



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



---

“DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA EN ECOSISTEMAS  
GLACIARES DE LA ANTÁRTIDA”.

---

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

**Autor:** Diana Carolina Garzón Obando.

**Tutor:** Dr. Carlos Rodríguez. Ph.D

**Ambato - Ecuador**

**2013**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En calidad de Tutor del trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA EN ECOSISTEMAS GLACIARES DE LA ANTÁRTIDA”, realizado por la Egda. Diana Carolina Garzón Obando, certifico que el trabajo fue realizado por la persona indicada. Considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Marzo de 2013

---

Dr. Carlos Rodríguez M.; Ph.D

**TUTOR DE TESIS**

## AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA EN ECOSISTEMAS GLACIARES DE LA ANTÁRTIDA”, es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido, efectos legales y académicos que se desprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Ambato, Marzo de 2013

---

Diana Carolina Garzón Obando

180310604-4

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

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

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

Ambato, Marzo del 2013

Para constancia firman:

---

**Presidenta Tribunal**

**Ing. Gladys Navas**

---

**Miembro del Tribunal**

**Dr. Milton Ramos**

---

**Miembro del Tribunal**

**Dr. Ramiro Velastegui**

## **Dedicatoria**

*A mi familia, con eterno  
agradecimiento y cariño por el apoyo  
incondicional y por creer en mi.*

*A mi hermana, por ser ejemplo de  
fortaleza, perseverancia y amor  
incondicional.*

## **Agradecimiento**

*A la Universidad Técnica de Ambato, especialmente a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por las lecciones aprendidas y el apoyo otorgado.*

*A mis padres, quienes me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por el cariño y la paciencia.*

*Al Dr. Carlos Rodríguez por su paciencia, apoyo y confianza en mi para la realización de este trabajo.*

*Al Instituto Antártico Ecuatoriano, por proveer las muestras medioambientales para la realización de esta investigación.*

*A todas las personas que directa e indirectamente hicieron posible la realización de este trabajo.*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

### A. PÁGINAS PRELIMINARES

Tema	i
Aprobación del tutor	ii
Autoría	iii
Aprobación del tribunal de grado	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice general de contenidos	vii
Índice de Tablas	xii
Índice de anexos	xiii
Resumen	xvi

### B. TEXTO

#### CAPITULO I

#### EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Tema de Investigación	1
1.2. Planteamiento del problema	1
1.2.1. Contextualización	1
1.2.1.1. Macro	1
1.2.1.2. Meso	2
1.2.1.3. Micro	2
1.2.2. Análisis crítico	3
1.2.2.1. Diagrama causa-efecto	3
1.2.3. Prognosis	3
1.2.4. Formulación del problema	4
1.2.5. Preguntas directrices	4
1.3. Justificación	4
1.4. Objetivos	5
1.4.1. General	5
1.4.2. Específicos	5

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

2.1. Antecedentes	6
2.1.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano	6
2.1.1.1. Temperaturas cardinales	6
2.1.2. Clases de microorganismos según la temperatura de crecimiento	6
2.1.2.1. Microorganismos psicrófilos	7
2.1.2.2. Microorganismos psicrótrofos	7
2.1.3. Adaptaciones moleculares a condiciones de bajas temperatura	7
2.1.4. Importancia de microbios psicrófilos como productores de sustancias de interés biotecnológico	8
2.1.5. Biodiversidad en la Antártida	10
2.1.5.1. Generalidades	10
2.1.5.2. Biodiversidad Microbiana	11
2.1.6. Aislamiento selectivo de bacterias psicrófilas y psicrótrofas	12
2.1.7. Taxonomía Numérica	14
2.2. Fundamentación filosófica	15
2.3. Fundamentación legal	16
2.4. Categorías fundamentales	17
2.5. Hipótesis	17
2.5.1. Hipótesis nula	17
2.5.2. Hipótesis alternativa	17
2.6. Señalamiento de variables de la hipótesis	17

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGÍA**

3.1. Enfoque	18
3.2. Modalidad básica de la investigación	18
3.3. Nivel o tipo de investigación	18
3.4. Población y muestra	18
3.5. Operacionalización de variables	18
3.6. Plan de recolección de información	18
3.6.1. Caracterización físico-química de las muestras	18
3.6.1.1. Determinación del pH y Conductividad de las muestras	18



3.6.1.2. Determinación del porcentaje de humedad de las muestras	20
3.6.1.3. Determinación del porcentaje de materia orgánica de las muestras	20
3.6.2. Aislamiento selectivo de bacterias psicrófilas y psicrótrofas	20
3.6.2.1. Determinación de la población y diversidad bacteriana	20
3.6.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento de bacterias psicrófilas y psicrótrofas	21
3.6.4. Caracterización macroscópica de los cultivos aislados	22
3.6.5. Caracterización microscópica de los cultivos aislados	22
3.6.6. Pruebas fisiológicas de crecimiento	22
3.6.6.1. Rango de crecimiento en Función de la Temperatura	22
3.6.6.2. Rango de crecimiento en Función del pH	23
3.6.6.3. Rango de crecimiento en Función de la Salinidad	23
3.7. Plan de procesamiento y análisis de la información	24
3.7.1. Diseño experimental	24
3.7.2. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	26

## **CAPITULO IV**

### **ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

4.1. Análisis de los Resultados	31
4.1.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales	31
4.1.2. Aislamiento selectivo de bacterias psicrófilas y psicrótrofas	31
4.1.2.1. Determinación de la población y diversidad bacteriana	31
4.1.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento de bacterias psicrófilas y psicrótrofas	33
4.1.4. Caracterización macroscópica de los cultivos bacterianos	33
4.1.5. Caracterización microscópica de los cultivos bacterianos	34
4.1.6. Pruebas fisiológicas de crecimiento	35
4.1.6.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura	35
4.1.6.2. Rango de crecimiento en función del pH	35
4.1.6.3. Rango de crecimiento en función de la salinidad	36
4.1.7. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	36
4.2. Interpretación de datos	36
4.2.1. Población y diversidad bacteriana	36

4.2.2. Caracterización fenotípica	37
4.2.2.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura	37
4.2.2.2. Rango de crecimiento en función del pH	38
4.2.2.3. Rango de crecimiento en función de la salinidad	38
4.2.3. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	38
4.2.4. Discusión general de actinomicetes	39
4.2.5. Discusión general del trabajo	39
4.3. Verificación de la hipótesis	41
4.3.1. Hipótesis Nula ( $H_0$ )	41
4.3.2. Hipótesis Alternante ( $H_1$ )	41

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1. Conclusiones	42
5.2. Recomendaciones	42

## **CAPITULO VI**

### **PROPUESTA**

6.1. Datos informativos	44
6.1.1. Título	44
6.1.2. Instituciones ejecutoras	44
6.1.3. Beneficiarios	44
6.1.4. Ubicación	44
6.1.5. Tiempo Estimado para la Ejecución	44
6.1.6. Equipos técnico responsable	44
6.2. Antecedentes de la propuesta	44
6.3. Justificación	45
6.4. Objetivos	45
6.4.1. General	45
6.4.2. Específicos	45
6.5. Análisis de factibilidad	46
6.6. Fundamentación	46
6.7. Metodología – Modelo Operativo	46
6.7.1. Contenido de humedad y materia orgánica de las muestras	46

6.7.2. pH y Conductividad de las muestras	47
6.7.3. Aislamiento selectivo	47
6.7.3.1. Determinación de la población y diversidad bacteriana	47
6.7.4. Purificación y almacenamiento de los microorganismos aislados	48
6.7.5. Caracterización macroscópica de los microorganismos	48
6.7.6. Caracterización microscópica de los microorganismos	48
6.7.6.1. Tinción de Gram	48
6.7.6.2. Tinción de Endosporas	49
6.7.6.3. Tinción de Cápsulas	49
6.7.7. Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos	49
6.7.7.1. Rango de crecimiento en Función de la Temperatura	49
6.7.7.2. Rango de crecimiento en Función del pH	49
6.7.7.3. Rango de crecimiento en Función de la salinidad	50
6.8. Administración	50
6.9. Previsión de la evaluación	51
<b>C. MATERIAL DE REFERENCIA</b>	
Bibliografía	52
Anexos	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coeficiente de similitud	15
Tabla 2. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen.	22
Tabla 3. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.	23
Tabla 4. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función del pH del medio.	24
Tabla 5. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.	24
Tabla 6. Tratamientos en estudio.	25
Tabla 7. Esquema del análisis de varianza.	26
Tabla 8. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de bacterias.	27
Tabla 9. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes.	29

## ÍNDICE DE ANEXOS

### ANEXO A. DATOS EXPERIMENTALES

- Tabla A1. Características físico-química de las muestras medioambientales.
- Tabla A2. Número de colonias obtenidos de los platos del aislamiento selectivo.
- Tabla A3. Número de colonias diferentes de bacterias creciendo en los platos del aislamiento selectivo.
- Tabla A4. Número de ufc/gramo de suelo seco.
- Tabla A5. Codificación de cultivos bacterianos aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida.
- Tabla A6. Codificación de cultivos de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida.
- Tabla A7. Grupos de color formado por los cultivos bacterianos aislados de las muestras medioambientales.
- Tabla A8. Grupos de color formado por los cultivos de actinomicetes aislados de las muestras medioambientales.
- Tabla A9. Caracterización microscópica de los cultivos bacterianos aislados.
- Tabla A10. Caracterización microscópica de los cultivos de actinomicetes aislados.
- Tabla A11. Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura.
- Tabla A12. Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de acuerdo a la temperatura de aislamiento.
- Tabla A13. Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura.
- Tabla A14. Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.
- Tabla A15. Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra.
- Tabla A16. Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.
- Tabla A17. Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.
- Tabla A18. Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra.

Tabla A19. Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

Tabla A20. Grupos - especies basados en el 90% de similaridad a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de bacterias.

Tabla A21. Grupos - especies basados en el 90% de similaridad a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes.

## **ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Tabla B1. Análisis de varianza para el número de ufc por gramo de suelo seco (ufc/g).

Tabla B2. Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco del factor A.

Tabla B4. Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco de la interacción AxC.

Tabla B5. Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco de la interacción BxC.

Tabla B6. Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco de la interacción AxBxC.

Tabla B7. Análisis de varianza para la diversidad bacteriana.

Tabla B8. Separación de medias para la diversidad bacteriana del factor A.

Tabla B9. Separación de medias para la diversidad bacteriana de la interacción AxB.

Tabla B10. Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco de la interacción AxC.

Tabla B11. Separación de medias para la diversidad de la interacción BxC.

Tabla B12. Análisis de varianzas para la interacción ABC.

Tabla B13. Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de las bacterias aisladas en el presente estudio.

Tabla B14. Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de los actinomicetes aisladas en el presente estudio.

## **ANEXO C. GRÁFICOS**

Figura C1. Número de ufc/g de suelo seco para los tratamientos en estudio.

Figura C2. Número de bacterias aisladas en cada medio de cultivo según el origen de la muestra utilizada.

Figura C3. Número de bacterias aisladas en cada temperatura de incubación según el origen de la muestra.

- Figura C4. Número de actinomicetes aislados en cada medio de cultivo según el origen de la muestra a 26°C.
- Figura C5. Distribución de las bacterias Gram (+) y Gram (-) aisladas de acuerdo a los factores en estudio.
- Figura C6. Distribución de las bacterias con forma cocoide y bacilar aisladas de acuerdo a los factores en estudio.
- Figura C7. Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.
- Figura C8. Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.
- Figura C9. Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.
- Figura C10. Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.
- Figura C11. Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.
- Figura C12. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de las bacterias aisladas en este estudio.
- Figura C13. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de los actinomicetes aislados en este estudio.

## **ANEXO D. MEDIO DE CULTIVO Y SOLUCIONES**

Medios de cultivo

Soluciones Búfer

## **ANEXO E. TABLA DE COLORES**

## **ANEXO F. FOTOGRAFÍAS**

Aislamiento selectivo de la muestra de suelo en AN.

Aislamiento selectivo de la muestra de sedimentos de lago en AN.

Aislamiento selectivo de la muestra de arena de playa en AN.

## RESUMEN

Durante la determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida se logró aislar en cultivo puro, ciento cuarenta y un bacterias no filamentosas y 11 actinomicetes, teniendo como factores de estudio el origen de la muestra, la temperatura de aislamiento y el medio de cultivo utilizado para el aislamiento. De las ciento cuarenta y un bacterias aisladas, 70 se aislaron a partir de la muestra de arena de playa, 40 en suelos y 31 en sedimentos de lago. Seis de los once actinomicetes se aislaron a partir de la muestra de arena de playa, 4 fueron aislados en la muestra de suelo y 1 en la muestra de sedimentos de lago. Se logró aislar 13 bacterias psicrófilas y 78 psicrótrofas. Sin embargo la población de actinomicetes aislados presentó características mesofílicas en su totalidad. La taxonomía numérica de datos fenotípicos permitió obtener un número mayor de grupos que los obtenidos solo en base al color, mostrando así que la diversidad bacteriana estudiada es bastante amplia y que la adición de características fenotípicas permite delimitar con mayor precisión a los grupos-especie. El dendrograma obtenido al 90% de similaridad dividió a las 141 bacterias aisladas originalmente en 30 grupos-especie, por su parte el dendrograma basado en el coeficiente de similaridad calculado a partir de las pruebas fenotípicas de actinomicetes separó en 5 grupos-especie a los 11 actinomicetes aislados. Los datos obtenidos en la presente investigación demuestran la gran biodiversidad bacteriana y de actinomicetes en ecosistemas glaciares de la isla Greenwich y Dee abriendo las puertas al estudio de posibles rutas metabólicas que permitirían el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos útiles en biotecnología.



## CAPITULO I

### EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1. Tema de investigación

Determinación de la Biodiversidad Bacteriana en Ecosistemas Glaciares de la Antártida

#### 1.2. Planteamiento del problema

##### 1.2.1. Contextualización

###### 1.2.1.1. Macro

Durante las últimas décadas se ha incrementado considerablemente la investigación en microorganismos presentes en ambientes extremos, en especial bacterias y hongos que forman parte de la microbiota del Ártico y la Antártida. El interés se debe, a sus características especiales, o las propiedades de sus enzimas, que probablemente tienen un gran potencial como recursos de aplicación biotecnológica (González-Rocha *et al.*, 2010).

El continente antártico es el cuarto más grande del mundo, se extiende alrededor del Polo Sur en un radio aproximado de 4500 Kilómetros. Teniendo en cuenta las grandes plataformas glaciares que cubren los mares, la superficie total de continente es de 14.200.000 m<sup>2</sup> en verano. Durante el invierno la Antártida dobla su tamaño a causa de la gran cantidad de hielo que se forma debido al descenso drástico de temperatura (Quintana *et al.*, 1995).

El clima antártico está determinado por factores como la baja absorción de los rayos solares, la altura, la latitud y los vientos (Quintana *et al.*, 1995). La Antártida es el continente con el promedio de humedad y temperatura más bajas de nuestro planeta, por lo que se ha convertido en una región de gran interés científico, especialmente en áreas como la microbiología, donde las investigaciones han sido enfocadas al estudio de la biodiversidad bacteriana y a la producción de compuestos con aplicaciones biotecnológicas (Domínguez, 2008).

### **1.2.1.2. Meso**

Debido a su aislamiento geográfico y a su pronunciada gradiente latitudinal, la Antártida brinda excelentes oportunidades para investigar la diversidad y evolución microbiana. En este laboratorio natural, los microorganismos se encuentran sometidos a condiciones estresantes (bajas temperaturas, aridez, escasa disponibilidad de nutrientes, alta salinidad y radiación UV). Estos factores contribuyen a la selección de microorganismos con características bioquímicas únicas (Muñoz *et al.*, 2010).

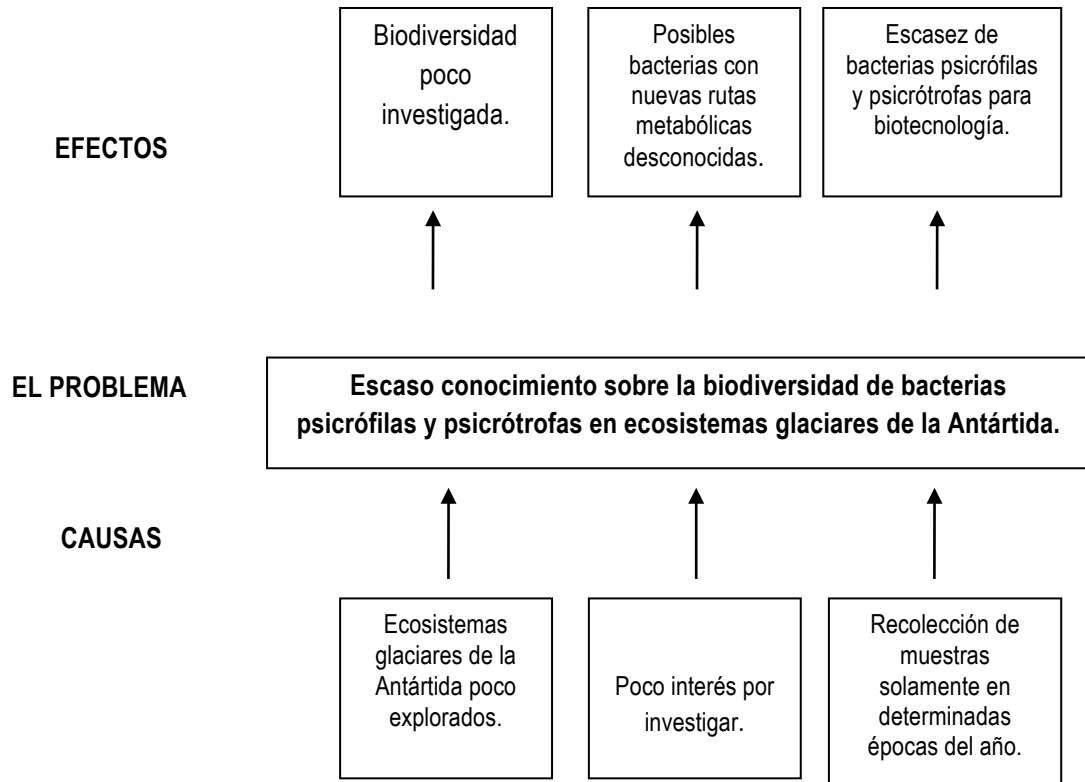
Las características fisiológicas y metabólicas que han desarrollado los microorganismos existentes en la Antártida, son el resultado de un proceso evolutivo durante miles de años, en un ambiente increíblemente extremo (Rogers, 2007). La biodiversidad y abundancia microbiana existente en la Antártida, probablemente se debe a una falta de competencia en términos ecológicos (Goff, 1999). Muy pocos organismos poseen la maquinaria celular para mantener un metabolismo óptimo en esas condiciones (Domínguez, 2008). Los microorganismos que habitan en la Antártida presentan múltiples adaptaciones, seguramente desarrolladas a través de un largo período, que les permite habitar bajo un clima que se caracteriza por su extrema severidad (Uribe, 1998).

### **1.2.1.3. Micro**

Entre los microorganismos capaces de soportar condiciones extremas de baja temperatura se pueden mencionar los psicrófilos y los psicrótrofos. Estudios recientes reportan la capacidad antagonista de bacterias psicrófilas asociadas con las esponjas antárticas *Anoxycalyx joubini* y *Lissodendoryx nobilis*, en donde tienen un rol importante en la modelación de la comunidad bacteriana asociada a los tejidos de la esponja. Esto confirma estudios anteriores acerca de la actividad antibacteriana de microorganismos antárticos (Domínguez, 2008) y representa la base para la investigación del papel ecológico y de la prospección biotecnológica de la región antártica (González-Rocha *et al.*, 2010).

## 1.2.2. Análisis Crítico

### 1.2.2.1. Diagrama Causa-Efecto



### 1.2.3. Prognosis

Sin la determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida, no sería posible el descubrimiento de bacterias con nuevas rutas metabólicas que permitan el desarrollo de nuevos compuestos, con aplicación biotecnológica en distintas áreas de importancia para la humanidad, entre las cuales se puede mencionar la industria alimenticia, agricultura, medicina, entre otros. Además, tampoco sería posible entender los mecanismos que han adquirido estas bacterias, para resistir a las condiciones extremas de temperatura y humedad a las que están sometidas en ecosistemas glaciares de la Antártida.

