2 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

##### Agar No Esporulante

Casaminoácidos	20 g
Almidón soluble	20 g
Extracto de levadura	4 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL
pH	6.5

### Agar Arginina con Vitaminas (AAV)

L-Arginina	0,30 g
Glucosa	1 g
Glicerol	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,30 g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.20 g
NaCl	0,30 g
Solución de Vitaminas	10 mL
Solución de sales traza	10 mL
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6,5

### Solución de Vitaminas

Ácido p-aminobenzoico	5 mg
Pantotenato cálcico	5 mg
Inositol	5 mg
Niacina	5 mg
Piridoxina • HCl	5 mg
Riboflavina	5 mg
Tiamina • HCl	5 mg
Biotina	2,5 mg
Agua destilada	100 mL
pH	6,4

### Agar Almidón Caseína (AAC)

Almidón soluble	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
KNO <sub>3</sub>	2 g
NaCl	2 g
Caseína	0 g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,05 g
CaCO <sub>3</sub>	0,02 g
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

### **Agar Agua de Llave**

Agar	15 g
Agua de llave	1000 mL

## **Soluciones para Técnicas de Biología Molecular**

### **Búfer de Extracción de ADN**

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

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 0,5M para el búfer Tris – HCl preparar una solución stock 1M y para en búfer EDTA una solución stock 0,5M una vez esterilizados, mezclar los volúmenes adecuados para obtener 100mL de búfer de extracción.

### **Búfer TE 1X**

Tris HCl pH 8	10 mM
EDTA pH8	1mM

### **Búfer TBE 10X**

Tris base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA pH8	7,4 g
Agua Destilada	1000 mL

ANEXO B. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETES AISLADOS DE ECOSISTEMAS GLACIARES DE LA ANTÁRTIDA Y DEL NORTE DEL CHIMBORAZO

Tabla 17. Diámetros de inhibición en milímetros (mm) frente a microorganismos de control

CÓDIGO	DÍA 3												DÍA 5											
	Botrytis		Fusarium		Alternaria		Phoma		Bacteria G+		Bacteria Gram -		Botrytis		Fusarium		Alternaria		Phoma		Bacteria G+		Bacteria Gram -	
	Ø Polar	Ø Ecuatorial	Ø Polar	Ø Ecuatorial	Ø Polar	Ø Ecuatorial	Ø Polar	Ø Ecuatorial	Ø Polar	Ø Ecuatorial	Ø Polar	Ø Ecuatorial	Ø Polar	Ø Ecuatorial	Ø Polar	Ø Ecuatorial	Ø Polar	Ø Ecuatorial	Ø Polar	Ø Ecuatorial	Ø Polar	Ø Ecuatorial	Ø Polar	Ø Ecuatorial
JD029	13	12	0	0	13	14	13	12	22	20	15	18	10	8	0	0	14	12	13	12	18	20	13	18
JD040	13	12	0	0	18	16	12	13	20	25	19	20	8	8	0	0	14	12	11	11	20	22	18	20
JD041	12	12	0	0	16	15	12	11	0	0	0	0	12	12	0	0	9	8	12	11	0	0	0	0
JD049	19	18	0	0	15	13	17	16	11	13	12	15	10	10	0	0	8	7	15	12	0	0	0	0
JD050	9	10	0	0	13	11	10	10	23	21	20	20	7	7	0	0	9	12	10	12	23	21	20	20
JD053	16	15	0	0	12	13	16	15	11	9	10	10	12	10	0	0	8	7	12	11	0	0	0	0
JD054	14	13	0	0	16	13	13	11	13	14	13	15	11	11	0	0	10	11	10	10	22	20	20	16
JV015	8	10	9	8	11	12	9	10	14	12	18	20	10	11	9	8	14	13	10	10	12	12	18	20
JV019	11	11	0	0	13	11	12	12	0	0	18	17	11	11	0	0	13	11	11	11	0	0	18	18
JV022	0	0	0	0	10	11	11	12	8	9	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	8	8	0	0
JV029	0	0	0	0	11	10	10	10	8	7	16	21	10	9	0	0	0	0	10	10	7	7	18	20
JV034	10	10	0	0	13	11	10	12	24	22	19	17	0	0	0	0	7	7	10	10	20	21	20	18
JV036	7	7	0	0	11	11	10	12	8	7	21	16	0	0	0	0	7	7	11	9	7	7	18	20
JV039	10	10	7	7	0	0	10	10	12	10	21	21	8	8	0	0	0	0	10	10	10	9	21	13
JV043	15	15	0	0	14	12	13	15	0	0	0	0	9	10	0	0	8	7	11	11	0	0	0	0
JD013	8	7	0	0	10	8	10	10	0	0	0	0	12	14	0	0	0	0	8	8	0	0	0	0
Nystatin	30	30	7	7	20	20	30	29	-	-	-	-	17	16	6	6	21	21	22	23	-	-	-	-
Rifampicina	-	-	-	-	-	-	-	-	20	21	22	25	-	-	-	-	-	-	-	-	20	20	25	25