Por otra parte, no se aportaría con nuevas alternativas para resolver los problemas de resistencia bacteriana a antibióticos comúnmente usados en medicina, que en los últimos años se ha venido incrementando, llevando consigo una importante pérdida económica en cuanto al tratamiento y prevención de enfermedades.

#### **1.2.4. Formulación del problema**

¿Es posible determinar la biodiversidad bacteriana en muestras recolectadas en ecosistemas glaciares de la Antártida?

#### **1.2.5. Preguntas directrices**

- ¿Cómo se realiza el aislamiento selectivo de bacterias psicrófilas y psicrótrofas?
- ¿Qué pruebas se deben realizar para la caracterización macroscópica y microscópica de las bacterias aisladas?
- ¿Cómo se determina la similitud entre la población bacteriana mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos?

#### **1.3. Justificación**

La diversidad microbiana de la Antártida ha sido poco explorada en comparación con plantas y animales superiores que habitan en esta zona. Las condiciones extremas presentes en la región abren una gran oportunidad para realizar investigaciones científicas importantes en el campo de la microbiología, posibilitando aportes significativos hacia el desarrollo de antibióticos. Por otra parte, en los últimos años, el problema de resistencia bacteriana a los antibióticos se ha visto incrementado considerablemente. Se ha reportado que al ritmo actual la gran mayoría de antibióticos conocidos dejarán de ser efectivos en treinta años.

El desarrollo de nuevos antibióticos por parte de la industria farmacéutica ha tenido un desarrollo muy lento. La búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana producidos por bacterias procedentes de la Antártida, constituyen un campo importante, ya que se pueden encontrar poblaciones únicas de microorganismos capaces de producir nuevas sustancias antagonistas, incluyendo antibióticos de importancia y aplicación en diversas áreas como producción de alimentos, minería, procesamiento de basura, bioremediación ambiental, productos de interés para la agricultura y medicina.

Con la presente investigación se determinó la biodiversidad bacteriana de muestras procedentes de ecosistemas glaciares de la Antártida, en muestras terrestres como sedimentos, arena y suelos. En la actualidad, son muy pocos los estudios que se han realizado sobre biodiversidad en la Antártida. La mayoría de investigaciones se enfocan al estudio de zonas acuáticas, y a nivel macroscópico. Por ello, los microorganismos no han sido estudiados a profundidad. Por estas razones es necesario determinar la biodiversidad bacteriana en los ecosistemas glaciares

antárticos, porque es posible encontrar nuevas vías metabólicas que permitan desarrollar nuevos compuestos con actividad biológica. Los resultados que se alcanzaron en esta investigación, serán la base fundamental para encontrar nuevas especies de bacterias, con rutas metabólicas especiales que permitan el descubrimiento de compuestos antimicrobianos, que podrían ser utilizados como antibióticos o como biocidas en el control de bacterias patógenas multiresistentes a los antibióticos actualmente en uso.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. General**

- Determinar la biodiversidad bacteriana en muestras recolectadas de ecosistemas glaciales de la Antártida.

### **1.4.2. Específicos**

- Aislar bacterias psicrófilas y psicrótrofas de muestras de suelo, sedimentos y arena procedentes de ecosistemas glaciares de la Antártida.
- Caracterizar macroscópica y microscópicamente los diferentes cultivos bacterianos aislados.
- Determinar la similaridad entre la población bacteriana mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes investigativos

##### 2.1.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano

Hasta hace relativamente poco tiempo se creía que la vida, solo podía existir en un número limitado de ambientes, y en general, en condiciones normales de temperatura, pH, salinidad y presión (Castillo *et al.*, 2005). La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento y a la supervivencia de los microorganismos. A temperaturas muy frías o muy calientes los microorganismos no crecen, sin embargo, las temperaturas óptimas de crecimiento varían mucho entre los diferentes grupos de microorganismos y, principalmente reflejan el rango de temperaturas de sus hábitats naturales (Madigan *et al.*, 2004).

##### 2.1.1.1. Temperaturas cardinales

Madigan *et al.*, (2004), mencionan que la temperatura ejerce dos tipos de efectos opuestos sobre los organismos vivos. A medida que se eleva la temperatura las reacciones químicas y enzimáticas de la célula son más rápidas y por lo tanto, el crecimiento se acelera. Sin embargo, por encima de esta temperatura algunas proteínas sufren daños irreversibles, provocando la muerte celular. En consecuencia, dentro de un cierto margen, un aumento de temperatura supone un incremento en el crecimiento y metabolismo del microorganismo, pero fuera de éste, los efectos sobre la célula pueden ser catastróficos. Cada microorganismo tiene una temperatura óptima para su crecimiento, casi siempre relacionada con la temperatura de su hábitat. Se han definido también una temperatura mínima, por debajo de la cual no existe crecimiento, y una temperatura máxima, sobre la cual los microbios tampoco crecen debido a la desnaturalización de proteínas que provocan la muerte celular. Estas tres temperaturas se denominan temperaturas cardinales o fundamentales y son características de cada microorganismo, pudiendo variar por otros factores ambientales (Rodríguez *et al.*, 2005).

##### 2.1.2. Clases de microorganismos según la temperatura de crecimiento

Revilla (1982), afirma que para cada especie bacteriana hay una temperatura de crecimiento óptimo y según este criterio se clasifican en cinco grupos: psicrófilas, psicrótrofas o

psicrotolerantes, mesófilas, termófilas e Hipertermófilas.

#### **2.1.2.1. Microorganismos psicrófilos**

Los organismos con temperatura óptima de crecimiento de 15°C o inferior, se llaman psicrófilos. Estos organismos presentan una temperatura máxima de crecimiento por debajo de los 20°C y una temperatura mínima de crecimiento de 0°C o menor (Revilla, 1982). Los psicrófilos se encuentran en ambientes permanentemente fríos, como en las regiones polares y sedimentos marinos (Madigan *et al.*, 2004).

Algunos de los psicrófilos mejor estudiados son algas que crecen en masas densas entre o bajo el hielo de las regiones polares, además de estas algas de la nieve, se conocen bacterias psicrófilas quimioorganotrofas, muchas de las cuales proceden de la Antártida, como es el caso de bacterias del género *Flavobacterium* (Madigan *et al.*, 2004). Otras bacterias psicrófilas aisladas de hábitats distintos a los polares pertenecen a especies como *Achromobacter*, *Micrococcus* y *Pseudomonas*, (Maruyama *et al.*, 2000).

#### **2.1.2.2. Microorganismos psicrótrofos**

Los psicrótrofos, también llamados psicrófilos facultativos o psicrotolerantes, crecen a 0°C, sin embargo su temperatura óptima es de 20-40°C (Comerio *et al.*, 2007). Los microorganismos psicrótrofos tienen una distribución más amplia que los psicrófilos y se pueden aislar del suelo y aguas en climas templados, así como también de alimentos congelados como carne, leche y productos derivados (Madigan *et al.*, 2004). Varios géneros de bacterias, hongos y protozoos tienen representantes que son psicrotolerantes (Madigan *et al.*, 2004).

#### **2.1.3. Adaptaciones moleculares a condiciones de bajas temperaturas**

La adaptación de los microorganismos a condiciones ambientales extremas, los obliga a desarrollar componentes celulares y estrategias bioquímicas apropiadas (Soria *et al.*, 2008). La capacidad de los microorganismos psicrófilos y psicrótrofos para sobrevivir y proliferar a bajas temperaturas, implica que han superado barreras importantes para adaptarse a ecosistemas permanentemente fríos, como los que se encuentran en la Antártida. Algunas de las principales barreras que estos microorganismos han superado incluyen la reducción de la actividad enzimática, disminución de la fluidez de la membrana, disminución de la transcripción,

traducción y la división celular, desnaturalización de enzimas y formación de hielo intracelular (D'Amico *et al.*, 2006).

La disminución de la temperatura tiene un efecto adverso en las propiedades físicas y en la función de las membranas. Por lo general, conduce a una reducción de la fluidez de la misma y en última instancia conlleva a una pérdida de la función. La composición de lípidos gobierna las propiedades físicas de las membranas y por lo tanto no es sorprendente que esto cambie con el hábitat térmico del microorganismo. Diversos estudios sobre la composición de las membranas de los psicrófilos, han puesto de manifiesto que tienen un mayor contenido en ácidos grasos insaturados, poliinsaturados y metil-ramificados, lo que facilita el estado semifluido de las membranas a bajas temperaturas (D'Amico *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2004).

Por otro lado, las enzimas activas en frío o adaptadas al frío, son en general producidas por organismos que habitan en ambiente localizados en las zonas polares, a altas altitudes y en la profundidad de los océanos (Feller & Gerday, 2003). Los psicrófilos y psicrótrofos producen enzimas que funcionan óptimamente en el frío y que con frecuencia se desnaturalizan o inactivan incluso a temperaturas muy moderadas. Las bases moleculares de este hecho no se conocen por completo, pero se ha observado que en general, las enzimas activas en frío poseen mayor cantidad de hélices, y menor cantidad de hojas en su estructura secundaria, que las enzimas que son inactivadas en temperaturas bajas. En consecuencia, la mayor cantidad de hélices en las enzimas activas en el frío puede permitir mayor flexibilidad en esas condiciones. Estas enzimas activas en el frío también tienden a tener más aminoácidos polares y menos aminoácidos hidrofóbicos, lo que puede servir igualmente de ayuda para mantener la proteína flexible y enzimáticamente activa a bajas temperaturas (D'Amico *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2004).

#### **2.1.4. Importancia de microbios psicrófilos como productores de sustancias de interés biotecnológico**

Existe un enorme interés acerca de las proteínas estructurales y las enzimas metabólicas que son responsables de las propiedades inusuales de los microorganismos extremófilos. Pueden ser de mucha utilidad en biocatálisis para la síntesis de polímeros, productos farmacéuticos, agroquímicos, etc (Castillo *et al.*, 2005). En algunas ocasiones, el uso de enzimas de organismos mesófilos es limitado ya que ciertos procesos se tienen que llevar a cabo en condiciones en las que estas enzimas no son activas. En este sentido, el uso de enzimas derivadas de extremófilos



abre la posibilidad de su uso en procesos en los que no se pueden usar las técnicas tradicionales (Castillo *et al.*, 2005).

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 alimentación, en la obtención de nuevos pigmentos como aditivos alimenticios, o la producción de fármacos y detergentes (Comerio *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2005). Ciertas bacterias psicrófilas pueden formar omega-3 (ácidos grasos insaturados) de importancia dietética y pueden representar una fuente alimenticia de bajo costo, esta aplicación ha sido investigado recientemente por la industria (Nichols *et al.*, 2005). Por todo lo expuesto, el potencial de las bacterias psicrófilas para aplicación biotecnológica recibe cada vez una mayor atención (Castillo *et al.*, 2005)

Gran parte de la superficie terrestre experimenta bajas temperaturas. Los océanos, cuyas temperaturas medias oscilan entre los 5°C, representan más de la mitad de la superficie terrestre. Así la temperatura de las profundidades marinas va desde 1-3°C. Sin embargo, a pesar de estas condiciones extremas, estos ambientes fríos raramente son estériles y se encuentran microorganismos creciendo en estas superficies. En el Ártico y en la Antártida hay zonas que permanecen congeladas, o que se descongelan a lo largo del año, en estos ambientes se encuentran microorganismos vivos posiblemente con nuevas vías metabólicas, capaces de desarrollar nuevas sustancias de uso biotecnológico (Madigan *et al.*, 2004).

Desde esta perspectiva, el cambio climático que afecta al planeta ha puesto una ingente presión adicional para el descubrimiento de nuevos genes, especies y hábitats. La situación de la Antártica y el océano Austral al respecto es preocupante, porque no se conoce con exactitud lo que se desea preservar, a diferencia de otros lugares fundamentales para los estudios evolutivos, como las Islas Galápagos que han sido ampliamente estudiadas por científicos (Retamales, 2010).

Por sus únicas condiciones de aislamiento y bajas temperaturas, la Antártica alberga un potencial científico y biotecnológico enorme, pero también muchas barreras de entrada de diferente índole para los investigadores. Estos problemas retrasan los estudios en el campo de la microbiología y por lo tanto el desarrollo biotecnológico también se ve afectado. Entre las principales barreras se pueden mencionar la geografía y clima debido a que la Antártica, incluso en sus zonas más benignas, sigue siendo una región con condiciones extremas y puede ser

considerada como la última frontera de la Humanidad. A pesar de todos los adelantos tecnológicos actuales algunos aspectos como desplazamientos y permanencia siguen siendo muy difíciles y de alto riesgo en esta región. Otra consideración importante son las exigencias ecológicas, pues la ecología antártica es muy frágil, vulnerable y de difícil recuperación, por lo que el acceso a sus biorecursos debe tener un impacto ecológico extremadamente bajo. Finalmente, las capacidades científicas y el entorno regulatorio constituyen otra barrera de entrada debido a que, los conocimientos y la experiencia requerida para trabajar con microorganismos y plantas de ambientes muy fríos no son triviales y requieren años para adquirirse. Además la obtención de recursos para fines biotecnológicos en la Antártica es posible, pero no se debe incumplir los acuerdos internacionales que regulan la actividad humana en este continente (Blamey, 2008).

## **2.1.5. Biodiversidad en la Antártida**

### **2.1.5.1. Generalidades**

Debido a las condiciones extremas del clima de la Antártica, existe poca vegetación la cual está integrada por los llamados vegetales inferiores. Muy pocas especies vegetales han sido registradas en el 2% del continente que está libre de hielo. Estas especies incluyen alrededor de 30 musgos. Los líquenes constituyen otra parte importante de la microflora, con más de 150 especies descritas. Han proliferado significativamente en la Antártida posiblemente por la poca competencia que existe con relación a musgos y plantas con flores. (Streble *et al.*, 1998).

En cuanto a plantas superiores, solo dos plantas vasculares nativas de la Antártida *Deschampsia antarctica* (pasto antártico) y *Colobanthus quitensis* sobreviven en pequeños grupos en las orillas de la costa oeste de la Antártida, ambas especies son capaces de tolerar condiciones extremas de temperatura y humedad. Continúan activas en su punto de congelación cuando el rendimiento de conversión de energía solar en energía química es del 30 al 40 por ciento durante las condiciones más favorables (Asociación Civil Antarkos, 1998; Streble *et al.*, 1998).

Por otra parte, la fauna es muy escasa en el continente, pero abunda en el océano que lo rodea. El mar es directa o indirectamente la única fuente de recursos para los animales que habitan en forma transitoria o permanente en la Antártida. Especies de focas, aves y algunos pingüinos solo ocupan la zona costera del continente que se descubre de hielo en el verano. Tan sólo el pingüino Emperador ha logrado adaptarse a las extremas condiciones de temperaturas y vientos en el continente (Instituto Antártico Peruano, 2003). Entre las especies que viven en el Océano

Antártico, destaca el krill, un pequeño crustáceo de 3 centímetros de largo que es la base de la cadena ecológica Antártica y la fuente alimenticia de casi todas las demás especies focas, ballenas, aves, pingüinos, entre otros (Streble *et al.*, 1998).

#### **2.1.5.2. Biodiversidad microbiana**

Las condiciones extremas hacen de la Antártida un hábitat donde solo los más fuertes pueden sobrevivir. A pesar de presentar esto, se ha convertido en una interesante región para investigaciones científicas en el campo de la microbiología (Domínguez, 2008). La adaptación al frío es a menudo combinada con otras adaptaciones como, altas concentraciones de sales, presión osmótica e hidrostática regulada, disponibilidad de nutrientes, resistencia a la radiación ultravioleta, entre otras. A pesar de estos retos, la vida se desarrolla en estos entornos con una gran biodiversidad microbiana, principalmente de bacterias, hongos (en particular, las levaduras) y microalgas (D'Amico *et al.*, 2006). El ecosistema de la Antártida es altamente endémico, y la biodiversidad y abundancia de grupos taxonómicos, se diferencian de los encontrados en cualquier otra parte del mundo. Tales características son el resultado de la evolución en un ambiente cada vez más extremo (Rogers, 2007).

Dentro de este contexto los hongos han sido poco estudiados, se conocen unas 75 especies entre las cuales se puede mencionar *Acremonium furcatum*, *Acremonium fusidiaides*, *Acrospeira*, *Geomyces pannorum*, *Gliomastix murorum*, *Mortierella alpina*, *Mortierella humilis*, *Mortierella parvispara*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium steckii*, *Penicillium thomii*, *Phialophora*, *Phoma*, *Rhizocrtonia*, *Trichoderma* y *Verticillium psoalliotae*. Estas especies están asociadas con el suelo de la Antártida. (Asociación Civil ANTARKOS, 1998; Quintana *et al.*, 1995). Del mismo modo, se identificaron hongos de la clase de los basidiomycetes como *Galerina antarctica*, *Galerina longingua*, *Galerina moelleri*, *Galerina perrara* y *Omphalina antártica* (Quintana *et al.*, 1995).

De igual forma se están estudiando las especies de bacterias que habitan en la Antártida, comprobándose que se encuentran cianobacterias, mientras que, los bacilos, formadores de esporas y aquellos del grupo *Flavobacterium* son escasos (Asociación Civil ANTARKOS, 1998). Bowman *et al.*, (1997) aislaron bacterias psicrófilas y psicrótrofas de muestras de hielo y agua de la Antártida. Se determinó que las bacterias psicrófilas recolectadas pertenecen a los géneros *Colwellia*, *Marinobacter*, *Planococcus* y *Shewanella* mientras que, las cepas aisladas de bacterias psicrótrofas pertenecen a los géneros *Arthrobacter*, *Halobacillus*, *Halomonas*,

*Hyphomonas*, *Planococcus*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*. Otras bacterias que se han detectado en este ambiente son especies pertenecientes a *Proteobacteria* principalmente *Pseudomonas* y *Vibrio*. Las bacterias generalmente dominan en número y diversidad en comparación con las arqueas, aunque en algunas zonas como en aguas profundas del mar, estos se encuentran en un número equivalente. *Methanococcus* y *Methanogenium* son los géneros de arquea más citados (D'Amico *et al.*, 2006).

Otros microorganismos como levaduras psicrófilas, especialmente del género *Cryptococcus*, han sido aislados en varias ocasiones a partir de muestras del suelo y algunos investigadores consideran que las levaduras son las formas de vida más importante en los suelos del desierto antártico (D'Amico *et al.*, 2006). Las levaduras antárticas representan una potencial herramienta ecológica como fuente de enzimas y metabolitos de interés biotecnológico (Baeza *et al.*, 2010).

Los lagos de la Antártida, han sido los más estudiados en cuanto a biodiversidad, estos se extienden de agua dulce a hipersalina, con características físicas y químicas constantes, lo que los convierte en laboratorios naturales para estudiar la evolución y la biodiversidad. Los estudios moleculares sobre comunidades aisladas de lagos Antárticos, están aún en una fase preliminar, sin embargo hay pruebas claras de la existencia de algunos grupos taxonómicos, como cianobacterias, entre las que se han identificado *Oscillatoria*, *Phormidium* and *Nostoc commune* (Laybourn & Pearce, 2007).

#### **2.1.6. Aislamiento selectivo de bacterias psicrófilas y psicrótrofas**

El crecimiento de los microorganismos no se puede estudiar individualmente debido a su tamaño tan pequeño, por lo que es necesario recurrir a medios nutritivos artificiales donde se puedan desarrollar rápidamente y formar grandes poblaciones para su fácil manipulación (Olivas, 2004). En un ambiente natural no es frecuente encontrar un solo tipo de microorganismos, lo que existen son comunidades bacterianas. La separación de cada una de las variedades existentes en una comunidad es lo que se conoce como aislamiento de microorganismos (Hernández *et al.*, 2003; Madigan *et al.*, 2004).

Cada microorganismo tiene requerimientos nutricionales de temperatura y pH, que van de acuerdo a su hábitat natural. Por ejemplo, en el caso de muestras aisladas de ecosistemas glaciares de la Antártida se sabe que microorganismos como los psicrófilos mueren rápidamente si se exponen a temperatura ambiente normal, por esta razón, su estudio en laboratorio requiere

un gran cuidado para estar seguros de que no se calienten durante el muestreo, el transporte, el aislamiento y otras manipulaciones (Madigan *et al.*, 2004).

Ciertas investigaciones se han realizado para determinar la diversidad y asociación de bacterias psicrófilas en muestras de hielo y agua de la Antártida, como la realizado por Bowman *et al.*, (1997). En este estudio, para el aislamiento de bacterias psicrófilas, se fundió el hielo con agua de mar, en volúmenes iguales, a una temperatura de 2°C a 4°C, para evitar un choque osmótico. El hielo descongelado y la muestra de agua de mar se diluyeron en medio líquido a 2°C y se incubaron por 2 días, este paso se realiza para recolectar las cepas psicrófilas que tienen un crecimiento más lento en medio sólido. Finalmente, las bacterias psicrotolerantes fueron cultivadas en agar marino a 10°C, mientras que las bacterias psicrófilas fueron cultivadas a 4°C. Se determinó que la taxonomía psicrófila de muestras de agua de mar fue en general, filogenéticamente distinta a la taxonomía psicrófila de aislamientos de muestras de hielo marino. Por otra parte, la distribución taxonómica de bacterias psicrotrofas aisladas en muestras de hielo marino y de agua de mar fue muy similar (Bowman *et al.*, 1997).

Clocksini *et al.*, (2007), aislaron bacterias quimiorganotrofas activas en frío, de zonas permanentemente cubiertas de hielo en el lago Hoare de la Antártida. Las muestras de agua se inocularon en 25 ml de medio de cultivo líquido R2A (proteasa peptona, 0.5 g; casaminoácidos 0.5 g; extracto de levadura 0.5 g; dextrosa, 0.5 g; almidón soluble, 0.5 g; fosfato di-potásico, 0.3 g; sulfato de magnesio 7H<sub>2</sub>O, 0.05 g; piruvato de sodio, 0.3 g; agar, 15 g; pH final ajustado a 7.2±0.2) o en medio de almidón preparado en Erlenmeyers de 125 ml. El medio de cultivo de almidón es suplementado con sales minerales del medio R2A y complementado con 50 mg de extracto de levadura, 25 mg de CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.5 g de NaCl, 0.5 g de NH<sub>4</sub>Cl y 1 g de almidón soluble. Ocho cepas de bacterias quimiorganotrofas fueron aisladas de la muestra de agua del lago Hoare. Todos los aislamientos, a excepción de uno, crecieron a 0°C. La temperatura óptima de crecimiento varió entre los aislamientos, pero la mayoría mostró temperatura óptima cerca de 15°C, indicativo de fenotipos activos en frío. Una cepa era verdaderamente psicrófila, creciendo de manera óptima entre a 10°C y 20°C. Cuatro de las ocho cepas crecieron a una concentración de sal del 2%.

Straka & Stokes (1960), aislaron bacterias psicrófilas de muestras recolectadas en la Antártida. Las muestras se diluyeron al 0.1% en una superficie de peptona y se sembraron en agar soya tripticasa, se incubaron a 0°C por 14 días. El recuento de bacterias psicrófilas por gramo de muestra fue de 20000, 2000, 1000, 700 y <100 en distintas muestras de suelo procedentes de la

Antártida. La mayoría de bacterias aisladas presentaron morfologías de cocos y bacilos, gram-negativos e inmóviles.

También se han aislado bacterias psicrófilas de otras ambientes diferentes a los polares. Larkin & Stokes, 1966, aislaron especies psicrófilas de *Bacillus* de muestras de suelo, sedimentos y agua. Para las muestras de suelo y sedimentos se hizo dilución 1:10 en peptona estéril al 0.1% y se calentaron a 80°C durante 10 minutos para destruir las células vegetativas. La muestra de agua se calentó sin previa dilución. 5 ml de cada muestra calentada fueron inoculados en 25 ml de caldo de cultivo soya tripticasa en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se incubó durante 2 semanas a 0°C. Las células que presentaron crecimiento fueron sembradas en agar soya tripticasa en las mismas condiciones. Las colonias que crecieron se replicaron varias veces para asegurar la pureza y se trasladaron a medio de cultivo fresco de agar nutritivo. Se evaluó su capacidad de crecimiento a 0°C y a su temperatura máxima mediante incubación en agar soya tripticasa y de cultivos en agar inclinado de 0 a 50°C a intervalos de 5°C. Se aislaron noventa cepas de *Bacillus* todas crecieron bien a 0°C, también a 20-25°C, pero no existió crecimiento a 30-35°C, el aislamiento de *Bacillus* psicrófilos también se produjo a -2 y -4.5°C donde se adicionó 7.5% de glicerol en el agar soya tripticasa.

### **2.1.7. Taxonomía Numérica**

Una disciplina importante en microbiología es la clasificación microbiana, también conocido como taxonomía. La clasificación permite a los microbiólogos establecer relaciones entre diferentes microorganismos (Madigan *et al.*, 2004). La taxonomía microbiana a evolucionado significativamente, a partir del avance visto en los últimos años en el campo de la secuenciación del ARNr y la codificación de genes ARNr (ADNr) microorganismos (Vandamme *et al.*, 1996). Este tipo de estudios comprenden la taxonomía molecular que ha sido más usada debido a un acceso más fácil y con menos costo, para su realización.

En taxonomía numérica se relacionan datos fenotípicos, que comprenden características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Las características morfológicas incluyen características celulares y de colonia. Dentro de las principales características celulares se puede mencionar la forma, presencia de endosporas y flagelos y tinción de Gram. Las características de la colonia que se toman en cuenta son por ejemplo, el color, la forma y el tamaño.

Las características fisiológicas y bioquímicas incluyen datos sobre crecimiento en diferente rango de temperatura, pH, condiciones atmosféricas, concentraciones de sal, crecimiento en presencia de sustancias como antibióticos, entre otras (Vanderzant *et al.*, 1972). Una vez obtenidos los resultados de las pruebas los cultivos se evalúan con la presencia o ausencia de crecimiento (positivo o negativo), es común también utilizar un sistema de código binario 1, para indicar presencia y 0, para indicar ausencia de crecimiento (Vanderzant *et al.*, 1972). A estos resultados se les aplica un análisis numérico computarizado, con programas que calculan el coeficiente de similitud entre los cultivos estudiados (Moura *et al.*, 1999). Los árboles de clasificación o dendrogramas son la representación universal más empleada para plasmar los resultados de los agrupamiento entre los datos fenotípicos de las distintas cepas microbianas y permiten determinar el porcentaje de similitud (Herrera, 2000). Existen distintos tipos de coeficientes utilizados para la construcción de dendrogramas (Tabla 1), los más utilizados son el coeficiente de similaridad simple ( $S_{SM}$ ) y el coeficiente de Jaccard (J) (Moura *et al.*, 1999).

**Tabla 1.** Coeficiente de similaridad.

Coeficiente	Expresión
Coeficiente de similaridad simple ( $S_{SM}$ )	$\frac{a + b}{a + b + c + d}$
Coeficiente de Jaccard (J)	$\frac{a}{a + b + c}$

**Fuente:** Moura *et al.*, 1999.

Por ser un método de caracterización fenotípica la taxonomía numérica no se considera un método del todo confiable. Por esta razón, se recomienda utilizar taxonomía polifásica, que integra diferentes tipos de datos e información (fenotípica, genotípica y filogenética) sobre los microorganismos (Vandamme *et al.*, 1996). Bowman *et al.*, (1997), investigaron la diversidad y asociación de bacterias psicrófilas en muestras de hielo y agua de la Antártida.

En este estudio las poblaciones bacterianas fueron analizadas por medio de un enfoque fenotípico y genotípico basado en la codificación de genes 16S ARNr (16S ADNr).

## 2.2. Fundamentación filosófica

La presente investigación se basa en el paradigma positivista que fue creado para estudiar los fenómenos en el campo de las ciencias naturales. Tiene como escenario de investigación el

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

Para el paradigma positivista el estudio del conocimiento existente en un momento dado conduce a la formulación de nuevas hipótesis, en la cuales se interrelacionan variables, cuya medición cuantitativa, permitirá comprobarlas o refutarlas en el proceso de investigación.

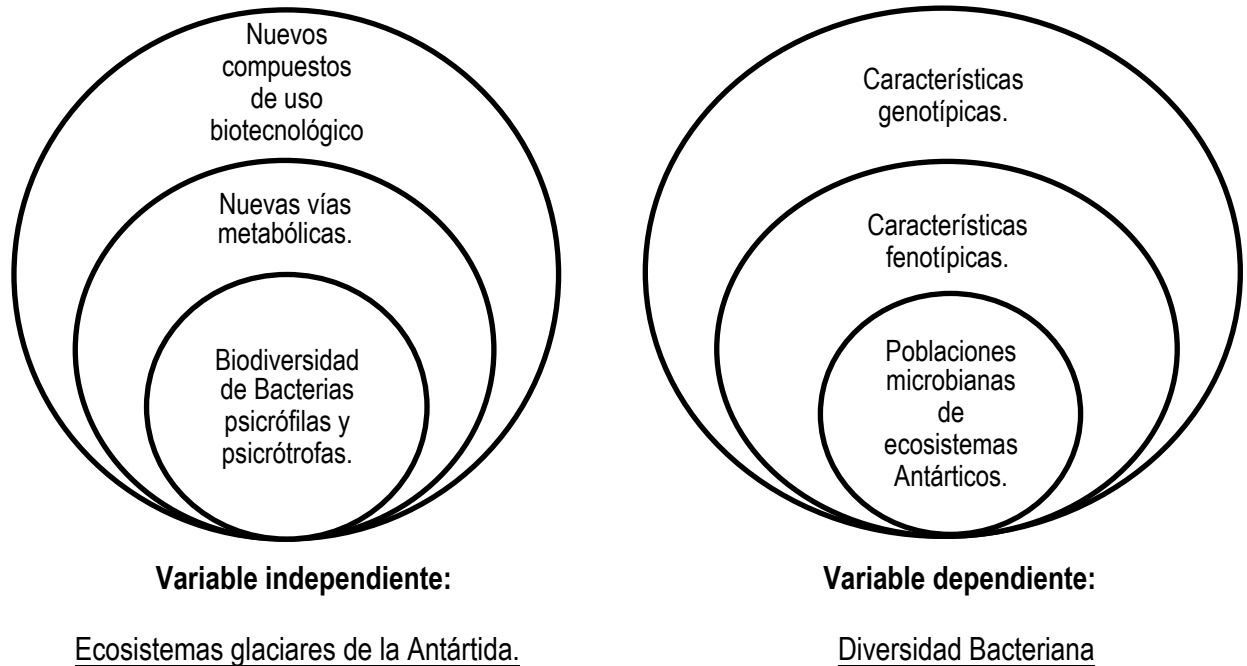
### **2.3. Fundamentación legal**

El presente trabajo se apoya en la ley para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad en el Art.1. La Ley para la Conservación y Uso Sustentable de la Biodiversidad tiene por objeto proteger, conservar, restaurar la biodiversidad y regular e impulsar su utilización sustentable; establece los principios generales y normas para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad y sus servicios, el acceso a los recursos genéticos, la bioseguridad, la rehabilitación y restauración de ecosistemas degradados y la recuperación de especies amenazadas de extinción, y los mecanismos de protección de los derechos sobre la biodiversidad en materia administrativa, civil y penal. Por otra parte, el 28 de enero de 1982, la Cámara Nacional de Representantes, por intermedio de la Comisión Especial de Asuntos Internacionales recomienda la adhesión por parte de Ecuador al Tratado Antártico, así como expresa que se reserven los derechos de soberanía de los ecuatorianos sobre el continente.

El Tratado Antártico y otros acuerdos relacionados como la Convención para la Conservación de Focas Antárticas CCFA, la Convención para la Conservación de Recursos Vivos Marinos Antárticos CCRVMA y el Protocolo al Tratado Antártico sobre Protección del Medio Ambiente o Protocolo de Madrid, colectivamente denominados como Sistema del Tratado Antártico, regula las relaciones internacionales con respecto a la Antártida. En el Artículo 2 de este tratado se da libertad de investigación científica en la Antártida.



## 2.4. Categorías fundamentales



## 2.5. Hipótesis

### 2.5.1. Hipótesis nula

- La biodiversidad bacteriana en muestras recolectadas de ecosistemas glaciares de la Antártida es escasa.

### 2.5.2. Hipótesis alternativa

- Exista abundante biodiversidad bacteriana en muestras recolectadas de ecosistemas glaciares de la Antártida.

## 2.6. Señalamiento de variables de la hipótesis

- Número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de muestra (ufc/g).
- Diversidad de colonias en los medios de cultivo.
- Medios de aislamiento y purificación de bacterias procedentes de muestras de ecosistemas glaciares de la Antártida.
- Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos.
- Pruebas de crecimiento relacionado a temperatura.
- Pruebas de crecimiento relacionado a pH.
- Pruebas de crecimiento relacionado a la salinidad.

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1. Enfoque**

La presente investigación tiene un enfoque predominante cuantitativo.

#### **3.2. Modalidad básica de la investigación**

Experimental.

#### **3.3. Nivel o tipo de investigación**

Básica exploratoria.

#### **3.4. Población y muestra**

Se usaron muestras recolectadas durante el verano antártico 2011, en la XV expedición ecuatoriana a la Antártida y corresponden a muestras de suelo, arena de playa y sedimentos de lagos interiores de la isla Greenwich y Dee.

#### **3.5. Operacionalización de variables**

(Ver página siguiente).

#### **3.6. Plan de recolección de información**

##### **3.6.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales**

###### **3.6.1.1. Determinación del pH y Conductividad de las muestras**

Para determinar el pH y conductividad de las muestras, se pesó 20 gramos de suelo, y se colocó en un vaso de precipitación de 100 ml. Se añadió 50 ml de agua destilada, y se mezcló con una cuchara por el lapso de 5 minutos. Las muestras se dejaron en reposo por una hora. Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a tomar las lecturas correspondientes de las muestras, con la ayuda de un pH-metro y un conductímetro.

HIPÓTESIS	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	ÍNDICES	INSTRUMENTOS
La biodiversidad bacteriana en muestras recolectadas de ecosistemas glaciares de la Antártida es escasa.	Independiente: Ecosistemas glaciares de la Antártida	Población y diversidad microbiana en las diferentes muestras recolectadas en la Antártida	Población Bacteriana	Número de UFC/g	Calculadora
	Dependiente: Diversidad Bacteriana	Características fenotípicas como producto de la expresión visible de los genes de cada individuo.  Tipo de metabolismo en cada una de las bacterias aisladas	Características macroscópicas  Características microscópicas  Rango de crecimiento de acuerdo a temperatura y pH Perfil metabólico para la producción de enzimas extracelulares	Coloración del reverso de la colonia, micelio aéreo y cualquier producción de pigmento difusible  Tinción de Gram, Cápsulas y endosporas  Valores de pH y Temperatura  Presencia o ausencia de halos alrededor del sitio de inoculación	Tabla de colores Microsoft Excel.  Microscopio  pHmetro  Incubadores

Elaborado por Diana Garzón, 2012.

### **3.6.1.2. Determinación del porcentaje de humedad de las muestras**

Para la determinación del porcentaje de humedad se pesó previamente las cápsulas de porcelana utilizada y se colocó en éstas 5 gramos de suelo de cada una de las muestras, se registró el peso total (Peso 1). Las cápsulas de porcelana con las muestras se colocaron en una estufa y se las sometió a 105° C por 24 horas. Al retirar las muestras se las dejó enfriar y se procedió a pesar nuevamente (Peso 2). El porcentaje de humedad se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{Peso\ 1 - Peso\ 2}{Peso\ 2} \times 100$$

Todos los cálculos involucran únicamente los pesos de agua y suelo, por lo que el peso de la cápsula de porcelana fue restado.

### **3.6.1.3. Determinación del porcentaje de materia orgánica de las muestras**

Para la determinación del porcentaje de materia orgánica en las muestras se pesó previamente las cápsulas de porcelana utilizadas y se colocó en éstas 5 gramos de suelo de cada una de las muestras. Estas se colocaron en una estufa y se las sometió a 105°C por 24 horas. Al retirar las muestras se las dejó enfriar y se procedió a pesar nuevamente (Peso 1). Las muestras procedentes de la estufa se colocaron en una mufla, a 400°C por 3 horas. Al término de este tiempo se dejó enfriar y finalmente se obtendrá el peso final (Peso 2). El porcentaje de materia orgánica se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%m.o = \frac{Peso\ 1 - Peso\ 2}{Peso\ 2} \times 100$$

Todos los cálculos involucran únicamente el peso del suelo, por lo que el peso de la cápsula de porcelana fue restado.

## **3.6.2. Aislamiento selectivo de bacterias psicrófilas y psicrótrofas**

### **3.6.2.1. Determinación de la población y diversidad bacteriana**

Cada una de las muestras se usó para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) por gramo de muestra y la diversidad de bacterias. Para ello se usó el método de difusión en placa y diluciones. Para preparar la dilución 1/10 se pesó 10 gramos de suelo y se

colocó en una botella que contenía 90 ml de agua de llave estéril. La suspensión resultante se agitó por 1 hora. Una vez transcurrido éste tiempo se prepararon las diluciones 1/10<sup>2</sup> y 1/10<sup>3</sup>. Cien microlitros (100 µl) de las diluciones 1/10, 1/10<sup>2</sup> y 1/10<sup>3</sup> se colocaron y se extendieron por duplicado, sobre la superficie de cajas petri que contenían agar nutritivo (AN) y agar agua de llave, cada uno suplementado con nistatin, a una concentración de 75 µg/ml, y ajustado su pH a 7,0. Las cajas inoculadas son incubaron a 4°C y a 26°C por dos semana. Luego de la incubación se procedió a contar el número de colonias de bacterias presentes en cada una de las cajas. Además se anotó el número de colonias diferentes. El número de ufc por gramo de suelo se calculó para aquellas diluciones en las que el número de colonias se encontraba en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$UFC/g \text{ de suelo} = \frac{N * FD * Vt}{Vi * S}$$

Donde:

- N** Número de colonias
- FD** Dilución en la cual se contó N (Ej: Conteo realizado en la dilución 1/10<sup>3</sup>, FD = 1x10<sup>3</sup>)
- Vt** Volumen de la dilución 1/10, en mililitros
- Vi** Volumen inoculado, en mililitros
- S** Cantidad de suelo utilizada para preparar la dilución 1/10

### **3.6.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento de bacterias psicrófilas y psicrótrofas**

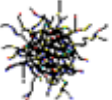



Los platos que presentaron crecimiento visible y diversidad de colonias de bacterias se escogieron para proceder con el aislamiento y purificación de las cepas. Con la ayuda de un palillo estéril se tomó una colonia, y se inoculó mediante estría simple en platos tetrapetri que contenían AN. Los platos fueron incubados a la temperatura óptima de crecimiento que se determinó para cada grupo de bacteria, por una semana. Aquellos cultivos puros fueron repicados en estría compuesta en nuevos platos con medio de cultivo. Mientras que para aquellos cultivos que presentaban contaminación se uso el método de dilución y difusión en placa. Se tomaron 100 microlitros de la dilución 1/10<sup>4</sup> y 1/10<sup>5</sup> y se inocularon en platos que contenían AN. Aquellos que luego del período de incubación presentaron características de cultivo puro, fueron etiquetados y posteriormente se almacenó en tubos plásticos que contenían

1 mililitro de glicerol al 20% (w/v) y almacenados a -10°C en un congelador, para su preservación a largo plazo.

### 3.6.4. Caracterización macroscópica de los cultivos aislados

Los cultivos puros obtenidos se agruparon de acuerdo a la morfología y coloración de las colonias, los que se determinaron usando una tabla estándar de colores (Anexo E). Las características generales de las colonias fueron descritas de acuerdo a la Tabla 2. Aquellas cepas que presentaron características macroscópicas similares fueron ubicadas en un mismo grupo.

**Tabla 2.** Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen.

<b>Forma</b>	 Circular	 Irregular	 Lentijuela	 Filamentosa	 Rizoide
<b>Elevación</b>	 Plana		 Convexa		 Umbonada
<b>Margen</b>	 Entero	 Ondulado	 Lobado	 Filamentoso	 Rizado

### 3.6.5. Caracterización microscópica de los cultivos aislados

Los cultivos puros de las bacterias se usaron para preparar muestras que fueron observadas bajo el microscopio. Se determinó tinción de Gram, presencia de endosporas y cápsulas. Además se determinó forma de la célula bacteriana.