Fuente. (Villacís & Rodríguez, 2015)



## ANEXO C. ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE SUELO

**Tabla 18. Arena Antártida 2010**

<b>Código</b>	<b>Lugar de Recolección</b>	<b>Fecha de Recolección</b>
ANT004	Sedimentos de Arena – Glaciar Quito EPVN	10 – Enero
ANT005	Punta Ambato – Algas	11 – Febrero
ANT011	Barrientos – Arena	09 – Enero
ANT012	Barrientos – Arena de Arena 05	12 – Enero
ANT015	Arena Río Culebra – Algas	14 – Febrero

Fuente. (Villacís & Rodríguez, 2015).

**Tabla 19. Suelo Antártida 2010**

<b>Código</b>	<b>Lugar de Recolección</b>	<b>Fecha de Recolección</b>
ANT001	Cerca PEVIMA – Suelo Puyango – Líquenes verdes	09 – Enero
ANT002	Cerro Puyango	09 – Enero
ANT007	Meseta Punta Ambato 03	10 – Febrero
ANT010	Barriente 03 – Cubierta vegetal de musgos	10 – Enero
ANT016	Cerro Puyango – Musgo	10 – Enero

Fuente. (Villacís & Rodríguez, 2015)

**Tabla 20. Arena Antártida 2011**

<b>Código</b>	<b>Lugar de Recolección</b>	<b>Fecha de Recolección</b>
M5 (136-137)	Arena de Arena – Barrientos	09 – Febrero
M7 (139-140)	Arena de Arena – Barrientos	09 – Febrero
M8 (141)	Arena de Arena – Sector Elefantes Marinos Parte de Atrás – Barrientos	09 – Febrero
M9 (142)	Arena de Arena – Marea Baja – Barrientos	09 – Febrero
M16 (154)	Arena de Arena – Punta Ambato	09 – Febrero

Fuente. (Villacís & Rodríguez, 2015)

**Tabla 21. Suelo Antártida 2011**

<b>Código</b>	<b>Lugar de Recolección</b>	<b>Fecha de Recolección</b>
M1 (102-103)	Suelo Bajo Musgos	29 – Enero
M6 (138)	Suelo Bajo Musgos – Barrientos	09 – Febrero
M12 (146)	Musgo – Suelo Pedregoso – Torres	11 – Febrero
M13 (147)	Suelo Bajo Cubierta de Líquenes – Torres	11 – Febrero
M22 (193)	Líquenes Roca – Base Puyango	20 – Febrero
M23 (194)	Líquenes Suelo Pedregoso - Puyango	20 – Febrero

**Fuente. (Villacís & Rodríguez, 2015)**

**Tabla 22. Arena Antártida 2012**

<b>Código</b>	<b>Lugar de Recolección</b>	<b>Fecha de Recolección</b>
509	Arena de Arena – Punta Ambato	27 – Febrero
510	Arena asociada a algas – Barrientos	23 – Febrero
512	Arena de Arena – Algas – Barrientos	23 – Febrero
518 (47)	Arena de Dee	24 – Febrero
520 (105)	Arena de Arena – Roberts	24 – Febrero