### 3.6.6. Pruebas fisiológicas de crecimiento

#### 3.6.6.1. Rango de crecimiento en Función de la Temperatura

Se inocularon 3 µl de las suspensiones de células previamente preparadas, sobre la superficie de AN. Para aquellas bacterias que presentaron crecimiento a 4°C, los platos fueron incubados a una temperatura de 26°C, 37°C y 50°C durante 7 días. Mientras que aquellas bacterias que

presentaron crecimiento a 26°C fueron incubadas a una temperatura de 4°C, 37°C y 50°C durante el mismo tiempo. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluó las cajas para observar el crecimiento de las bacterias, mediante código binario. A la bacteria que presentó crecimiento, se le asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0. La clasificación de las bacterias en función de la temperatura fue establecido a partir de la siguiente Tabla 3 que se muestra a continuación.

**Tabla 3.** Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.

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

### 3.6.6.2. Rango de crecimiento en Función del pH

Se inoculó 3 µl de las suspensiones de células en la superficie de AN, ajustado a los pHs 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5. El pH se ajustó con la ayuda de sistemas de búferes, evitando cambios en el pH debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas fueron incubadas de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias, que se determinó en la parte anterior. El tiempo de incubación fue de una semana. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluó las cajas para observar el crecimiento de bacterias. Esta evaluación se realizó mediante código binario. A la bacteria que presentó crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0. La clasificación de las bacterias en función del pH del medio de cultivo fue establecido a partir de los datos de la Tabla 4.

### 3.6.6.3. Rango de crecimiento en Función de la salinidad

Se inoculó 3 µl de las suspensiones de células en la superficie de AN que contenía 1, 5 y 10% de NaCl (w/v). Las cajas se incubaron de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias, que se determinó anteriormente, el tiempo de incubación fue de una semana.

Transcurrido este tiempo se evaluó las cajas para observar el crecimiento de bacterias. Esta evaluación se realizó mediante código binario. Si la bacteria presentó crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0. La clasificación de las bacterias en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo fue establecido a partir la Tabla 5.

**Tabla 4.** Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función del pH del medio.

pH del medio					Clasificación
4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	
+	+	-	-	-	Acidófilo
+	+	+	-	-	Neutrotolerante
+	+	+	+	-	Neutrotolerante
-	+	+	+	-	Neutrófilo
-	-	+	+	-	Neutrófilo
-	-	+	-	-	Neutrófilo
-	+	+	+	+	Alcalitolerante
-	-	+	+	+	Alcalitolerante
-	-	-	+	+	Alcalófilo

**Tabla 5.** Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

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

### 3.7 Plan de procesamiento y análisis de la información

#### 3.7.1 Diseño experimental

Se estudiaron tres factores, usando un diseño completamente al azar con 2 repeticiones. Los factores en estudio fueron:



**Factor A:** Tipo de muestras

a<sub>0</sub> Muestra compuesta de suelo

a<sub>1</sub> Muestra compuesta de sedimentos de lago

a<sub>2</sub> Muestra compuesta de arena de playa

**Factor B:** Temperatura de incubación

b<sub>0</sub> 4°C

b<sub>1</sub> 26°C

**Factor C:** Medio de cultivo

c<sub>0</sub> Agar nutritivo

c<sub>1</sub> Agar agua de llave

En la tabla 6 se muestran los tratamientos producto de la combinación de los factores en estudio.

**Tabla 6.** Tratamientos en estudio.

<b>Tratamientos</b>	<b>A: Tipo de muestra</b>	<b>B: Temperatura de crecimiento</b>	<b>C: Medio de Cultivo</b>
a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	Muestra compuesta de suelo	4°C	Agar Nutritivo
a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>1</sub>	Muestra compuesta de suelo	4°C	Agar Agua de Llave
a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>0</sub>	Muestra compuesta de suelo	26°C	Agar Nutritivo
a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	Muestra compuesta de suelo	26°C	Agar Agua de Llave
a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	Muestra compuesta de sedimentos de lago	4°C	Agar Nutritivo
a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>1</sub>	Muestra compuesta de sedimentos de lago	4°C	Agar Agua de Llave
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>0</sub>	Muestra compuesta de sedimentos de lago	26°C	Agar Nutritivo
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	Muestra compuesta de sedimentos de lago	26°C	Agar Agua de Llave
a <sub>2</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	Muestra compuesta de arena de playa	4°C	Agar Nutritivo
a <sub>2</sub> b <sub>0</sub> c <sub>1</sub>	Muestra compuesta de arena de playa	4°C	Agar Agua de Llave
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>0</sub>	Muestra compuesta de arena de playa	26°C	Agar Nutritivo
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	Muestra compuesta de arena de playa	26°C	Agar Agua de Llave

Se utilizaron 3 muestras compuestas formadas a partir de suelo, sedimentos y arena de playa. A partir de ellas se preparó diluciones las cuales fueron inoculadas sobre cajas petri que contenían medio de cultivo estéril. Las cajas se incubaron a dos temperaturas. Con los resultados obtenidos se realizó el análisis de varianza para la población y diversidad de bacterias psicrófilas y psicrótrofas en Agar nutritivo y Agar agua de llave como medio de cultivo. Se procedió a realizar un análisis de varianza (Tabla 7) para establecer si existen diferencias significativas, en cuyo caso se procedió a realizar la separación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

**Tabla 7.** Esquema del análisis de varianza.

Fuente de Variación	Grados de libertad
Factor A	(a-1)
Factor B	(b-1)
Factor C	(c-1)
AB	(a-1) (b-1)
AC	(a-1) (c-1)
BC	(b-1) (c-1)
ABC	(a-1)* (b-1)*(c-1)
Error	(abc)*(r-1)
Total	(abc*r)-1

### 3.7.2 Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Con los resultados de las pruebas fenotípicas se construyó una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas. La información se procesó en el software estadístico NTSys, en el que primeramente se calculó los porcentajes de similitud, usando el coeficiente de similitud simple ( $S_{SM}$ ). Finalmente los porcentajes se utilizaron para construir un dendrograma mediante el uso del algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) del mismo programa. Una vez obtenido éste gráfico, se identificó los grupos especie basados en una similitud mayor al 90%. Aquellas que comparten este valor de similitud se consideraron como miembros de un mismo grupo-especie.

**Tabla 8.** Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de bacterias.

#	Prueba	Descripción	Código
1	Color de la colonia	Marfil	Ma
2		Ocre oro	Ocr
3		Crema	Cre
4		Amarillo canario	Aca
5		Amarillo oro	Aor
6		Amarillo cadmio	Acd
7		Amarillo	Amr
8		Amarillo Piel	ApI
9		Verde Manzana	Vma
10		Coral	Cor
11		Ladrillo	Lad
12		Mandarina	Man
13		Blanco cremoso	Bcr
14		Melocotón	Mlo
15		Salmón	Sal
16		Rosa té	Rsa
17		Amarillo limón	Aml
18		Amarillo cremoso	Acr

**Tabla 8. Continuación.....**

19		Sienna Natural	Sna
20	Forma de la colonia	Irregular	Irr
21		Circular	Cir
22	Elevación de la colonia	Plana	Pla
23		Convexa	Con
24		Umbonada	Umb
25	Margen de la colonia	Lobado	Lob
26		Ondulado	Ond
27		Entero	Ent
28	Forma	Bacilos	Bac
29		Cocos	Coc
30	Tinción	Gram (+)	G+
31		Gram (-)	G-
32		Cápsulas	Cap
33	Temperatura de Incubación	4°C	4°C
34		26°C	26°C
35		37°C	37°C
36		50°C	50°C
37	Rango de crecimiento en función del pH	4,5	4,4
38		5,5	5,5

**Tabla 8. Continuación.....**

39		6,5	6,5
40		7,5	7,5
41		8,5	8,5
42	Rango de crecimiento en función de la Salinidad	1%	1%
43		5%	5%
44		10%	10%

**Tabla 9.** Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes.

#	Prueba	Descripción	Código
1	Micelio Aéreo	Blanco	Bla
2		Lavanda	Lav
3		Gris	Grs
4	Micelio de Sustrato	Melocotón	Mlo
5		Amarillo Piel	Apl
6		Plata	Pla
7		Gris lunar	Glu
8		Marfil	Mar
9	Forma de la cadena	Recta	Rec

Tabla 9. Continuación.....

10		Incompleta	Inc
11	Temperatura de Incubación	4°C	4°C
12		26°C	26°C
13		37°C	37°C
14		50°C	50°C
15		4,4	4,4
16	Rango de crecimiento en función del pH	5,5	5,5
17		6,5	6,5
18		7,5	7,5
19		8,5	8,5
20		Rango de crecimiento en función de la Salinidad	1%
21	5%		5%
22	10%		10%

## CAPITULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1. Análisis de los Resultados

##### 4.1.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales

En la Tabla A1 (Anexo A), se muestran los valores de pH, conductividad, porcentaje de humedad y porcentaje de materia orgánica de las distintas muestras de suelo utilizadas.

##### 4.1.2. Aislamiento selectivo de bacterias psicrófilas y psicrótrofas

###### 4.1.2.1. Determinación de la población y diversidad bacteriana

Los resultados del conteo del número de colonias y colonias diferentes de bacterias se muestran en las Tablas A2 y A3 (Anexo A). La tabla A3 incluye el número de colonias de actinomicetes diferentes que fue posible aislar en las distintas muestras medioambientales utilizadas.

La Tabla A4 (Anexo A) presenta el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco. El análisis de varianza del número de ufc/g de suelo seco se presenta en la Tabla B1 (Anexo B). El mismo reveló la existencia de diferencias altamente significativas para todos los factores en estudio y sus interacciones. La separación de medias para el factor A (origen de la muestra), se presenta en la Tabla B2 (Anexo B), en donde el valor mayor de ufc/g de suelo seco, se obtuvo en la muestra de sedimentos de lago ( $a_1$ ;  $2.895E+7$  ufc/g) que en la muestra de arena de playa ( $a_2$ ;  $9.256E+6$  ufc/g). En lo que respecta al factor B (temperatura de incubación), se logró recuperar un mayor número de cultivos bacterianos a  $26^\circ\text{C}$  ( $b_1$ ;  $1.96E+7$  ufc/g) que a  $4^\circ\text{C}$  ( $b_0$ ;  $1.58E+7$  ufc/g). Para el factor C (medio de cultivo), el mayor número de ufc/g de suelo seco se registró en agar nutritivo como medio de cultivo ( $c_0$ ;  $1.95E+7$  ufc/g) comparado con agar agua de llave ( $c_1$ ;  $1.59E+7$  ufc/g).

En lo que respecta a la interacción AB (origen de la muestra + temperatura), la separación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia (Tabla B3, Anexo B), ubicó al tratamiento  $a_1b_1$  (muestra compuesta de sedimentos +  $26^\circ\text{C}$ ) en el primer nivel, con  $3.018E+7$  ufc/g, mientras que la población mas baja fue encontrada para el tratamiento  $a_2b_1$  (muestra compuesta de arena de playa +  $26^\circ\text{C}$ ) con  $9.073E+6$  ufc/g. La Tabla B4 (Anexo B) muestra la separación de las medias de la interacción AC (origen de la muestra + medio de cultivo), ubicando en el nivel más alto a los tratamientos  $a_1c_1$  y  $a_1c_0$  (muestra compuesta de sedimentos +

AW y muestra compuesta de sedimentos + AN) con  $2.922E+7$  y  $2.868E+7$  ufc/g respectivamente, y en el nivel mas bajo se ubicó el tratamiento  $a_2c_1$  (muestra compuesta de arena de playa + AW) con  $5.810E+6$  ufc/g. La interacción de los factores BC (temperatura de incubación + medio de cultivo) se ilustra en la Tabla B5 (Anexo B), ubicando al tratamiento  $b_1c_0$  ( $26^\circ\text{C}$  + AN) en el primer nivel, con  $2.366E+7$  ufc/g, y la población más baja se registró en el tratamiento  $b_0c_0$  ( $4^\circ\text{C}$  + AN), con  $1.541E+7$ . La separación de medias para el número de ufc/g de suelo seco de la interacción ABC (Origen de la muestra + Temperatura de incubación + medio de cultivo) se muestra en la Tabla B6 (Anexo B), indicando que en el tratamiento  $a_1b_1c_0$  (muestra de sedimentos +  $26^\circ\text{C}$  + AN), se obtuvo la población más alta, con  $3.326E+7$  ufc/g, mientras que en el tratamiento  $a_2b_1c_1$  (muestra de arena de playa +  $4^\circ\text{C}$  + WA) la población aislada fue la más baja, con  $3.926E+6$  ufc/g. El coeficiente de variación para este experimento fue de 3.56%.

Por otra parte, el análisis de varianza para la diversidad (Tabla B7, Anexo B), mostró diferencias altamente significativas en el factor A (origen de la muestra), factor C (medio de cultivo), interacción AB (origen de la muestra + temperatura de incubación) y BC (temperatura de incubación + medio de cultivo). El factor B (temperatura de incubación) y la interacción AC (origen de la muestra + medio de cultivo) mostraron diferencia significativa mientras que, en la interacción ABC (origen de la muestra+ temperatura de incubación + medio de cultivo) no se encontró diferencias estadísticas. La separación de medias para el factor A (Tabla B8, Anexo B), mostró que existe mayor diversidad en la muestra de arena de playa ( $a_2$ ; 7), que la muestra de sedimentos de lago ( $a_1$ ; 3). En lo referente a la temperatura de incubación para el aislamiento no se encontró diferencias altamente significativas, sin embargo la mayor diversidad se alcanzó a  $26^\circ\text{C}$  ( $b_1$ ; 5 colonias diferentes), que a  $4^\circ\text{C}$  ( $b_0$ ; 4 colonias diferentes). El análisis del tipo de medio de cultivo utilizado para el aislamiento, mostró mayor diversidad en los platos aislados con agar nutritivo ( $c_0$ ; 6 colonias diferentes), que en los platos aislados en agar agua de llave ( $c_0$ ; 4 colonias). La Tabla B9 (Anexo B) muestra los resultados de la separación de medias para la interacción AB, mismo que muestra que el nivel más alto de diversidad se obtiene con el tratamiento  $a_2b_1$  (muestra compuesta de arena de playa +  $26^\circ\text{C}$ ), con 8 colonias diferentes, mientras que el nivel mas bajo se encontró en los tratamiento  $a_0b_0$  (muestra compuesta de arena de suelo +  $4^\circ\text{C}$ ) y  $a_1b_1$  (muestra compuesta de arena de sedimentos de lago +  $26^\circ\text{C}$ ) con 3 colonias diferentes en cada tratamiento. En la interacción BC (Tabla B11, Anexo B), la separación de medias mostró que en el tratamiento  $b_0c_0$  ( $4^\circ\text{C}$  + AN) se obtiene el mayor número de diversidad con 6 colonias diferentes, comparado las 3 colonias obtenidas en el tratamiento  $b_0c_1$  ( $4^\circ\text{C}$  + WA). En la Tabla B10 (Anexo B), se observan los resultados de la separación de



medias para la interacción AC, en este estudio la mayor diversidad se obtiene con el tratamiento a<sub>2</sub>C<sub>0</sub> (muestra de arena de playa + AN), con 8 colonias diferentes. Los resultados del análisis de varianza para la interacción ABC se muestra en la Tabla B12 (Anexo B) para las cuales no se encontraron diferencias estadísticas significativa. El coeficiente de variación para este experimento fue de 14.63%.

#### **4.1.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento de bacterias psicrófilas y psicrótrofas**

Ciento cincuenta y dos cultivos microbianos fueron aislados y purificados a partir de los platos del aislamiento selectivo, de los cuales 141 presentaron características de bacterias y 11 de actinomicetes. En lo que respecta a los cultivos bacterianos, 71 se aislaron a una temperatura de incubación de 26°C y 70 a 4°C. Se aislaron 77 bacterias en agar nutritivo (AN) y 64 en agar agua de llave (WA). En lo referente a cultivos aislados a partir del origen de la muestra, 40 bacterias se aislaron en suelo, 31 en los sedimentos de lago y 70 a partir de la arena de playa. En los platos de aislamiento fue posible identificar colonias con morfología típica de actinomicetes. Se aislaron 11, los que fueron obtenidos de los platos incubados a 26°C, a 4°C no se logró aislar ningún actinomicete. Es importante mencionar que 2 provinieron de los platos con agar nutritivo, y 9 de agar agua de llave; de acuerdo al origen, 4 fueron aislados de la muestra de suelo, 1 en la muestra de sedimentos de lago y 6 en la muestra de arena de playa.

La Tabla A5 (Anexo A) muestra la codificación e información complementaria utilizada, para cada uno de los cultivos bacterianos aislados, purificados y almacenados, obtenidos de los diferentes tratamientos del presente estudio. La codificación e información complementaria utilizada para los 11 actinomicetes aislados se muestra en la Tabla A6 (Anexo A).

#### **4.1.4. Caracterización macroscópica de los cultivos bacterianos**

En la Tabla A6 (Anexo A) se muestra la caracterización macroscópica de los 141 cultivos bacterianos aislados de las muestras medioambientales. Se obtuvieron un total de 19 grupos de distinto color, el grupo 1 presenta el mayor número de miembros con 35 bacterias, le sigue el grupo 2 con 24 bacterias, los grupos 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 presentan un solo miembro.

La Tabla A7 (Anexo A) presenta la caracterización macroscópica de los 11 actinomicetes aislados. Se obtuvieron 5 grupos de distinto color. El grupo 2 y 5 presentan el mayor número de miembros con 3 actinomicetes en cada uno, el grupo 5 no presenta micelio aéreo. El grupo 3 presenta un solo cultivo.

#### 4.1.5. Caracterización microscópica de los cultivos bacterianos

La tabla A9 (Anexo A) muestra la caracterización microscópica para los 141 cultivos bacterianos aislados.

En lo relacionado a tinción de Gram encontramos 59 bacterias gram (+) y 82 bacterias gram (-). La figura C5 (Anexo C) muestra la distribución de las bacterias gram (+) y gram (-) de acuerdo a los factores en estudio. En lo referente a bacterias gram (+), se observa una distribución uniforme para los factores B (temperatura de incubación) y C (medio de cultivo), mientras que en el factor A (origen de la muestra) se observa una distribución no uniforme, el valor más alto se encontró en la muestra de arena de playa con 33 bacterias gram (+) y el valor más bajo se encontró en la muestra de sedimentos de lago con 7 bacterias. La distribución de las bacterias gram (-) es uniforme únicamente para el factor B (temperatura de incubación), mientras que en el factor A (origen de la muestra) y factor C (medio de cultivo) la distribución no es uniforme, en cuanto al origen de la muestra el valor más alto se encontró en arena de playa con 37 bacterias y el valor más bajo se registró en la muestra de suelo con 20 bacterias. Se aislaron 51 bacterias gram(-) en agar nutritivo, mientras que en agar agua de llave se aislaron 31 bacterias gram(-). En forma general, la distribución de bacterias gram (+) y gram (-) de acuerdo a los factores en estudio se mantiene constante en las muestras de suelo y arena de playa, mientras que para la muestra de sedimentos se registra mayor cantidad de bacterias gram(-) con 25 bacterias comparado con 7 bacterias gram (+) registradas en esta muestra. Para el factor B (Temperatura de incubación) la 26°C no se registra diferencias significativas, mientras que a 4°C se encontró 43 bacterias gram(-) frente a 27 gram(+). Para el tipo de medio de cultivo utilizado (factor C) se observa diferencias significativas únicamente en agar nutritivo con 51 bacterias gram (-) y 33 bacterias gram (+).