**Fuente. (Villacís & Rodríguez, 2015)**

**Tabla 23. Suelo Antártida 2012**

<b>Código</b>	<b>Lugar de Recolección</b>	<b>Fecha de Recolección</b>
514 (119)	Suelo bajo musgos – Barrientos	23 – Febrero
515 (109)	Suelo pasto – Torres	24 – Febrero
519 (106)	Suelo rico en materia orgánica debajo de musgo – Pedregoso – Roberts	24 – Febrero
522 (111)	Suelo bajo líquenes - Torres	24 – Febrero
523 (118)	Suelo de líquenes – Punta Ambato	27 – Febrero
525	Muestra 2 asociada a planta vascular – Cima Puyango	03 – Marzo
526	Muestra 1 asociada a líquenes – Cima Puyango	03 – Marzo

**Fuente. (Villacís & Rodríguez, 2015)**

**Tabla 24. Suelo Chimborazo <4500 msnm**

Código	Lugar de Recolección	Fecha de Recolección
KH1	Suelo debajo de Planta formando manto	30 – Mayo – 2014
KH2	Páramo acequia río	30 – Mayo – 2014

Fuente. (Villacís & Rodríguez, 2015)

**Tabla 25. Suelo Chimborazo >4500 msnm**

Código	Lugar de Recolección	Fecha de Recolección
M1	Oreja de conejo	30 – Mayo – 2014
M2	Suelo musgo debajo de piedra	30 – Mayo – 2014
M3	Suelo oreja de conejo	30 – Mayo – 2014
M4	Suelo debajo de musgos en piedra	30 – Mayo – 2014
M5	Oreja de conejo (4860m)	30 – Mayo – 2014

Fuente. (Villacís & Rodríguez, 2015)

**Tabla 26. Características físico-químicas de las muestras medioambientales**

Muestra	pH	Conductividad ( $\mu$ S)	Humedad (%)	Materia Orgánica (%)
Arena Antártida 2010	7,43	2185	4,946	3,004
Suelo Antártida 2010	8,63	185	3,485	6,884
Arena Antártida 2011	8,03	2204	10,383	3,441
Suelo Antártida 2011	7,27	204	3,703	3,678
Arena Antártida 2012	8,01	2064	5,652	7,445
Suelo Antártida 2012	7,25	192	4,419	5,423
Chimborazo <4500 msnm	8,59	562	56,080	13,683
Chimborazo >4500 msnm	8,32	451	47,380	8,889

Fuente. (Villacís & Rodríguez, 2015)