De acuerdo a la forma 72 cultivos presentan características de cocos, mientras que 69 bacterias tienen forma bacilar. La Figura C6 (Anexo C) muestra la distribución para las bacterias con forma de cocos y bacilos de acuerdo a los factores en estudio. Los cultivos bacterianos con forma cocoide no presentan una distribución uniforme. Para el factor A (origen de la muestra) el valor más alto se registró en la muestra de arena de playa con 39 cultivos, mientras que en la muestra de sedimentos se aisló 13 bacterias con esta característica. En cuanto a la temperatura de incubación (factor B) se aisló 40 cultivos a 26°C y 32 a 4°C. Se obtuvo 43 cultivos bacterianos con características de cocos en agar nutritivo como medio de cultivo y 29 en agar agua de llave. Por otra parte, la distribución para los cultivos bacterianos con forma bacilar es uniforme

únicamente para el factor B (temperatura de incubación). Según el origen de la muestra la distribución no es uniforme, se aisló 31 cultivos en la muestra de arena de playa y 19 bacterias en las muestras de sedimentos de lago y el mismo número en la muestra de suelo. De igual forma la distribución según el medio de cultivo utilizado para el aislamiento no es uniforme, se registró 41 bacterias con forma bacilar en agar nutritivo y 28 bacterias en agar agua de llave. En forma general, no se encontró diferencias significativas en el número de aislamientos de bacterias con forma bacilar y cocoide en cada factor estudiado.

En la caracterización microscópica de actinomicetes, se encontró 5 cultivos que presentan cadenas rectas y 3 presentan cadenas incompletas. Los 3 cultivos restantes de actinomicetes no presentaron esporulación por lo que no fue necesario determinar la morfología de las cadenas de esporas (Tabla A19; Anexo A).

#### **4.1.6. Pruebas fisiológicas de crecimiento**

##### **4.1.6.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura**

Los resultados para la clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación se muestra en la Tabla A11 (Anexo A). De las 141 bacterias aisladas, 49 presentaron características de mesófilos, 78 se clasificaron como psicrótrofos, 13 psicrófilos y un cultivo se clasificó como mesófilo con características de termófilo (Figura C7; Anexo C). Además se evaluaron estas características según la temperatura de aislamiento, donde se encontró que la mayoría de mesófilos se aislaron a 26 °C, todos los psicrófilos y la mayoría de psicrótrofos se aislaron a 4°C (Tabla A12; Anexo A). En lo referente a los cultivos de actinomicetes el 100% presentó características de mesófilos y se aislaron a 26°C (Tabla A13; Anexo A).

##### **4.1.6.2. Rango de crecimiento en función del pH**

Los resultados para los cultivos bacterianos se muestran en la Tabla A14, Anexo A. Se registraron mayor cantidad de cultivos neutrófilos (109) que neutrotolerantes (30) o alcalitolerantes (2) Figura C8, Anexo C. Además se analizó el rango de crecimiento en función del pH de acuerdo al origen de la muestra. De los 109 cultivos clasificados como neutrófilos 55 se aislaron de la muestra de Arena, 30 de suelo y 24 de sedimentos de lago (Tabla A15; Anexo A). Para los cultivos de actinomicetes no fue evidente que un tipo específico predomine sobre

otro (Figura C9; Anexo C), de los 11 actinomicetes aislados 5 presentaron características de neutrófilos y 6 se registraron como neutrotolerantes como se muestra en la Tabla A16 (Anexo A).

#### **4.1.6.3. Rango de crecimiento en función de la salinidad**

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla A17 (Anexo A), se determinó 75 cultivos halófilos, 54 halófilos débiles y 12 halófilos extremos (Figura C10; Anexo C). Se evaluó el rango de crecimiento bacteriano en función de la salinidad de acuerdo a la muestra de origen (Tabla A18; Anexo A). De los 75 cultivos halófilos aislados 38 pertenecen a la muestra de arena de playa, 20 se aislaron de sedimentos de lago y 17 de suelo. En lo referente a los cultivos de actinomicetes (Figura C11; Anexo C), 6 se clasificaron como halófilos y 5 como halófilos extremos (Tabla A19; Anexo A).

#### **4.1.7. Taxonomía numérica de datos fenotípicos**

El dendrograma basado en el coeficiente de similaridad, calculado a partir de las pruebas fenotípicas (Tabla B13; Anexo B), de las bacterias aisladas en este estudio se muestra en la Figura C12 (Anexo C). Se identificaron treinta grupos especies, de los cuales 21 grupos presentaron más de un solo representante, mientras que los 9 grupos restantes fueron recuperados como cultivos individuales. El grupo 5 considerado como el grupo más grande, con 19 representantes. La Tabla A20 (Anexo A), muestra los treinta grupos especies con sus respectivos miembros. En el caso de los actinomicetes, el dendrograma basado en el coeficiente de similaridad, calculado a partir de las pruebas fenotípicas (Tabla B14; Anexo B), se muestra en la Figura C13 (Anexo C). Se identificaron 5 grupos especie, un grupo fue recuperado como cultivo individual, y los restantes (4) se consideran grupos multimiembro. La Tabla A21 (Anexo A) muestra los grupos especies de actinomicetes con sus respectivos miembros.

### **4.2. Interpretación de datos**

#### **4.2.1. Población y diversidad bacteriana**

El número de unidades de colonias (ufc) por gramo de suelo seco en cada tratamiento mostró resultados interesantes. En relación al origen de la muestra el valor más alto de ufc se registró en la muestra de sedimentos de lago, mientras que el valor más bajo se observó en la muestra de arena de playa. Es evidente que las condiciones de crecimiento son completamente diferentes en cada muestra utilizada, principalmente por las características fisicoquímicas de cada una. Como se puede notar los valores de conductividad y la influencia de la marea en las

muestras de arena son factores que posiblemente influyen directamente en la población bacteriana. En lo referente a conductividad la muestra de sedimentos de lago registró 66  $\mu\text{s}/\text{cm}$  mientras que la muestra de arena reportó 2509  $\mu\text{s}/\text{cm}$ . Lo que significa que en la muestra de arena hay mayor cantidad de solutos disueltos en la solución provocando un ambiente hipertónico por lo que únicamente aquellas células bacterianas que posean mecanismos para contrarrestar los efectos a estas condiciones van a sobrevivir.

Por otra parte, la diversidad de bacterias encontradas se ve influenciada principalmente por la marea lo que permite una disponibilidad mayor de nutrientes y de oxígeno para las bacterias, algo que no ocurre con los sedimentos de lago, en donde el aporte de nutrientes es escaso durante el año y la oxigenación es deficiente.

Con relación al Factor B (temperatura de aislamiento), la mayor población se encontró a 26°C, esto puede deberse a que si bien es cierto las condiciones de la Antártida son extremadamente frías, sin embargo se sabe que las bacterias resisten condiciones de bajas temperaturas por periodos largos de tiempo. Es probable que una gran cantidad de bacterias psicrótrofas posean estos mecanismos que les permiten sobrevivir durante el invierno y desarrollarse durante el verano antártico tiempo en el cual se recolectó las muestras.

Finalmente, en relación al factor C (medio de cultivo), el mayor número de unidades formadoras de colonias (ufc) fueron recuperados en los platos que contenían agar nutritivo que en los que contenían agar agua de llave, este resultado es evidente pues el agar nutritivo es rico en nutrientes que proporciona las condiciones adecuadas para el crecimiento de las bacterias en forma óptima lo que no ocurre en el agar agua de llave.

#### **4.2.2. Caracterización fenotípica**

En forma general se aislaron más bacterias gram – (82), que gram + (59), esto tiene sentido ya que estudios han demostrado que las bacterias gram (–) poseen mecanismos de adaptación más eficientes que las bacterias gram (+)(Buchon *et al.*, 2000).

##### **4.2.2.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura**

Al analizar los datos de rango de crecimiento en función de la temperatura, la mayoría de microorganismos pueden crecer a temperaturas bajas ya que el grupo de psicrófilos y psicrótrofos constituyen casi el 80% de todas las bacterias aisladas. Además al analizar los resultados en función de la temperatura de incubación para el aislamiento, se puede observar

claramente la influencia de esta temperatura en el tipo de bacteria que crecen. A 26°C, el número de mesófilos es prácticamente el doble que el de psicrótrofos y además a esta temperatura no fue posible aislar ningún microorganismo psicrófilo. Todo lo contrario ocurrió a 4°C, porque, de las 70 bacterias, 68 fueron ubicadas como psicrófilas o psicrótrofas y a penas 2 fueron mesófilas. Es evidente que las condiciones ambientales influyen en los resultados debido al ambiente frío que durante todo el año estos microorganismos deben soportar en los ecosistemas antárticos. Se requieren más estudios para aclarar el origen de la fracción mesófila de la población bacteriana, para establecer los mecanismos de resistencia a este tipo de condiciones, y el origen de las mismas.

#### **4.2.2.2. Rango de crecimiento en función del pH**

En lo referente al pH la gran mayoría de bacterias presentaron características de neutrófilas y neutrotolerantes, y esto se mantiene cuando se comparan los resultados en función del origen de la muestra. Todo esto tiene sentido, ya que al revisar los valores de pH de las muestras medio ambientales, estas presentaron características neutras a ligeramente ácidas (Tabla A1).

#### **4.2.2.3. Rango de crecimiento en función de la salinidad**

Un resultado inesperado del presente estudio fue encontrar una población relativamente alta de bacterias resistentes a concentraciones medias y altas de sal. Si bien es cierto que los resultados obtenidos para las bacterias aisladas en la muestra de arena tiene sentido al encontrar que más del 60% son halófilas o halófilas extremas, es más difícil explicar resultados similares para las bacterias aisladas en el suelo y sedimentos. Una posibilidad podría ser que las bacterias son transportadas desde las orillas, y otros lugares asociados al mar, hacia el resto de ecosistemas, por animales representados por aves y mamíferos acuáticos, los que evidentemente pueden establecer sus nidos y sitios de descanso, centenas de metros e incluso kilómetros, hacia dentro de las orillas de las Islas. Las heces, plumas, lana y otro tipo de materiales orgánicos se convierten en materiales de diseminación de las bacterias que viven en ecosistemas costero marinos (arena), hacia ecosistemas terrestres (suelo y sedimentos).

#### **4.2.3. Taxonomía numérica de datos fenotípicos**

El análisis de datos fenotípicos en taxonomía numérica, arrojó un número considerablemente mayor de grupos especie (30), que los registrados preliminarmente basados únicamente en los grupos de color iniciales (19). Las pruebas fenotípicas realizadas nos dan una idea más

específica y real de los grupos especie al ser analizados con taxonomía numérica, ya que el dendrograma esta basado en la comparación de 44 características, mientras que la agrupación por color se basa únicamente en la pigmentación de la colonia. Entonces es más arbitraria la ubicación de las bacterias por color y por lo tanto más inexacta. Sin embargo, esta etapa es esencial para ordenar preliminarmente y facilitar el estudio de las bacterias.

Es importante recalcar que existe una gran repetición de cultivos aislados ya que de las 141 bacterias originalmente aisladas al principio del experimento el dendrograma de la similaridad de las pruebas fenotípicas muestra la existencia de 30 posibles especies diferentes. Esto constituye que solamente el 20% de las 141 bacterias originales, son diferentes. Este tipo de resultados no hacen sino justificar el uso de pruebas rápidas de identificación de microbios similares en programas de aislamiento selectivo que permitan evitar la pérdida económica y de tiempo que significa trabajar con muchos microorganismos repetidos. El avance de técnicas moleculares, sobre todo de fingerprinting, se convierten en herramientas increíblemente útiles para trabajos como el realizado en la presente investigación.

#### **4.2.4. Discusión general de actinomicetes**

De la fracción bacteriana aislada solamente se aislaron 11 actinomicetes en cultivo puro. El enfoque principal del presente estudio fue estudiar bacterias no filamentosas, por lo que los resultados obtenidos para los actinomicetes se resume en el dendrograma que representa la similaridad de las diferentes pruebas fenotípicas para este grupo de bacterias. Con un corte de similaridad al 90% para establecer diferencias entre actinomicetes, se observó que los 11 actinomicetes iniciales, fueron separados en 5 grupos especie. Es posible que estos 11 actinomicetes únicamente estén soportando las condiciones extremas de los ecosistemas glaciares de la Antártida y hayan sido arrastrados por la marea desde otros lugares. Sin embargo esto no quita la posibilidad de que exista una población endémica de actinomicetes no estudiada por la ciencia, con una fuente metabólica útil para el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas.

#### **4.2.5. Discusión general del trabajo**

El presente estudio se enfocó en la determinación de la biodiversidad bacteriana en muestras provenientes de ecosistemas glaciares de la Antártida. Para este fin se logró determinar una metodología adecuada de aislamiento selectivo tomando en cuenta tres factores importantes como son el origen de la muestra, la temperatura de aislamiento y el medio de cultivo, y debido a

que en un aislamiento selectivo es posible obtener cientos de cultivos puros, muchos de ellos iguales, también se estableció una metodología eficiente, con fundamento científico, para seleccionar aquellos que son diferentes.

En la presente investigación se aislaron 141 bacterias en cultivo puro. La caracterización fenotípica de las mismas arrojó resultados interesantes, ya que de los ciento cuarenta y un cultivos bacterianos aislados, el 49,7% tuvo su origen a partir de la muestra de arena de playa, comparado con los cultivos aislados de las muestras de suelo y sedimentos cuyos porcentajes fueron de 28,4% y 21,9%, respectivamente. Es evidente que las diferencias en las características físico químicas de las muestras usadas como fuente de aislamiento, tal como ocurre con la conductividad y la influencia de la marea en la muestra de arena de playa, probablemente influyeron directamente tanto en las poblaciones de bacterias como en la diversidad de las mismas.

Al analizar los resultados en cuanto al rango de crecimiento en función de la temperatura se obtuvo que el 55,3%, es decir la gran mayoría de bacterias se clasificaron como psicrótrofos, mientras que el 9,2% (13 cultivos) se clasificó como psicrófilos. Este resultado es interesante y debería hacerse un estudio más profundo para entender cómo es que las bacterias mesófilas (35,5%), resisten las condiciones inclementes del ecosistema antártico y además determinar su origen. ¿Son acaso estas endémicas o arrastradas o por las corrientes marinas? Este tipo de incógnitas presentan nuevas líneas de investigación.

Con el análisis de las pruebas fenotípicas realizadas en la presente investigación fue posible obtener el dendrograma basado en el coeficiente de similaridad al 90%, donde se identificaron treinta grupos especie, de los cuales 21 presentaron mas de un miembro y los 9 restantes fueron recuperados como cultivos individuales. Es probable que muchos de éstos grupos especie lleven al descubrimiento de nuevas especies de bacterias, incrementando así el conocimiento de la extensión de la diversidad bacteriana en los ecosistemas estudiados. Además, el poder haber recuperado 30 grupos especie diferentes también indican la gran diversidad bacteriana que puede resistir las condiciones extremas de estos ecosistemas. Es más que probable que estos microbios han desarrollado mecanismos genéticos y metabólicos diferentes al de la gran mayoría de microbios que habitan en condiciones más normales. Esto también abre la puerta para tratar de estudiar las características metabólicas de éstas bacterias para determinar si existe algún proceso útil en biotecnología. Ya se ha demostrado que muchos grupos de



bacterias que viven en ecosistemas extremos son capaces de producir compuestos bioactivos de interés (Gerday *et al.*, 2000).

El presente trabajo se enfocó en aislar bacterias no filamentosas, sin embargo fue posible, bajo las mismas condiciones de estudio, aislar en cultivo puro 11 actinomicetes. La tendencia se mantiene de igual forma en el caso de los actinomicetes donde la mayoría de cultivos (54.5%) fue aislado a partir de la muestra de arena de playa. Sin embargo en este caso no fue posible aislar actinomicetes psicrófilos y psicrótrofos, los 11 cultivos se clasificaron como mesófilos. Este resultado es alentador ya que no existen reportes de aislamiento de actinomicetes de ecosistemas antárticos asociados a la Islas Shetland del Sur, por lo que se vuelve necesario realizar estudios posteriores enfocados solamente al grupo de los actinomicetes.

Si bien es cierto que este es un estudio básico, es evidente que los resultados obtenidos son interesantes y se convierten en la base fundamental para futuros estudios. Las condiciones medioambientales extremas de los ecosistemas glaciares de la Antártida han provocado durante muchos años que la población microbiana en estas zonas sea poco estudiada por la ciencia. Sin embargo, son las mismas condiciones extremas las que ahora permiten la búsqueda y obtención de nuevas bacterias productoras de compuestos bioactivos útiles en biotecnología gracias a los avances en técnicas moleculares.

#### **4.3. Verificación de la hipótesis**

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

- La biodiversidad bacteriana en muestras recolectadas de ecosistemas glaciares de la Antártida es escasa.

##### **4.3.2. Hipótesis Alternante ( $H_1$ )**

- Exista abundante biodiversidad bacteriana en muestras recolectadas de ecosistemas glaciares de la Antártida.

Después de analizar los resultados de la población y diversidad de cultivos aislados, número de colonias diferentes, características macro y microscópicas y pruebas fisiológicas de crecimiento, “se acepta la hipótesis alternante ( $H_1$ )” afirmando que existe abundante biodiversidad bacteriana en muestras recolectadas de ecosistemas glaciares de la Antártida.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Se aislaron 141 bacterias y 11 actinomicetes en cultivo puro de las tres muestras medioambientales utilizadas.
- En la taxonomía de datos fenotípicos los ciento cuarenta y un cultivos de bacterias estudiados fueron ubicados en 30 grupos especie basados en una similaridad del 90%. 21 grupos estuvieron formados por más de un miembro, mientras que el resto se recuperó como cultivo individual.
- La mayor parte de los cultivos aislados presentaron forma de cocos con tinción gram positiva.
- De los ciento cuarenta y un cultivos bacterianos aislados solamente 13, es decir el 9,2%, se clasificó como psicrófilos, mientras que 78 cultivos es decir el 55,3% fueron ubicados como psicrótrofos. El resto presentó características de mesófilos y un mesófilo con características de termófilo.
- Se registró mayor cantidad de cultivos neutrófilos y neutrotolerantes. La mayoría de cultivos presentó características de cultivos halófilos.
- En la taxonomía de datos fenotípicos, los once actinomicetes estudiados fueron ubicados en 5 grupos especie basados en una similaridad del 90%. Cuatro grupos presentaron más de un miembro y uno fue recuperó como cultivo individual.

#### 5.2. Recomendaciones

- Realizar caracterización molecular, es decir el secuenciamiento del ADN ribosomal 16S de las distintas bacterias aisladas en este estudio.
- Profundizar el estudio de las cepas aisladas en el presente trabajo con pruebas de caracterización fenotípica que determinen la producción de metabolitos secundarios.

- Aislar y estudiar poblaciones endémicas de actinomicetes aislados a partir de muestras recolectadas en ecosistemas glaciares, con la finalidad de buscar una nueva fuente metabólica útil para el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas.

## **CAPITULO VI**

### **PROPUESTA**

#### **6.1. Datos informativos**

##### **6.1.1. Título**

Establecimiento de la biodiversidad de bacterias presentes en ecosistemas glaciares.

##### **6.1.2. Instituciones ejecutoras**

Universidad Técnica de Ambato.

##### **6.1.3. Beneficiarios**

Investigadores y Estudiantes Universitarios del Ecuador. Centros e instituciones de investigaciones microbiológicas y biotecnológicos. Empresas privadas relacionadas a la obtención de nuevos productos con aplicación biotecnológica.

##### **6.1.4. Ubicación**

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

Avenida los Chasquis y Río Payamino. Ciudadela Huachi Chico. Ambato.

##### **6.1.5. Tiempo Estimado para la Ejecución**

Ocho meses.

##### **6.1.6. Equipos técnico responsable**

Docentes, investigadores, estudiantes y tesistas que se encuentren trabajando en la determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida.

#### **6.2. Antecedentes de la propuesta**

Durante los últimos años, la necesidad por buscar nuevas alternativas para resolver los problemas de resistencia bacteriana a antibióticos comúnmente usados en medicina, se ha venido incrementando. El uso indiscriminado de algunos antibióticos a llevando consigo una importante pérdida económica en cuanto al tratamiento y prevención de enfermedades. Para

contrarrestar este problema se busca descubrir bacterias con nuevas rutas metabólicas que permitan el desarrollo de nuevos compuestos, con aplicación biotecnológica en distintas áreas de importancia para la humanidad, entre las cuales se puede mencionar la industria alimenticia, agricultura, medicina, entre otros. La investigación “Determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida” demostró una gran variedad de bacterias, a partir de pruebas de caracterización macroscópicas, microscópicas y posteriormente taxonomía numérica de datos fenotípicos que serán la base fundamental para encontrar nuevas especies de bacterias, con rutas metabólicas especiales para el descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos.