## ANEXO D. TABLAS DE COLORES

Tabla de Colores ACRILEX® utilizada para la Caracterización Macroscópica

Mates – Ref.: 04140, 04125 y 04106

 500 <input type="checkbox"/> Incoloro	 519 <input type="checkbox"/> Blanco	 529 <input type="checkbox"/> Marfil	 538 <input type="checkbox"/> Amarillo Piel	 535 <input type="checkbox"/> Azul Mar	 560 <input type="checkbox"/> Azul Caribe	 503 <input type="checkbox"/> Azul Celeste	 584 <input type="checkbox"/> Azul Invierno
 566 <input type="checkbox"/> Melocotón	 518 <input type="checkbox"/> Salmón	 589 <input type="checkbox"/> Amarillo Canario	 504 <input type="checkbox"/> Amarillo Limón	 501 <input type="checkbox"/> Azul Turquesa	 543 <input type="checkbox"/> Azul Ultramar	 502 <input type="checkbox"/> Azul Cobalto	 544 <input type="checkbox"/> Azul Marino
 505 <input type="checkbox"/> Amarillo Oro	 536 <input type="checkbox"/> Amarillo Cadmio	 517 <input type="checkbox"/> Naranja	 801 <input type="checkbox"/> Mandarina	 552 <input type="checkbox"/> Verde Glacial	 803 <input type="checkbox"/> Agua Marina	 802 <input type="checkbox"/> Verde Manzana	 510 <input type="checkbox"/> Verde Hoja
 586 <input type="checkbox"/> Coral	 507 <input type="checkbox"/> Rojo Fuego	 541 <input type="checkbox"/> Rojo Vivo	 583 <input type="checkbox"/> Rojo Tomate	 572 <input type="checkbox"/> Verde Aguacate	 570 <input type="checkbox"/> Verde Pistache	 513 <input type="checkbox"/> Verde Musgo	 582 <input type="checkbox"/> Verde Gramo
 508 <input type="checkbox"/> Rojo Escarlata	 805 <input type="checkbox"/> Guayaba Quemada	 550 <input type="checkbox"/> Púrpura	 509 <input type="checkbox"/> Rojo Carmim	 512 <input type="checkbox"/> Verde Veronese	 545 <input type="checkbox"/> Verde Oliva	 511 <input type="checkbox"/> Verde Bandera	 546 <input type="checkbox"/> Verde Pino
 588 <input type="checkbox"/> rojo Quemado	 565 <input type="checkbox"/> Vino	 537 <input type="checkbox"/> Rosa	 567 <input type="checkbox"/> Rosa Té	 573 <input type="checkbox"/> Ocre Oro	 539 <input type="checkbox"/> Sienna Natural	 569 <input type="checkbox"/> Caramelo	 506 <input type="checkbox"/> Cerámica
 542 <input type="checkbox"/> Rosa Oscuro	 549 <input type="checkbox"/> Magenta	 804 <input type="checkbox"/> Fuchsia	 587 <input type="checkbox"/> Lavanda	 585 <input type="checkbox"/> Capuccino	 807 <input type="checkbox"/> Jacarandá	 531 <input type="checkbox"/> Marrón	 514 <input type="checkbox"/> Tierra Tostada
 528 <input type="checkbox"/> Lila	 540 <input type="checkbox"/> Violeta Cobalto	 516 <input type="checkbox"/> Violeta	 568 <input type="checkbox"/> Azul Cerúleo	 551 <input type="checkbox"/> Sepia	 574 <input type="checkbox"/> Gris Lunar	 520 <input type="checkbox"/> Negro	

Metálicos - Ref.: 04340

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

Fluorescentes - Ref.: 04040

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

Glitter - Ref.: 05040 y 05025

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

**ACRILEX®**

## British Standard Specification of Colors for Identification Coding and Special Purposes



172 Pale roundel blue



112 Arctic blue



101 Sky blue



103 Peacock blue



104 Azure blue



109 Middle blue



113 Deep Saxe blue



110 Roundel blue



105 Oxford blue



106 Royal blue



216 Eau-de-Nil



210 Sky



217 Sea green



280 Verdigris green



283 Aircraft grey green



267 Deep chrome green



225 Light Brunswick green



285M NATO green



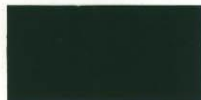
220 Olive green



241 (641) Dark green



298 Olive drab



226 Middle Brunswick green



223 Middle bronze green



227 Deep Brunswick green



224 Deep bronze green



310 Primrose



367 Manila



365 Vellum



353 Deep cream



369 Biscuit



352 Pale cream



384 Light straw



389 Camouflage beige



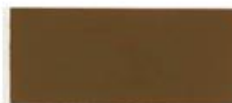
388 Beige



358 Light buff



361 Light stone



320 (410) Light brown



337 (437) Very dark drab



499 Service brown



447 Salmon pink



797 Light violet



454 Pale roundel red



414 Golden brown



411 Middle brown



445 Venetian red



542 Ruby



436M Dark camouflage brown



412 Dark brown



541 Maroon





796 Dark violet



108 Aircraft blue



166 French blue



175 Light French blue



107 Strong blue



228 Emerald green



262 Bold green



221 Brilliant green



218 Grass green



309 Canary yellow



363 Bold yellow



355 Lemon



356 Golden yellow



568 (368) Apricot



557 Light orange



592 International orange



593 Rail red



537 Signal red



564 Bold red



539 Currant red



538 Cherry

## ANEXO E. CARACTERIZACIÓN COLORIMÉTRICA – CÓDIGO BINARIO

**Tabla 27. Caracterización macroscópica agar avena – Código binario**

Código	Agar	Esporas					Micelio Aéreo										Pigmento Difusible				
		Mar	Bla	Vel	Cbg	Bis	Vel	Mar	Man	Bla	Pcr	Prm	Plt	Ros	Ali	Prm	Inc	Pcr	Dcr	Bis	
JD029	Avena	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
JD040		0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
JD041		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
JD049		1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
JD050		1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
JD053		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
JD054		1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
JV015		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
JV019		1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
JV022		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
JV029		0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
JV034		1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
JV036		1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
JV039		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
JV043		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
JD013		0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Elaborado por. (Navas, 2016)

**Tabla 28. Caracterización macroscópica agar GYM – Código binario**

Código	Agar	Esporas							Micelio Aéreo								Pigmento Difusible						
		Mar	Bla	Vel	Sbr	Lsw	Bis	Lbf	Vel	Mar	Lbr	Sbr	Cbg	Lbf	Lst	Bis	Lbr	Inc	Lst	Lbr	Pcr	Lbf	
JD029	GYM	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
JD040		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
JD041		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
JD049		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
JD050		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
JD053		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
JD054		1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
JV015		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
JV019		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
JV022		0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
JV029		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
JV034		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
JV036		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
JV039		0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
JV043		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
JD013		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Elaborado por. (Navas, 2016)

**ANEXO F. PORCENTAJE DE SIMILITUD Y NÚMERO DE NUCLEÓTIDOS DIFERENTES ENTRE ACTINOMICETES AISLADOS DE ECOSISTEMAS GLACIARES DE LA ANTÁRTIDA Y DEL NORTE DEL CHIMBORAZO Y VARIAS ESPECIES TIPO DEL GÉNERO *Streptomyces***

**Tabla 29. Porcentaje de similitud y número de nucleótidos diferentes entre actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo y varias especies tipo del género *Streptomyces***