### **6.3. Justificación**

El estudio “Determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida”, demostró una gran variedad de microorganismos presentes en las diferentes muestras de suelos utilizados. Las bacterias obtenidas en esta investigación servirán para establecer un protocolo para el aislamiento de bacterias en suelos de la Antártida. La aplicación de esta técnica a gran escala permitirá entender los mecanismos que han adquirido estas bacterias, para resistir a las condiciones extremas de temperatura y humedad a las que están sometidas en ecosistemas glaciares de la Antártida. Además, permitirá obtener bacterias con nuevas rutas metabólicas que serán utilizadas para el desarrollo de nuevos compuestos biotecnológicos.

### **6.4. Objetivos**

#### **6.4.1. General**

- Establecer un protocolo de aislamiento de bacterias presentes en ecosistemas glaciares de la Antártida.

#### **6.4.2. Específicos**

- Aislar selectivamente bacterias de diferentes muestras de suelos de ecosistemas glaciares de la Antártida.
- Determinar las condiciones óptimas de cultivo para el desarrollo in vitro de bacterias precedentes de ecosistemas glaciares de la Antártida.

## 6.5. Análisis de factibilidad

La viabilidad de la propuesta “Establecimiento de la biodiversidad de bacterias presentes en ecosistemas glaciares” se asegura con los resultados obtenidos en la investigación “Determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida”. Por ende, el cumplimiento de los objetivos específicos dará como resultado el cumplimiento del objetivo general. Además, los resultados de la investigación en la cual se fundamenta la presente propuesta, permitirán que los resultados finales sean obtenidos sin inconvenientes.

## 6.6. Fundamentación.

La investigación “Determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida”, es la base científica para la formulación de la siguiente propuesta.

## 6.7. Metodología – Modelo Operativo.

### 6.7.1. Contenido de humedad y materia orgánica de las muestras.

Para la determinación del porcentaje de humedad se pesará previamente las cápsulas de porcelana utilizada y se colocará en éstas 5 gramos de suelo de cada una de las muestras, se registra el peso total (Peso 1). Las cápsulas de porcelana con las muestras se colocaran en una estufa y serán sometidas a 105° C por 24 horas. Al retirar las muestras se las dejará enfriar y se procederá a pesar nuevamente (Peso 2). El porcentaje de humedad se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{Peso\ 1 - Peso\ 2}{Peso\ 2} \times 100$$

Para la determinación del porcentaje de materia orgánica en las muestras se pesa previamente las cápsulas de porcelana a utilizar y se coloca en éstas 5 gramos de suelo de cada una de las muestras. Estas se colocaran en una estufa y serán sometidas a 105°C por 24 horas. Al retirar las muestras se las deja enfriar y se procede a pesar nuevamente (Peso 1). Las muestras procedentes de la estufa se colocaran en una mufla, a 400°C por 3 horas. Al término de este tiempo se dejará enfriar y finalmente se obtendrá el peso final (Peso 2). El porcentaje de materia orgánica se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\%m. o = \frac{Peso\ 1 - Peso\ 2}{Peso\ 2} \times 100$$

Todos los cálculos deberán involucrar únicamente el peso del suelo, por lo que el peso de la cápsula de porcelana se debe restar.

### **6.7.2. pH y Conductividad de las muestras.**

Para determinar el pH y conductividad de las muestras, se pesa 20 gramos de suelo, y se coloca en un vaso de precipitación de 100 ml. Se añade 50 ml de agua destilada, y se mezcla con una cuchara por el lapso de 5 minutos. Las muestras se dejarán en reposo por una hora. Una vez transcurrido ese tiempo, se procederá a tomar las lecturas correspondientes de las muestras, con la ayuda de un pH-metro y un conductímetro.

### **6.7.3. Aislamiento selectivo**

#### **6.7.3.1. Determinación de la población y diversidad bacteriana**

Cada una de las muestras se usará para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) por gramo de muestra y la diversidad de bacterias. Para ello se usará el método de difusión en placa y diluciones. Para preparar la dilución 1/10 se pesará 10 gramos de suelo y se colocará en una botella que contenga 90 ml de agua de llave estéril. La suspensión resultante se agitará por 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo se prepararán las diluciones 1/10<sup>2</sup> y 1/10<sup>3</sup>. Cien microlitros (100 µl) de las diluciones 1/10, 1/10<sup>2</sup> y 1/10<sup>3</sup> se colocarán y se extenderán por duplicado, sobre la superficie de cajas petri que contenían agar nutritivo (AN) y agar agua de llave, cada uno suplementado con nistatin, a una concentración de 75 µg/ml, y ajustado su pH a 7,0. Las cajas inoculadas serán incubadas a 4°C y a 26°C por dos semanas. Luego de la incubación se procederá a contar el número de colonias de bacterias presentes en cada una de las cajas. Además se anotará el número de colonias diferentes. El número de UFC por gramo de suelo se calcula para aquellas diluciones en las que el número de colonias se encuentre en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$UFC/g \text{ de suelo} = \frac{N * FD * Vt}{Vi * S}$$

Donde:

**N** Número de colonias

**FD** Dilución en la cual se contó N (Ej: Conteo realizado en la dilución 1/10<sup>3</sup>, FD = 1x10<sup>3</sup>)

**Vt** Volumen de la dilución 1/10, en mililitros

**Vi** Volumen inoculado, en mililitros

**S** Cantidad de suelo utilizada para preparar la dilución 1/10

#### **6.7.4. Purificación y almacenamiento de los microorganismos aislados**

Una vez comprobado el crecimiento de cada microorganismo se realizará un repique en cajas petri que contengan agar nutritivo, mediante estría compuesta. Los platos sembrados serán incubados a 28°C por 5 días. Aquellos que luego del período de incubación presenten características de cultivo puro, serán etiquetados y posteriormente almacenados en tubos plásticos que contengan 1 mililitro de glicerol al 20% (w/v) y almacenados a -10°C en un congelador, para su preservación a largo plazo. Al mismo tiempo se preparará un stock en tubos plásticos que contengan 700 microlitros de agua de llave estéril, y almacenados a 4°C en un refrigerador. Estos últimos serán usados para los diferentes experimentos a desarrollarse en el presente estudio. Aquellos que se encuentren contaminados, serán repicados las veces necesarias hasta obtener cultivo puro.

#### **6.7.5. Caracterización macroscópica de los microorganismos**

Los cultivos puros obtenidos se agruparán de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias. Para la determinación del color de la colonia se utilizará una tabla de colores. Se analizará la forma, elevación y margen de la colonia como características generales.

#### **6.7.6. Caracterización microscópica de los microorganismos**

Los microorganismos aislados serán usados para preparar muestras que serán observadas bajo el microscopio. Para las bacterias se determinará tinción de Gram, presencia de esporas y cápsulas.

##### **6.7.6.1. Tinción de Gram**

Se preparará un frotis, secado a temperatura ambiente, este se fijará sobre el mechero, se teñirá por 1 minuto con cristal violeta y luego se lavará con agua destilada, se cubrirá con una solución de lugol durante 1 minuto y nuevamente se lavará con agua destilada y posteriormente con alcohol al 95%, se cubrirá con safranina durante 20 segundos, posteriormente se lavará con agua destilada y finalmente el secado será a temperatura ambiente, luego cada una de las placas se observará al microscopio empezando con el lente de menor aumento.



### **6.7.6.2. Tinción de Endosporas**

El frotis se colocará sobre una rejilla ubicada sobre un recipiente con agua hirviendo. Todo el frotis se cubrirá con verde malaquita durante 10 minutos, añadiendo más colorante en caso de evaporación del mismo sobre la muestra. Luego se lavará con agua destilada para finalmente dar contraste con safranina durante 1 minuto. Para terminar, se lavará con agua destilada nuevamente y se secará a temperatura ambiente. La presencia de endosporas se determinará usando el lente de inmersión. Las endosporas se teñirán de verde mientras que el resto de la célula presentará una coloración rojiza.

### **6.7.6.3. Tinción de Cápsulas**

El frotis será teñido con cristal violeta por 2 minutos para luego proceder a lavar el exceso de colorante con una solución de sulfato de cobre al 20% (p/v). La muestra se dejará secar a temperatura ambiente antes de proceder con la observación bajo el microscopio usando el lente de inmersión. La presencia de cápsula se determinará mediante la observación de una capa transparente rodeando la célula bacteriana teñida de púrpura

## **6.7.7. Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos**

### **6.7.7.1. Rango de crecimiento en Función de la Temperatura**

Se inocularán 3 µl de las suspensiones de células previamente preparadas, sobre la superficie de AN. Para aquellas bacterias que presenten crecimiento a 4°C y probablemente son psicrófilos, los platos serán incubados a una temperatura de 26°C, 37°C y 50°C durante 7 días. Mientras que aquellas bacterias que presenten crecimiento a 26°C y probablemente son psicrótrofos, serán incubadas a una temperatura de 4°C, 37°C y 50°C durante el mismo tiempo. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluará las cajas para observar el crecimiento de las bacterias, mediante código binario. A la bacteria que presente crecimiento, se le asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0. Aquellas bacterias que crecieron a 4°C pero no a 26°C serán consideradas psicrófilas, mientras que las bacterias que crecieron a 4°C y a 26°C se considerarán psicrótrofas.

### **6.7.7.2. Rango de crecimiento en Función del pH**

Se inocularán 3 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar nutritivo, agar enriquecido gasolina y petróleo para bacterias, respectivamente, ajustando a los pHs de 4.5, 5.5,

6.5, 7.5 y 8.5. El pH se ajustará con la ayuda de sistemas de búferes, para evitar los cambios en el pH debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas se incubarán a 28°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de bacterias, mediante código binario. A la bacteria que presente crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

### 6.7.7.3. Rango de crecimiento en Función de la salinidad

Se inocularán 3 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar nutritivo con las siguientes concentraciones de Cloruro de sodio (NaCl) al 1, 5 y 10% (w/v). Las cajas serán incubadas a 28°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de las bacterias, mediante código binario. La bacteria que presente crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

## 6.8. Administración.

INDICADORES A MEJORAR	SITUACIÓN ACTUAL	RESULTADOS ESPERADOS	ACTIVIDADES	RESPONSABLES
Planteamiento de una metodología para el aislamiento selectivo de bacterias	Desconocimiento del mecanismo adoptado por bacterias sometidas a condiciones extremas.	Aislamiento de gran variedad de bacterias presentes en ecosistemas glaciares de la Antártida	Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias aisladas.	Docente
	Resistencia bacteriana a antibióticos actualmente utilizados.	Descubrimiento de nuevas rutas metabólicas para el desarrollo de compuestos con aplicación biotecnológica con bajo presupuesto.	Pruebas fisiológicas y bioquímicas de las bacterias aisladas (temperatura, pH y salinidad).	Investigador
				Estudiante
			Análisis de datos fenotípicos.	Tesistas

Elaborado por: Diana Garzón, 2012.

## 6.9. Previsión de la evaluación

PREGUNTAS BÁSICAS	EXPLICACIÓN
¿Quiénes solicitan evaluar?	Docente Investigador
¿Por qué evaluar?	Proporciona información acerca de los mecanismos adquiridos por bacterias sometidas a condiciones extremas de humedad y temperatura como en ecosistemas glaciares de la Antártida.
¿Para qué evaluar?	Para la determinación de la biodiversidad bacteriana presente en ecosistemas glaciares de la Antártida.
¿Qué evaluar?	Datos obtenidos a partir de taxonomía numérica.
¿Quién evalúa?	Docente
¿Cuándo evaluar?	Al finalizar las pruebas de taxonomía numérica.
¿Cómo evaluar?	Realizando una matriz en código binario y analizando los datos obtenidos en todas las pruebas.
Con qué evaluar?	Programa NTSys y MSTATC (análisis estadístico).

Elaborado por: Diana Garzón, 2012.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **ASOCIACIÓN CIVIL ANTARKOS, 1988.** Flora y fauna de la Antártida. Área de ciencias microbiológicas. Instituto Antártico Uruguayo.
2. **BAEZ, M.; VÉLIZ, D.; BARAHONA, S. & CIFUENTES, V., 2010.** Levaduras antárticas: potencial como herramienta ecológica y fuente de enzimas y metabolitos de interés biotecnológico. *Boletín Antártico Chileno*. Vol. 29. No. 1.
3. **BLAMEY, J., 2008.** Antártida: fuente de recursos biológicos para la biotecnología nacional. *Boletín Antártico Chileno*. Vol. 27. No. 1.
4. **BOWMAN, J.; McCAMMON, S.; BROWN, M.; NICHOLS, D. & McMEEKIN, T., 1997.** Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Applied and environmental microbiology*, p. 3068-3078
5. **BUCHON, L.; LAURENT, P.; GOUNOT, A.M. & GUESPIN-MICHEL, J.F., 2000.** Temperature dependence of extracellular enzymes production by psychrotrophic and psychrophilic bacteria. *Biotechnology Letters*, **22**: 1577-1581.
6. **CASTILLO, F.; RÓLDAN, M.; BLASCO, R. & OTROS., 2005.** Biotecnología ambiental. Editorial TÉBAR. Madrid, España. Pp. 381-385, 393-394.
7. **CLOCKSIN, K.; JUNG, D. & MADIGAN, M., 2007.** Cold- Active. Chemmorganotrophic bacteria from permanently ice-covered lake Hoare, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied and environmental microbiology*, p. 3007.3083.
8. **COMERIO, R.; TARAPOW, M.; VÁSQUEZ, S. & CORMACK, W., 2007.** Bacterias adaptadas al frío. *Revista Ciencia Hoy*. Vol. 17. No. 99. Buenos Aires. Argentina.
9. **D'AMICO, S.; COLLINS, T.; MARX, JC.; FELLER, G. & GERDAY, C., 2006.** Psychrophilic microorganisms: challenges for life. Laboratory or biochemistry. Institute of Chemistry, University of Liege, Sart-Tilman, Bélgica. *Review: 7*, 385-389.
10. **DOMÍNGUEZ, Y., 2008.** Bacterias antárticas y agentes antibacterianos. *Boletín Antártico Chileno*. Vol. 27. No.1. Punta Arenas, Chile.
11. **FELLER, G. & GERDAY, CH., 2003.** Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews: Microbiology*: 10-1038 Vol. 1
12. **GERDAY, C.; AITTALEB, M.; BENTAHIR, M.; CHESSA, J. P.; CLAVERIE, P.; COLLINS, T.; D'AMICO, S.; DUMONT, J.; GARSOUX, G.; GEORLETTE, D.; HOYOUX, A.; LONHIENNE, T.; MEUWIS, M.; AND FELLER, G., 2000.** Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology* **18**, 103–107.

13. **GOFF, L., 1999.** Entrevista: Biodiversidad Antártica. Universidad de Buenos Aires. Publicado por Diario el País.
14. **GONZALES-ROCHA, G.; SÁNCHEZ, R. & ALEGRÍA, K., 2010.** Bacterias antárticas: un potencial para la producción de compuestos con actividad antibacteriana. Boletín Antártico Chileno. Vol. 29. Punta Arenas, Chile.
15. **HÉRNANDEZ, A.; ALFARO, I. & ARRIETA, R., 2003.** Microbiología Industrial. Primera edición. Editorial. Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. Pp. 21-30.
16. **HERRERA, A., 2000.** La clasificación numérica y la aplicación en la ecología. Instituto Tecnológico de Santo Domingo. República Dominicana. Pp. 42.
17. **INSTITUTO ANTÁRTICO PERUANO INANPE.** Flora y fauna. Instituto de estudios geopolíticos y estratégicos.
18. **LARKIN, J. & PEARCE, D., 1966.** Isolation of Psychrophilic Species of *Bacillus*. American Society of Microbiology. *Journal of Bacteriology*. Vol. 91. No. 5.
19. **LAYNBURN, J. & PERCE, D., 2007.** The biodiversity and ecology of Antarctic lakes: models for evolution. *Philosophical transactions of royal society*. **362**, 2273-2289.
20. **MADIGAN, M.; MARTINKO, J. & PARKER, J., 2004.** Biología de los microorganismos. Décima edición. Pearson Prentice Hall. Madrid. Pp. 151-155.
21. **MARUYAMA, A.; HONDA, D.; YAMAMOTO, H.; KITAMURA, K. & HIGASHIHARA, T., 2000.** Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolates from Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**, 835-846.
22. **MOURA, J.; BOSCO, J. & CUNHA, L., 1999.** Comparasion of Similarity Coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genetics and molecular biology*, **22(3)**: 427-432.
23. **MUÑOZ, G.; DOMÍNGUEZ, M.; HERNÁNDEZ. & GONZÁLEZ, G., 2010.** Biodivesidad bacteriana antártica: un desafío actual. Boletín Antártico Chileno. Vol. 29. No. 2.
24. **NICHOLS, C.M.; LARDIERE, S.G.; BOWMAN, J.P.; NICHOLS, P.D.; GIBSON, J. & GUEZENNEC, J., 2005.** Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microbiology Ecology* 49: 578-589.
25. **OLIVAS, E., 2004.** Manual de prácticas de Microbiología I, II y Parasitología. Primera edición. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Departamento de Ciencias Básicas. Academia de Microbiología y Parasitología. Pp. 17.

26. PANDEY, K.; SHUKLA, S.; SHUKLA, P.; GIRI, D.; SINGH, J. & KASHYAP, A., 2004. Cyanobacteria in Antarctica: ecology, physiology and cold adaptation. *Center of Advance Study in botany*, India.
27. QUINTANA, R. J.; AGRAZ, J. L. & BORGIO, L. C., 1995. Biodiversidad en la Antártida. Departamento de biología. *Instituto Antártico Argentino*. Vol. 6. No. 31.
28. RETAMALES, J., 2010. Especial biodiversidad Antártica. *Boletín Antártico Chileno*. Vol. 29. No.1. Punta Arenas, Chile.
29. REVILLA, A., 1982. Tecnología de la leche: procesamiento, manufactura y análisis. Segunda Edición. San José. Costa Rica. Pp. 56, 57.
30. RODRÍGUEZ, C. E.; GAMBOA, A.; HERNÁNDEZ, F. & GARCÍA, J. 2005. Biotecnología general: Principios y practicas de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. Pp. 149-157.
31. ROGERS, D., 2007. Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. *Philosophical Transactions of the royal society*. Reino Unido.
32. SORIA, V.; SOLARI, A.; CABOT, S.; VARELA, H. & LOPERENA, L., 2008. Evaluación de bacterias Antárticas como potenciales productoras de lipasas de interés industrial. Uruguay.
33. STAKA, R. & STOKES, J., 1960. Psychrophilic bacteria from Antarctica. *Washington State University*.
34. STREBEL, O.; MERKI, R. & MAN, H. L., 1998. Life of Antarctica. ORACLE thinkquest education fundation.
35. URIBE, P., 1998. Flora de la Antártida. Basado en apuntes del libro “ Uruguay en la Antártida”. Publicado por el Instituto Antártico Uruguayo. Asociación Civil ANTARKOS.
36. VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K. & SWINGS, J., 1996. Polyphasic Taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, **60(2)**: 407-438.
37. VANDERZANT, C.; JUDKINS, P.; NICKELSON, R. & FITZHUGH, H., 1972. Numerical taxonomy of Coryneform Bacteria isolated from Pond-Reared Shrimp (*Penaeus aztecus*) and pond water. *Applied Microbiology*, **23(1)**: 38-45.