	<i>S. griseus</i>	<i>S. olivochromogenes</i>	<i>S. sannanensis</i>	<i>S. flavogriseus</i>	<i>S. fildesensis</i>	JD029	JD050	JV015	JV022	JD013	JV039	JD040	JD041	JD049	JD053	JD054	JV019	JV029	JV034	JV036	JV043
<i>S. griseus</i>	---	30/1448	22/1424	8/1449	47/1417	12/1134	1/728	3/1146	20/1195	18/1206	3/1258	43/1338	42/1326	23/775	27/1177	28/849	22/772	35/1242	20/773	36/1080	44/1305
<i>S. olivochromogenes</i>	97.93	---	36/1424	26/1448	51/1417	19/1134	9/728	10/1146	6/1195	29/1206	15/1258	48/1338	47/1326	23/775	30/1177	27/849	22/772	38/1242	19/773	35/1080	49/1305
<i>S. sannanensis</i>	98.46	97.47	---	22/1435	48/1428	2/1134	6/728	9/1146	23/1195	8/1206	11/1258	43/1338	42/1326	27/775	25/1177	28/849	21/772	33/1242	20/773	34/1080	44/1305
<i>S. flavogriseus</i>	99.45	98.20	98.47	---	47/1447	12/1134	3/728	3/1146	19/1195	19/1206	4/1258	44/1338	43/1326	25/775	28/1177	29/849	23/772	36/1242	21/773	36/1080	45/1305
<i>S. fildesensis</i>	96.68	96.40	96.64	96.75	---	38/1133	18/728	35/1145	33/1195	31/1206	36/1257	3/1338	4/1326	2/775	4/1177	4/849	4/772	5/1242	4/773	6/1080	6/1305
JD029	98.94	98.32	99.82	98.94	96.65	---	6/728	9/1131	18/1067	5/1085	9/1129	35/1124	34/1129	26/769	27/1084	28/849	23/772	34/1126	20/773	36/1080	34/1127
JD050	99.86	98.76	99.18	99.59	97.53	99.18	---	0/728	9/691	6/709	0/728	16/728	16/728	16/728	15/708	17/726	15/603	16/728	15/664	16/728	16/728
JV015	99.74	99.13	99.21	99.74	96.94	99.20	100.00	---	13/1082	14/1099	0/1144	32/1139	31/1144	22/766	24/1099	26/846	20/772	31/1140	18/773	33/1080	32/1142
JV022	98.33	99.50	98.08	98.41	97.24	98.31	98.70	98.80	---	28/1188	17/1195	30/1194	29/1195	16/703	29/1160	19/783	21/772	30/1183	18/773	27/1018	31/1195
JD013	98.51	97.60	99.34	98.42	97.43	99.54	99.15	98.73	97.64	---	15/1206	28/1205	27/1206	19/721	27/1176	21/801	23/772	28/1201	20/773	28/1036	28/1206
JV039	99.76	98.81	99.13	99.68	97.14	99.20	100.00	100.00	98.58	98.76	---	33/1253	32/1257	22/764	24/1177	26/844	20/772	32/1242	18/773	33/1079	34/1256
JD040	96.79	96.41	96.79	96.71	99.78	96.89	97.80	97.19	97.49	97.68	97.37	---	1/1321	0/761	1/1176	1/841	1/772	2/1240	1/773	3/1075	3/1302
JD041	96.83	96.46	96.83	96.76	99.70	96.99	97.80	97.29	97.57	97.76	97.45	99.92	---	0/765	0/1177	1/845	0/772	1/1242	0/773	2/1080	2/1305
JD049	97.03	97.03	96.52	96.77	99.74	96.62	97.80	97.13	97.72	97.36	97.12	100.00	100.00	---	0/720	1/767	0/615	0/762	0/676	0/765	0/763
JD053	97.71	97.45	97.88	97.62	99.66	97.51	97.88	97.82	97.50	97.70	97.96	99.91	100.00	100.00	---	1/800	0/772	1/1176	0/773	2/1035	2/1177
JD054	96.70	96.82	96.70	96.58	99.53	96.70	97.66	96.93	97.57	97.38	96.92	99.88	99.88	99.87	99.88	---	0/695	1/842	1/756	1/845	1/843
JV019	97.15	97.15	97.28	97.02	99.48	97.02	97.51	97.41	97.28	97.02	97.41	99.87	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/772	0/712	0/772	0/772
JV029	97.18	96.94	97.34	97.10	99.60	96.98	97.80	97.28	97.46	97.67	97.42	99.84	99.92	100.00	99.91	99.88	100.00	---	0/773	2/1077	2/1242
JV034	97.41	97.54	97.41	97.28	99.48	97.41	97.74	97.67	97.67	97.41	97.67	99.87	100.00	100.00	100.00	99.87	100.00	100.00	---	0/773	0/773
JV036	96.67	96.76	96.85	96.67	99.44	96.67	97.80	96.94	97.35	97.30	96.94	99.72	99.81	100.00	99.81	99.88	100.00	99.81	100.00	---	2/1078
JV043	96.63	96.25	96.63	96.55	99.54	96.98	97.80	97.20	97.41	97.68	97.29	99.77	99.85	100.00	99.83	99.88	100.00	99.84	100.00	99.81	---

Elaborado por. (Navas, 2016)

**ANEXO G. SECUENCIA PARCIAL DEL GEN ADNr 16S CORRESPONDIENTE A ACTINOMICETES AISLADOS DE ECOSISTEMAS GLACIARES DE LA ANTÁRTIDA Y DEL NORTE DEL CHIMBORAZO**

**Tabla 30. Secuencia parcial del gen ADNr 16S correspondiente a actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo**

CÓDIGO	Secuencia 5' - 3'	ID	Número de Nucleótidos
JD029	GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC GGCTTGTGCGGTCGGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGTCTGCATTGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGG GGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGC CATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGG AACTAGGTGTTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA AGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAAC CTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCT GTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTT CGGGGTGATGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCC TTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAA GCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTG CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCAA CCCCTTGTGGGAGGAGCTGTCGAAGGT	<i>Streptomyces sannanensis</i>	1134

**Tabla 30. (continuación)**

<p>JD050</p>	<p>GAAGCCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC CACGCCGTAACGTTGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTCCCCGC CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATT CGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCGGTAT ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGT GTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACG TCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCG GAGCGAATCTAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCG CAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCC GAAGCCGGTGGCCC</p>	<p><i>Streptomyces griseus / Streptomyces flavogriseus</i></p>	<p>728</p>
<p>JV015</p>	<p>CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA GCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGC AGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT AAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCCGGGTCTGCATTGATACGGGCTAG CTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAA GGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCCTG GGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCA CGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCGGTATACA GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTT GCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA AGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGA GCCAATCTAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCA GATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAA GCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAA</p>	<p><i>Streptomyces griseus / Streptomyces flavogriseus</i></p>	<p>1146</p>

**Tabla 30. (continuación)**

JV022	<p>GGGTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAGTGGCTACCAAGGCGACG  ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  GGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCT  TTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATAC  GTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGCTTGCACGTGCGTTGTGAAAGCCCGG  GGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA  AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG  GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAAGTGGTGGTGGCGACATTCCACGTCGT  CGGTGCCGCGAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGG  CCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAG  CATTAGAGATAGTCCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT  TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACTGC  CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAAT  GGCAGGTACAAAGAGCTGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCTGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAA  CTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA  CCGCCCGTCA</p>	<p><i>Streptomyces  olivochromogenes</i></p>	<p>1195</p>
-------	---	--	-------------

**Tabla 30. (continuación)**

<p>JD013</p>	<p>AAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGG  TAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGANTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA  ATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAATGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTCAGC  AGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG  TGGGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTA  ACCCCGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCG  CAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG  CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATCCACGTCGTCGGTGC  CGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA  CAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACGGCCAGA  GATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC  CGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTC  AACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGT  ACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACC  CCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG  TCACGTCACGAAAGTCGGTAA</p>	<p><i>Streptomyces sannanensis</i></p>	<p>1207</p>
--------------	--	--	-------------

**Tabla 30. (continuación)**

<p>JV039</p>	<p>GGGGTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGAC  GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  TGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTC  TTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA  CGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACGTCCGGATGTGAAAGCCCG  GGGCTTAACCCCGGTCTGCATTGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG  AAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGTGAGGAGCGAAAGCGT  GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAGTGGTGGTGGCGACATTCCACGTCG  TCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGG  GCCCCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAA  GCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGATGTTGG  GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACT  GCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACA  ATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGC  AACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA  CACCGCCCGTCAGGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCTG</p>	<p><i>Streptomyces  griseus /  Streptomyces  flavogriseus</i></p>	<p>1258</p>
--------------	---	---	-------------



Tabla 30. (continuación)

JD040	<p>AACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTCCTCCTCCT  GGGGTGGGTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAA  GGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG  CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCNGGTTGTA  AACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  GTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTCACGTCCGGATGTGAAA  GCCCCGGGCCTAACCCCGGGTCTGCATTGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAG  CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAA  AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCA  CGTCGTCGGTGCCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA  CGGGGGCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACC  GGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTCTGTGAGAT  GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGG  AGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTG  CTACAATGGTCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGG  TCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTT  GTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCG</p>	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1339
-------	--	-------------------------------------	------

**Tabla 30. (continuación)**

<p>JD041</p>	<p>CCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTCCTCCTCCTGGGGTGGGTAAAAGC  TCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCC  GGCCTGAGAGGGCGACCGGCCAACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTTTTCAGCAGGGA  AGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA  GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTCACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCC  GGGTCTGCATTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT  ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC  AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCA  GCTAACGCATTAAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG  CAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATA  CGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC  AACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAAC  TCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCGGTACAA  TGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCAT  GAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC  GTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTTCGTCGA</p>	<p><i>Streptomyces  fildesensis</i></p>	<p>1326</p>
--------------	---	---	-------------