# **ANEXO A**

## **DATOS EXPERIMENTALES**

**Tabla A1.** Características físico-química de las muestras medioambientales.

<b>Muestra</b>	<b>pH</b>	<b>Conductividad (<math>\mu\text{s}</math>)</b>	<b>% Humedad</b>	<b>% Materia Orgánica</b>
Suelo	6.1	207	17.62	7.98
Sedimentos	7.6	66	20.45	4.17
Arena	7.1	2509	15.19	4.03

**Tabla A2.** Número de colonias obtenidos de los platos del aislamiento selectivo.

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>Medio</b>	<b>Dilución</b>	<b>N</b>
Suelo	4	AN	1/1000	102
Suelo	4	AN	1/1000	98
Sedimentos	4	AN	1/1000	221
Sedimentos	4	AN	1/1000	205
Arena	4	AN	1/1000	104
Arena	4	AN	1/1000	107
Suelo	4	WA	1/1000	86
Suelo	4	WA	1/1000	93
Sedimentos	4	WA	1/1000	273
Sedimentos	4	WA	1/1000	281
Arena	4	WA	1/1000	76
Arena	4	WA	1/1000	69
Suelo	26	AN	1/100	218
Suelo	26	AN	1/100	212
Sedimentos	26	AN	1/1000	290
Sedimentos	26	AN	1/1000	298



**Tabla A2. Continuación....**

Arena	26	AN	1/100	129
Arena	26	AN	1/100	139
Suelo	26	WA	1/100	138
Suelo	26	WA	1/100	147
Sedimentos	26	WA	1/100	236
Sedimentos	26	WA	1/100	243
Arena	26	WA	1/100	36
Arena	26	WA	1/100	38

**Tabla A3.** Número de colonias diferentes de bacterias creciendo en los platos del aislamiento selectivo.

Muestra	Temperatura (°C)	Medio	Repetición	Dilución	# Col. Diferentes
Suelo	4	AN	R1	1/1000	4
Suelo	4	AN	R2	1/1000	5
Sedimentos	4	AN	R1	1/1000	5
Sedimentos	4	AN	R2	1/1000	5
Arena	4	AN	R1	1/1000	10
Arena	4	AN	R2	1/1000	8
Suelo	4	WA	R1	1/1000	2
Suelo	4	WA	R2	1/1000	2
Sedimentos	4	WA	R1	1/1000	3
Sedimentos	4	WA	R2	1/1000	3
Arena	4	WA	R1	1/1000	4

**Tabla A3. Continuación...**

Arena	4	WA	R2	1/1000	3
Suelo	26	AN	R1	1/100	4
Suelo	26	AN	R2	1/100	6*
Sedimentos	26	AN	R1	1/1000	3
Sedimentos	26	AN	R2	1/1000	4*
Arena	26	AN	R1	1/100	8
Arena	26	AN	R2	1/100	8
Suelo	26	WA	R1	1/100	5*
Suelo	26	WA	R2	1/100	5*
Sedimentos	26	WA	R1	1/100	2
Sedimentos	26	WA	R2	1/100	3
Arena	26	WA	R1	1/100	7**
Arena	26	WA	R2	1/100	7*

\* Una de las colonias pertenece a actinomicetes.

\*\* Dos de las colonias pertenecen a actinomicetes.

**Tabla A4. Número de ufc/gramo de suelo seco.**

Muestra	Temperatura (°C)	Medio	Repetición	Dilución	UFC/g suelo seco
Suelo	4	AN	R1	1/1000	1,11E+07
Suelo	4	AN	R2	1/1000	1,07E+07
Sedimentos	4	AN	R1	1/1000	2,50E+07
Sedimentos	4	AN	R2	1/1000	2,32E+07
Arena	4	AN	R1	1/1000	1,10E+07
Arena	4	AN	R2	1/1000	1,14E+07

**Tabla A4. Continuación....**

Suelo	4	WA	R1	1/1000	9,40E+06
Suelo	4	WA	R2	1/1000	1,02E+07
Sedimentos	4	WA	R1	1/1000	3,09E+07
Sedimentos	4	WA	R2	1/1000	3,18E+07
Arena	4	WA	R1	1/1000	8,07E+06
Arena	4	WA	R2	1/1000	7,32E+06
Suelo	26	AN	R1	1/100	2,38E+07
Suelo	26	AN	R2	1/100	2,32E+07
Sedimentos	26	AN	R1	1/1000	3,28E+07
Sedimentos	26	AN	R2	1/1000	3,37E+07
Arena	26	AN	R1	1/100	1,37E+07
Arena	26	AN	R2	1/100	1,48E+07
Suelo	26	WA	R1	1/100	1,51E+07
Suelo	26	WA	R2	1/100	1,61E+07
Sedimentos	26	WA	R1	1/100	2,67E+07
Sedimentos	26	WA	R2	1/100	2,75E+07
Arena	26	WA	R1	1/100	3,82E+06
Arena	26	WA	R2	1/100	4,03E+06

**Tabla A5. Codificación de cultivos bacterianos aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida.**

<b>Código</b>	<b>Muestra</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Medio</b>	<b>Repetición</b>	<b>Dilución</b>
DG-200	Arena	4	AN	R2	1/100
DG-201	Arena	4	AN	R2	1/100

**Tabla A5. Continuación...**

DG-202	Arena	4	AN	R2	1/100
DG-203	Arena	4	AN	R2	1/1000
DG-204	Arena	4	AN	R2	1/1000
DG-205	Arena	4	AN	R2	1/1000
DG-206	Arena	4	AN	R2	1/1000
DG-207	Arena	4	AN	R2	1/1000
DG-208	Arena	4	AN	R2	1/1000
DG-209	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-210	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-211	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-212	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-213	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-214	Arena	4	AN	R2	1/1000
DG-215	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-216	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-17	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-218	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-219	Suelo	4	AN	R2	1/100
DG-220	Suelo	4	AN	R1	1/1000
DG-221	Suelo	4	AN	R1	1/100
DG-222	Suelo	4	AN	R2	1/1000
DG-223	Sedimentos	4	AN	R2	1/1000
DG-224	Sedimentos	4	AN	R1	1/1000
DG-225	Sedimentos	4	AN	R1	1/1000
DG-226	Sedimentos	4	AN	R1	1/1000
DG-227	Sedimentos	4	AN	R2	1/1000
DG-228	Arena	4	AN	R2	1/1000
DG-229	Sedimentos	4	AN	R1	1/1000

**Tabla A5. Continuación...**

DG-230	Arena	4	AN	R2	1/100
DG-231	Arena	4	AN	R2	1/1000
DG-232	Sedimentos	4	AN	R1	1/1000
DG-233	Sedimentos	4	AN	R2	1/100
DG-234	Sedimentos	4	AN	R1	1/100
DG-235	Sedimentos	4	AN	R2	1/1000
DG-236	Sedimentos	4	AN	R1	1/1000
DG-237	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-238	Suelo	4	AN	R2	1/100
DG-239	Suelo	4	AN	R2	1/100
DG-240	Suelo	4	AN	R2	1/100
DG-241	Suelo	4	AN	R2	1/1000
DG-242	Suelo	4	AN	R2	1/1000
DG-243	Suelo	4	AN	R2	1/1000
DG-244	Suelo	4	AN	R2	1/1000
DG-245	Suelo	4	AN	R2	1/1000
DG-246	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-247	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-248	Arena	4	AN	R1	1/1000
DG-300	Suelo	4	WA	R1	1/1000
DG-301	Suelo	4	WA	R1	1/100
DG-302	Suelo	4	WA	R2	1/100
DG-303	Sedimentos	4	WA	R2	1/100
DG-304	Sedimentos	4	WA	R1	1/1000
DG-305	Sedimentos	4	WA	R1	1/1000
DG-306	Sedimentos	4	WA	R2	1/1000
DG-307	Sedimentos	4	WA	R2	1/1000
DG-308	Sedimentos	4	WA	R2	1/1000

**Tabla A5. Continuación...**

DG-309	Sedimentos	4	WA	R2	1/1000
DG-310	Sedimentos	4	WA	R1	1/1000
DG-311	Arena	4	WA	R1	1/1000
DG-312	Arena	4	WA	R1	1/100
DG-313	Arena	4	WA	R1	1/100
DG-314	Arena	4	WA	R1	1/100
DG-315	Arena	4	WA	R1	1/1000
DG-316	Arena	4	WA	R2	1/1000
DG-317	Arena	4	WA	R2	1/1000
DG-318	Arena	4	WA	R2	1/100
DG-319	Arena	4	WA	R2	1/100
DG-320	Arena	4	WA	R2	1/100
DG-101	Arena	26	AN	R1	1/100
DG-102	Arena	26	AN	R1	1/100
DG-104	Sedimentos	26	AN	R1	1/100
DG-105	Sedimentos	26	AN	R1	1/100
DG-107	Suelo	26	AN	R2	1/1000
DG-108	Sedimentos	26	AN	R2	1/1000
DG-110	Suelo	26	AN	R2	1/1000
DG-111	Suelo	26	AN	R2	1/1000
DG-112	Suelo	26	AN	R1	1/1000
DG-113	Suelo	26	AN	R1	1/1000
DG-115	Suelo	26	AN	R2	1/1000
DG-116	Suelo	26	AN	R2	1/1000
DG-117	Suelo	26	AN	R2	1/1000
DG-118	Arena	26	AN	R1	1/1000
DG-119	Arena	26	AN	R1	1/1000
DG-120	Arena	26	AN	R1	1/1000

**Tabla A5. Continuación...**

DG-121	Arena	26	AN	R1	1/10
DG-123	Arena	26	AN	R2	1/100
DG-124	Arena	26	AN	R2	1/100
DG-125	Sedimentos	26	AN	R2	1/1000
DG-126	Sedimentos	26	AN	R2	1/1000
DG-127	Sedimentos	26	AN	R2	1/1000
DG-128	Suelo	26	WA	R1	1/100
DG-129	Suelo	26	WA	R1	1/1000
DG-130	Suelo	26	WA	R2	1/1000
DG-134	Suelo	26	WA	R1	1/1000
DG-135	Suelo	26	WA	R1	1/1000
DG-136	Suelo	26	WA	R2	1/1000
DG-138	Suelo	26	WA	R2	1/1000
DG-140	Arena	26	WA	R1	1/100
DG-140'	Arena	26	WA	R1	1/100
DG-141	Arena	26	WA	R1	1/100
DG-147	Arena	26	WA	R1	1/10
DG-152	Suelo	26	WA	R1	1/10
DG-153	Suelo	26	WA	R1	1/10
DG-154	Arena	26	AN	R1	1/1000
DG-155	Arena	26	AN	R1	1/1000
DG-156	Arena	26	AN	R1	1/1000
DG-157	Arena	26	AN	R1	1/1000
DG-158	Arena	26	AN	R1	1/1000
DG-159	Arena	26	AN	R1	1/1000
DG-162	Arena	26	WA	R1	1/100
DG-163	Arena	26	WA	R1	1/100
DG-164	Arena	26	WA	R1	1/100

**Tabla A5. Continuación...**

DG-165	Arena	26	WA	R1	1/100
DG-167	Arena	26	WA	R2	1/100
DG-168	Arena	26	WA	R2	1/100
DG-169	Arena	26	WA	R2	1/100
DG-170	Arena	26	WA	R1	1/10
DG-171	Arena	26	WA	R1	1/100
DG-172	Arena	26	WA	R1	1/100
DG-173	Arena	26	WA	R1	1/100
DG-174	Sedimentos	26	WA	R1	1/100
DG-176	Sedimentos	26	WA	R1	1/100
DG-177	Sedimentos	26	WA	R1	1/100
DG-178	Sedimentos	26	WA	R2	1/100
DG-179	Suelo	26	WA	R2	1/100
DG-181	Suelo	26	WA	R2	1/100
DG-182	Sedimentos	26	WA	R2	1/100
DG-183	Sedimentos	26	WA	R2	1/1000
DG-184	Sedimentos	26	WA	R2	1/100
DG-186	Suelo	26	WA	R1	1/100
DG-186'	Suelo	26	WA	R1	1/100
DG-187	Suelo	26	AN	R2	1/100
DG-188	Suelo	26	AN	R2	1/100
DG-190	Arena	26	AN	R2	1/1000
DG-190'	Arena	26	AN	R2	1/1000
DG-192	Arena	26	AN	R2	1/1000
DG-193	Sedimentos	26	AN	R1	1/100
DG-195	Suelo	26	AN	R2	1/10
DG-196	Suelo	26	AN	R2	1/10
DG-122	Suelo	26	AN	R2	1/100



**Tabla A5. Continuación...**

DG-131	Suelo	26	WA	R2	1/1000
DG-180	Suelo	26	WA	R2	1/100
DG-133	Suelo	26	WA	R1	1/1000
DG-139	Arena	26	WA	R1	1/100
DG-148	Arena	26	WA	R2	1/10
DG-142	Arena	26	WA	R1	1/10
DG-144	Arena	26	WA	R1	1/10
DG-149	Arena	26	WA	R2	1/10
DG-161	Arena	26	WA	R1	1/100

**Tabla A6.** Codificación de cultivos de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida.

<b>Código</b>	<b>Muestra</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Repetición</b>	<b>Medio</b>	<b>Dilución</b>
DG-106	Sedimentos	26	AN	R2	1/100
DG-122	Suelo	26	AN	R2	1/100
DG-131	Suelo	26	WA	R2	1/1000
DG-180	Suelo	26	WA	R2	1/100
DG-133	Suelo	26	WA	R1	1/1000
DG-139	Arena	26	WA	R1	1/100
DG-148	Arena	26	WA	R2	1/10
DG-142	Arena	26	WA	R1	1/10
DG-144	Arena	26	WA	R1	1/10
DG-149	Arena	26	WA	R2	1/10
DG-161	Arena	26	WA	R1	1/100

**Tabla A7.** Grupos de color formado por los cultivos bacterianos aislados de las muestras medioambientales.

<b>Grupo de color</b>	<b>Color</b>	<b>Códigos</b>
1	Marfil	DG-313, DG-236, DG-314, DG-241, DG-244, DG-245, DG-120, DG-123, DG-141, DG-169, DG-177, DG-116, DG-179, DG-126, DG-128, DG-138, DG-140', DG-152, DG-182, DG-174, DG-156, DG-172, DG-174, DG-186, DG-188, DG-112, DG-134, DG-176, DG-129, DG-184, DG-178, DG-154, DG-183, DG-105, DG-190'.
2	Crema	DG-124, DG-102, DG-104, DG-190, DG-239, DG-240, DG-212, DG-214, DG-318, DG-204, DG-211, DG-225, DG-232, DG-248, DG-306, DG-307, DG-312, DG-315, DG-213, DG-242, DG-243, DG-219, DG-238, DG-209.
3	Blanco	DG-222, DG-210, DG-234, DG-235, DG-311, DG-317, DG-221, DG-227, DG-301, DG-302, DG-320, DG-230, DG-201, DG-217, DG-247, DG-164.
4	Ocre oro	DG-216, DG-223, DG-224, DG-226, DG-229, DG-308, DG-310, DG-206, DG-246, DG-309, DG-171, DG-170, DG-147.
5	Amarillo piel	DG-208, DG-220, DG-300, DG-316, DG-126, DG-113, DG-195, DG-118, DG-107, DG-181, DG-130,
6	Amarillo oro	DG-162, DG-108, DG-155, DG-119, DG-157, DG-165, DG-168, DG-159, DG-193.
7	Amarillo cadmio	DG-173, DG-153, DG-136, DG-233, DG-207, DG-218, DG-202, DG-203.
8	Salmón	DG-231, DG-319, DG-304, DG-305, DG-240, DG-267.
9	Melocotón	DG-125, DG-101, DG-215, DG-111

**Tabla A7. Continuación....**

10	Amarillo canario	DG-135, DG-192, DG-110
11	Amarillo limón	DG-228, DG-237, DG-303
12	Verde manzana	DG-187, DG-158
13	Amarillo cremoso	DG-200
14	Sienna natural	DG-205
15	Amarillo	DG-163
16	Coral	DG-196
17	Ladrillo	DG-186
18	Mandarina	DG-121
19	Rosa té	DG-117

**Tabla A8.** Grupos de color formado por los cultivos de actinomicetes aislados de las muestras medioambientales.

Grupo de color	Color		
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	Códigos
1	Blanco	Melocotón	DG-122, DG-106
2	Blanco	Amarillo Piel	DG-131, DG-180, DG-133
3	Lavanda	Plata	DG-161
4	Gris	Gris lunar	DG-148, DG-139
5	-	Marfil	DG-144, DG-149, DG-142

**Tabla A9.** Caracterización microscópica de los cultivos bacterianos aislados.

Código	FORMA			TINCIÓN		
	Bacilos	Cocos	Gram (+)	Gram (-)	Cápsulas	Endosporas
DG-239	+	-	-	+	+	-
DG-240	+	-	-	+	+	-
DG-212	-	+	-	+	+	-

**Tabla A9. Continuación...**

DG-214	-	+	-	+	+	-
DG-318	-	+	-	+	+	-
DG-204	-	+	-	+	+	-
DG-211	-	+	-	+	+	-
DG-225	-	+	-	+	+	-
DG-232	-	+	-	+	+	-
DG-248	-	+	-	+	+	-
DG-306	-	+	-	+	+	-
DG-307	-	+	-	+	+	-
DG-312	-	+	-	+	+	-
DG-315	-	+	-	+	+	-
DG-213	-	+	+	-	+	-
DG-242	-	+	+	-	+	-
DG-243	-	+	+	-	+	-
DG-219	-	+	+	-	+	-
DG-238	-	+	+	-	+	-
DG-209	-	+	+	-	+	-
DG-233	-	+	-	+	+	-
DG-207	-	+	-	+	+	-
DG-218	-	+	-	+	+	-
DG-202	+	-	+	-	+	-
DG-203	+	-	+	-	+	-
DG-208	+	-	-	+	+	-
DG-220	+	-	-	+	+	-
DG-300	+	-	-	+	+	-
DG-228	-	+	+	-	+	-
DG-237	-	+	+	-	+	-
DG-303	-	+	+	-	+	-
DG-231	-	+	+	-	+	-
DG-319	-	+	+	-	+	-
DG-304	+	-	+	-	-	-
DG-305	+	-	+	-	+	-
DG-313	-	+	-	+	+	-
DG-236	+	-	+	-	+	-
DG-314	+	-	+	-	+	-
DG-241	+	-	-	+	+	-
DG-244	+	-	-	+	+	-
DG-245	+	-	-	+	+	-
DG-222	-	+	+	-	+	-
DG-216	+	-	-	+	+	-
DG-223	+	-	-	+	+	-

**Tabla A9. Continuación....**

DG-224	+	-	-	+	+	-
DG-226	+	-	-	+	+	-
DG-229	+	-	-	+	+	-
DG-308	+	-	-	+	+	-
DG-310	+	-	-	+	+	-
DG-206	+	-	-	+	+	-
DG-246	+	-	-	+	+	-
DG-309	+	-	-	+	+	-
DG-210	+	-	-	+	+	-
DG-234	+	-	-	+	+	-
DG-235	+	-	-	+	+	-
DG-311	+	-	-	+	+	-
DG-317	+	-	-	+	+	-
DG-221	+	-	+	-	-	-
DG-227	+	-	+	-	+	-
DG-301	+	-	+	-	+	-
DG-302	+	-	+	-	+	-
DG-320	+	-	+	-	+	-
DG-230	+	-	-	+	+	-
DG-201	-	+	+	-	+	-
DG-217	-	+	+	-	-	-
DG-247	+	-	-	+	+	-
DG-200	-	+	+	-	+	-
DG-205	+	-	-	+	+	-
DG-215	-	+	-	+	+	-
DG-316	+	-	+	-	+	-
DG-101	-	+	+	-	+	-
DG-102	-	+	+	-	+	-
DG-104	-	+	-	+	+	-
DG-105	+	-	-	+	+	-
DG-107	+	-	-	+	+	-
DG-108	+	-	-	+	+	-
DG-110	-	+	-	+	+	-
DG-111	-	+	+	-	+	-
DG-112	+	-	-	+	+	-
DG-113	-	+	-	+	+	-
DG-116	-	+	+	-	+	-
DG-117	-	+	+	-	+	-
DG-118	+	-	-	+	+	-
DG-119	+	-	+	-	+	-
DG-120	-	+	+	-	+	-