**Tabla 30. (continuación)**

<p>JD049</p>	<p>AACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA  TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCAT  TAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGC  ATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCC  TTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  AACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA  GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCGGTACAATGAGCTGCG  ATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGA  GTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAA  GTCGGTAACACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCGTGCAAGGTGGGACT</p>	<p><i>Streptomyces  fildesensis</i></p>	<p>775</p>
--------------	--	---	------------

**Tabla 30. (continuación)**

<p>JD053</p>	<p>GGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA  CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA  GCGACGCCCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGC  AGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT  AAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTCACGTCCGATGTGAAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGA  CTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAA  GGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  GCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCCTG  GGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCA  CGAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTAC  AGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGT  TGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC  AAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGA  GCCAATCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCA  GATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCCGTA</p>	<p><i>Streptomyces  fildesensis</i></p>	<p>1177</p>
--------------	---	---	-------------

**Tabla 30. (continuación)**

<p>JD054</p>	<p>TGCATTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG  AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTA  GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTGGTGGCCGAGCTAACG  CATTAAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGA  GCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCC  CCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  GCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAG  GAAGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCGGTACAATGAGCT  GCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCACGAAGTC  GGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACG  AAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCGTCGAAGGT</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis</i></p>	<p>849</p>
<p>JV019</p>	<p>GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGGTCTGTCACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAT  TCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA  ACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGAT  ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTGGTGGCCGAGCTAACGCATT  AAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCA  TGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCT  TGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA  ACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG  GTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCGGTACAATGAGCTGCGA  TACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACT</p>	<p><i>Streptomyces fildesensis</i></p>	<p>772</p>

**Tabla 30. (continuación)**

<p>JV029</p>	<p>TCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGAGACGACGGGTAGCC  GGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGANTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  CACAAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA  AGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA  GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGGTCTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCC  GGGTCTGCATTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT  ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC  AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCA  GCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG  CAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATA  CGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCG  AACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAAC  TCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCGGTACAA  TGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCAT  GAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTAC  GTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGATGGCCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCGT</p>	<p><i>Streptomyces  fildesensis</i></p>	<p>1242</p>
--------------	--	---	-------------

**Tabla 30. (continuación)**

JV034	<p>CTTAACCCCGGGTCTGCATTGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA  TGC GCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG  GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTGGTGGTGGCGACATTCCACGTCGTC  GGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC  CCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGC  CGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGT  TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACCGC  CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAAT  GGTCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAA  CTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTT</p>	<p><i>Streptomyces  fildesensis</i></p>	<p>775</p>
-------	---	---	------------

**Tabla 30. (continuación)**

<p>JV036</p>	<p>GAAAGCCTGATGGAGCGACGCCGCTTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAA  GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCG  GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTCACGTCCGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAT  TCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCCGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA  ACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT  ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATT  AAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCAGCGGAGCA  TGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCT  TGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA  ACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAG  GTGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCGGTACAATGAGCTGCGA  TACCGCAAGGTGGAGCGAATCTAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAG  TTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAG  TCGGTAACACCCGAAGCCGATGGCCAACCCGCAAGGGAGGGAGTCGTGCA</p>	<p><i>Streptomyces  fildesensis</i></p>	<p>1080</p>
--------------	--	---	-------------



**Tabla 30. (continuación)**

V043	<p>CCCTGAAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTCCTCCTCCTGGGGGTGGGTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGA          GCCC CGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAGACGACGGGTACCCGGCCTGAGAGGGCGACCG          GCCACTGGGATTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTG          ATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTA          CCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTG          GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTCACGTCCGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGG          GCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCGGTG          GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG          TCCACGCCGTAAACGTTGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCCG          CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAAT          TCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTCGGT          GTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCT          GTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGA          CGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGG          TGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAAT          CGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACAC          CCGAAGCCGATGGCCCAACCGCAAGGGAGGGAGTCGTC</p>	<i>Streptomyces fildesensis</i>	1305
------	--	-------------------------------------	------

Elaborado por. (Navas, 2016)