**Tabla A9. Continuación....**

DG-121	-	+	-	+	+	-
DG-123	-	+	+	-	+	-
DG-124	+	-	+	-	+	-
DG-125	+	-	-	+	+	-
DG-126	-	+	+	-	+	-
DG-127	-	+	-	+	+	-
DG-128	-	+	+	-	+	-
DG-129	+	-	-	+	+	-
DG-130	-	+	+	-	+	-
DG-134	+	-	-	+	+	-
DG-135	+	-	-	-	+	-
DG-136	-	+	+	-	+	-
DG-138	-	+	+	-	+	-
DG-140	-	+	-	+	+	-
DG-141	-	+	+	-	+	-
DG-147	+	-	+	-	+	-
DG-152	-	+	+	-	+	-
DG-153	-	+	+	-	+	-
DG-154	+	-	-	+	+	-
DG-155	+	-	-	+	+	-
DG-156	-	+	-	+	+	-
DG-157	+	-	+	-	+	-
DG-158	-	+	+	-	+	-
DG-159	+	-	+	-	+	-
DG-162	+	-	-	+	+	-
DG-163	-	+	-	+	+	-
DG-164	-	+	-	+	+	-
DG-165	+	-	+	-	+	-
DG-167	-	+	-	+	+	-
DG-168	+	-	+	-	+	-
DG-169	-	+	+	-	+	-
DG-170	+	-	+	-	+	-
DG-171	+	-	+	-	+	-
DG-172	-	+	-	+	+	-
DG-173	-	+	+	-	+	-
DG-174	-	+	-	+	+	-
DG-174	-	+	-	+	+	-
DG-176	+	-	-	+	+	-
DG-177	-	+	+	-	+	-
DG-178	+	-	-	+	+	-
DG-179	-	+	+	-	+	-

**Tabla A9. Continuación....**

DG-181	+	-	-	+	+	-
DG-182	-	+	-	+	+	-
DG-183	+	-	-	+	+	-
DG-184	+	-	-	+	+	-
DG-186	+	-	-	+	+	-
DG-187	-	+	+	-	+	-
DG-188	+	-	-	+	+	-
DG-190	-	+	+	-	+	-
DG-192	+	-	-	+	+	-
DG-193	-	+	-	+	+	-
DG-195	-	+	-	+	+	-
DG-196	+	-	-	+	+	-
DG-140'	-	+	+	-	+	-
DG-186'	-	+	-	+	+	-
DG-190'	+	-	-	+	+	-

**Tabla A10. Caracterización microscópica de los cultivos de actinomicetes aislados.**

<b>Código</b>	<b>Forma de la cadena</b>
DG-106	Recta
DG-122	Recta
DG-131	Recta
DG-180	Recta
DG-133	Recta
DG-139	Incompleta
DG-148	Incompleta
DG-142	-
DG-144	-
DG-149	-
DG-161	incompleta

**Tabla A11. Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura.**

<b>Código</b>	<b>Temperatura (°C)</b>				<b>Clasificación</b>	<b>Código</b>	<b>Temperatura (°C)</b>				<b>Clasificación</b>
	<b>4</b>	<b>26</b>	<b>37</b>	<b>50</b>			<b>4</b>	<b>26</b>	<b>37</b>	<b>50</b>	
DG-101	1	1	1	0	Mesófilo	DG-196	1	1	1	0	Mesófilo

**Tabla A11. Continuación....**

DG-102	1	1	1	0	Mesófilo	DG-200	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-104	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-201	1	1	1	0	Mesófilo
DG-105	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-202	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-107	0	1	1	0	Mesófilo	DG-203	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-108	1	1	1	0	Mesófilo	DG-204	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-110	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-205	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-111	1	1	1	0	Mesófilo	DG-206	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-112	1	1	1	0	Mesófilo	DG-207	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-113	1	1	1	0	Mesófilo	DG-208	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-116	1	1	1	0	Mesófilo	DG-209	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-117	1	1	1	0	Mesófilo	DG-210	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-118	0	1	1	0	Mesófilo	DG-211	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-119	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-212	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-120	1	1	1	0	Mesófilo	DG-213	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-121	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-214	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-123	1	1	1	0	Mesófilo	DG-215	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-124	0	1	1	0	Mesófilo	DG-216	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-125	1	1	1	0	Mesófilo	DG-217	1	1	1	0	Mesófilo
DG-126	1	1	1	0	Mesófilo	DG-218	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-127	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-219	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-128	1	1	1	0	Mesófilo	DG-220	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-129	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-221	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-130	1	1	1	0	Mesófilo	DG-222	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-134	1	1	1	0	Mesófilo	DG-223	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-135	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-224	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-136	0	1	1	0	Mesófilo	DG-225	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-138	1	1	1	0	Mesófilo	DG-226	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-140	0	1	1	0	Mesófilo	DG-227	1	1	0	0	Psicrótrofo



**Tabla A11. Continuación....**

DG-140'	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-228	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-141	1	1	1	0	Mesófilo	DG-229	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-147	1	1	1	0	Mesófilo	DG-230	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-152	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-231	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-153	0	1	1	0	Mesófilo	DG-232	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-154	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-233	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-155	1	1	1	0	Mesófilo	DG-234	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-156	1	1	1	0	Mesófilo	DG-235	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-157	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-236	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-158	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-237	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-159	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-238	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-162	1	1	1	0	Mesófilo	DG-239	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-163	1	1	1	1	Mesófilo (Termófilo)	DG-240	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-164	0	1	1	0	Mesófilo	DG-241	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-165	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-242	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-167	0	1	1	0	Mesófilo	DG-243	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-168	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-244	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-169	1	1	1	0	Mesófilo	DG-245	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-170	1	1	1	0	Mesófilo	DG-246	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-171	1	1	1	0	Mesófilo	DG-247	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-172	1	1	1	0	Mesófilo	DG-248	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-173	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-300	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-174	1	1	1	0	Mesófilo	DG-301	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-174	1	1	1	0	Mesófilo	DG-302	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-176	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-303	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-177	1	1	1	0	Mesófilo	DG-304	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-178	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-305	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-179	1	1	1	0	Mesófilo	DG-306	1	1	0	0	Psicrótrofo

**Tabla A11. Continuación....**

DG-181	1	1	1	0	Mesófilo	DG-307	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-182	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-308	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-183	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-309	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-184	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-310	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-186	1	1	1	0	Mesófilo	DG-311	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-186'	0	1	1	0	Mesófilo	DG-312	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-187	1	1	1	0	Mesófilo	DG-313	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-188	1	1	1	0	Mesófilo	DG-314	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-190	1	1	1	0	Mesófilo	DG-315	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-190'	0	1	1	0	Mesófilo	DG-316	1	0	0	0	Psicrófilo
DG-192	1	1	0	0	Psicrótrofo	DG-317	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-193	1	1	1	0	Mesófilo	DG-318	1	1	0	0	Psicrótrofo
DG-195	1	1	1	0	Mesófilo	DG-319	1	1	0	0	Psicrótrofos
						DG-320	1	1	0	0	Psicrótrofos

**Tabla A12.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de acuerdo a la temperatura de aislamiento.

	Temperatura de aislamiento	
	26 (°C)	4 (°C)
Mesófilos	47	2
Mesófilo extremo	1	0
Psicrófilos	0	13
Psicrótrofo	23	55

**Tabla A13.** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura.

Código	Temperatura (°C)				Clasificación
	4	26	37	50	
DG-106	1	1	1	0	Mesófilo
DG-122	1	1	1	0	Mesófilo

**Tabla A13. Continuación....**

DG-131	0	1	1	0	Mesófilo
DG-180	0	1	1	0	Mesófilo
DG-133	0	1	1	0	Mesófilo
DG-139	0	1	1	0	Mesófilo
DG-148	0	1	1	0	Mesófilo
DG-142	0	1	1	0	Mesófilo
DG-144	0	1	1	0	Mesófilo
DG-149	0	1	1	0	Mesófilo
DG-161	0	1	1	0	Mesófilo

**Tabla A14.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.

Código	pH					Clasificación	Código	pH					Clasificación
	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5			4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	
DG-101	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-196	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-102	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-200	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-104	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-201	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-105	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-202	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-107	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-203	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-108	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-204	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-110	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-205	0	0	1	0	0	Neutrófilo
DG-111	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-206	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-112	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-207	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-113	1	1	1	1	0	Neutrotolerante	DG-208	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-116	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-209	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-117	0	0	1	1	1	Alcalitolerante	DG-210	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-118	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-211	1	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-119	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-212	0	0	1	1	0	Neutrófilo

**Tabla A14. Continuación...**

DG-120	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-213	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-121	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-214	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-123	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-215	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-124	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-216	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DG-125	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-217	1	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-126	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-218	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-127	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-219	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-128	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-220	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-129	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-221	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-130	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-222	0	0	(+/-)	1	0	Neutrófilo
DG-134	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-223	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DG-135	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-224	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DG-136	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-225	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-138	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-226	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DG-140	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-227	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-140'	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-228	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-141	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-229	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DG-147	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-230	0	1	1	0	0	Neutrotolerante
DG-152	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-231	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-153	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-232	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-154	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-233	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-155	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-234	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-156	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-235	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-157	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-236	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-158	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-237	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-159	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-238	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-162	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-239	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-163	0	1	1	1	(+1)	Alcalitoleante	DG-240	0	1	1	1	0	Neutrófilo

**Tabla A14. Continuación...**

DG-164	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-241	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-165	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-242	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-167	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-243	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-168	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-244	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-169	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-245	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-170	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-246	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-171	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-247	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DG-172	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-248	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-173	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-300	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-174	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-301	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-174	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-302	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-176	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-303	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-177	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-304	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-178	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-305	0	0	1	0	0	Neutrófilo
DG-179	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-306	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-181	1	1	1	1	0	Neutrotolerante	DG-307	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-182	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-308	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DG-183	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-309	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-184	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-310	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
DG-186	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-311	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-186'	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-312	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-187	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-313	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-188	0	1	1	1	0	Neutrófilo	DG-314	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-190	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-315	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-190'	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-316	0	0	1	0	0	Neutrófilo
DG-192	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-317	0	1	1	1	0	Neutrófilo
DG-193	0	0	1	1	0	Neutrófilo	DG-318	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-195	1	1	1	1	0	Neutrotolerante	DG-319	0	0	1	1	0	Neutrófilo
							DG-320	0	0	1	1	0	Neutrófilo

**Tabla A15.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra.

	Origen de la muestra		
	Suelo	Sedimentos	Arena
Alcalitoletante	1	0	1
Neutrófilo	30	24	55
Neutrotolerante	8	8	14

**Tabla A16.** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.

Código	pH					Clasificación
	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	
DG-106	0	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-122	0	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-131	0	0	1	0	0	Neutrófilo
DG-180	0	0	1	0	0	Neutrófilo
DG-133	0	0	1	0	0	Neutrófilo
DG-139	0	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-148	0	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-142	0	1	1	1	0	Neutrotolerante
DG-144	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-149	0	0	1	1	0	Neutrófilo
DG-161	0	1	1	1	0	Neutrotolerante

**Tabla A17.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

Código	NaCl %			Clasificación	Código	NaCl %			Clasificación
	1	5	10			1	5	10	
DG-101	1	1	0	Halófilo	DG-196	1	1	0	Halófilo
DG-102	1	1	0	Halófilo	DG-200	1	1	0	Halófilo
DG-104	1	1	0	Halófilo	DG-201	1	1	1	Halófilo extremo

**Tabla A17. Continuación....**

DG-105	1	1	0	Halófilo	DG-202	1	1	1	Halófilo extremo
DG-107	1	1	0	Halófilo	DG-203	1	1	1	Halófilo extremo
DG-108	1	1	0	Halófilo	DG-204	1	1	0	Halófilo
DG-110	1	0	0	Halófilo débil	DG-205	1	0	0	Halófilo débil
DG-111	1	0	0	Halófilo débil	DG-206	1	1	0	Halófilo
DG-112	1	1	0	Halófilo	DG-207	1	1	1	Halófilo extremo
DG-113	1	1	0	Halófilo	DG-208	1	0	0	Halófilo débil
DG-116	1	1	0	Halófilo	DG-209	1	0	0	Halófilo débil
DG-117	1	1	1	Halófilo extremo	DG-210	1	1	0	Halófilo
DG-118	1	1	0	Halófilo	DG-211	1	1	0	Halófilo
DG-119	1	1	0	Halófilo	DG-212	1	1	0	Halófilo
DG-120	1	1	0	Halófilo	DG-213	1	0	0	Halófilo débil
DG-121	1	0	0	Halófilo débil	DG-214	1	1	0	Halófilo
DG-123	1	1	0	Halófilo	DG-215	1	0	0	Halófilo débil
DG-124	1	0	0	Halófilo débil	DG-216	1	1	0	Halófilo
DG-125	1	0	0	Halófilo débil	DG-217	1	1	1	Halófilo extremo
DG-126	1	0	0	Halófilo débil	DG-218	1	0	0	Halófilo débil
DG-127	1	0	0	Halófilo débil	DG-219	1	0	0	Halófilo débil
DG-128	1	0	0	Halófilo débil	DG-220	1	0	0	Halófilo débil
DG-129	1	0	0	Halófilo débil	DG-221	1	0	0	Halófilo débil
DG-130	1	0	0	Halófilo débil	DG-222	1	0	0	Halófilo débil
DG-134	1	1	0	Halófilo	DG-223	1	1	0	Halófilo
DG-135	1	0	0	Halófilo débil	DG-224	1	1	0	Halófilo
DG-136	1	1	0	Halófilo	DG-225	1	1	0	Halófilo
DG-138	1	0	0	Halófilo débil	DG-226	1	1	0	Halófilo
DG-140	1	1	0	Halófilo	DG-227	1	0	0	Halófilo débil
DG-140'	1	1	0	Halófilo	DG-228	1	1	0	Halófilo
DG-141	1	1	0	Halófilo	DG-229	1	1	0	Halófilo

**Tabla A17. Continuación....**

DG-147	1	1	1	Halófilo extremo	DG-230	1	1	0	Halófilo
DG-152	1	1	0	Halófilo	DG-231	1	0	0	Halófilo débil
DG-153	1	1	0	Halófilo	DG-232	1	1	0	Halófilo
DG-154	1	1	0	Halófilo	DG-233	1	1	1	Halófilo extremo
DG-155	1	1	0	Halófilo	DG-234	1	1	0	Halófilo
DG-156	1	0	0	Halófilo débil	DG-235	1	1	0	Halófilo
DG-157	1	1	0	Halófilo	DG-236	1	0	0	Halófilo débil
DG-158	1	1	0	Halófilo	DG-237	1	1	0	Halófilo
DG-159	1	1	0	Halófilo	DG-238	1	0	0	Halófilo débil
DG-162	1	1	0	Halófilo	DG-239	1	0	0	Halófilo débil
DG-163	1	1	1	Halófilo extremo	DG-240	1	0	0	Halófilo débil
DG-164	1	1	0	Halófilo	DG-241	1	0	0	Halófilo débil
DG-165	1	1	0	Halófilo	DG-242	1	0	0	Halófilo débil
DG-167	1	1	0	Halófilo	DG-243	1	0	0	Halófilo débil
DG-168	1	1	0	Halófilo	DG-244	1	0	0	Halófilo débil
DG-169	1	1	0	Halófilo	DG-245	1	0	0	Halófilo débil
DG-170	1	1	1	Halófilo extremo	DG-246	1	1	0	Halófilo
DG-171	1	1	1	Halófilo extremo	DG-247	1	1	0	Halófilo
DG-172	1	0	0	Halófilo débil	DG-248	1	1	0	Halófilo
DG-173	1	1	0	Halófilo	DG-300	1	0	0	Halófilo débil
DG-174	1	0	0	Halófilo débil	DG-301	1	0	0	Halófilo débil
DG-174	1	0	0	Halófilo débil	DG-302	1	0	0	Halófilo débil
DG-176	1	0	0	Halófilo débil	DG-303	1	1	0	Halófilo
DG-177	1	1	0	Halófilo	DG-304	1	1	0	Halófilo
DG-178	1	0	0	Halófilo débil	DG-305	1	0	0	Halófilo débil
DG-179	1	0	0	Halófilo débil	DG-306	1	1	0	Halófilo
DG-181	1	1	0	Halófilo	DG-307	1	1	0	Halófilo
DG-182	1	0	0	Halófilo débil	DG-308	1	1	0	Halófilo



**Tabla A17. Continuación....**

DG-183	1	1	0	Halófilo	DG-309	1	1	0	Halófilo
DG-184	1	0	0	Halófilo débil	DG-310	1	1	0	Halófilo
DG-186	1	1	0	Halófilo	DG-311	1	1	0	Halófilo
DG-186'	1	1	1	Halófilo extremo	DG-312	1	1	0	Halófilo
DG-187	1	1	0	Halófilo	DG-313	1	0	0	Halófilo débil
DG-188	1	1	0	Halófilo	DG-314	1	1	0	Halófilo
DG-190	1	0	0	Halófilo débil	DG-315	1	1	0	Halófilo
DG-190'	1	0	0	Halófilo débil	DG-316	1	0	0	Halófilo débil
DG-192	1	0	0	Halófilo débil	DG-317	1	1	0	Halófilo
DG-193	1	0	0	Halófilo débil	DG-318	1	1	0	Halófilo
DG-195	1	1	0	Halófilo	DG-319	1	0	0	Halófilo débil
					DG-320	1	0	0	Halófilo débil

**Tabla A18.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra.

	Suelo	Sedimentos	Arena
Halófilo débil	22	12	20
Halófilos	17	20	38
Halófilo extremo	5	1	6

**Tabla A19.** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

Código	NaCl %			Clasificación
	1	5	10	
DG-106	1	1	1	Halófilo extremo
DG-122	1	1	1	Halófilo extremo
DG-131	1	1	0	Halófilo
DG-180	1	1	0	Halófilo
DG-133	1	1	0	Halófilo

**Tabla A19. Continuación....**

DG-139	1	1	1	Halófilo extremo
DG-148	1	1	1	Halófilo extremo
DG-142	1	1	0	Halófilo
DG-144	1	1	0	Halófilo
DG-149	1	1	0	Halófilo
DG-161	1	1	1	Halófilo extremo

**Tabla A20.** Grupos - especies basados en el 90% de similitud a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de bacterias.

<b>Grupo especie</b>	<b>Miembros del grupo</b>
1	DG-239, DG-240, DG-208, DG-220, DG-300, DG-244, DG-205, DG-218
2	DG-204, DG-211, DG-225, DG-232, DG-248, DG-306, DG-307, DG-312, DG-315, DG-233, DG-207, DG-113, DG-195
3	DG-213, DG-242, DG-243, DG-238, DG-209, DG-101, DG-173, DG-190, DG-219, DG-231, DG-319
4	DG-313, DG-193
5	DG-111, DG-116, DG-177, DG-120, DG-169, DG-141, DG-123, DG-152, DG-140', DG-126, DG-179, DG-138, DG-128, DG-130, DG-156, DG-174, DG-175, DG-172, DG-182
6	DG-202, DG-203, DG-147, DG-171, DG-170
7	DG-117
8	DG-236, DG-314
9	DG-105, DG-183, DG-154, DG-129, DG-184, DG-176, DG-178
10	DG-216, DG-223, DG-224, DG-226, DG-229, DG-308, DG-310, DG-206, DG-246, DG-309
11	DG-107, DG-118
12	DG-190'
13	DG-181
14	DG-186'

**Tabla A20. Continuación....**

15	DG-212, DG-214, DG-318, DG-104, DG-215, DG-121, DG- 127
16	DG-110
17	DG-140, DG-167, DG-164
18	DG-163
19	DG-112, DG-188, DG-186, DG-134, DG-196, DG-125, DG-135, DG-192
20	DG-200
21	DG-102, DG-136, DG-153, DG-158, DG-187
22	DG-119, DG-168, DG-165, DG-159, DG-157
23	DG-304
24	DG-305, DG-316
25	DG-241, DG-245, DG-108, DG-162, DG-155
26	DG-210, DG-234, DG-235, DG-311, DG-317, DG-230, DG-247
27	DG-222, DG-221, DG-227, DG-301, DG-302, DG-320
28	DG-124
29	DG-228, DG-237, DG-303
30	DG-201, DG-217

**Tabla A21.** Grupos - especies basados en el 90% de similitud a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes.

<b>Grupo especie</b>	<b>Miembros del grupo</b>
1	DG-106, DG-122
2	DG-131, DG-180, DG-133
3	DG-138, DG-148
4	DG- 161
5	DG-142, DG-144, DG-149

# **ANEXO B**

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

**Tabla B1.** Análisis de varianza para el número de ufc por gramo de suelo seco (ufc/g).

Fuente de variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
A: Origen de la muestra	2	1.64E+15	8.21E+14	2067.18	0.000
B: Temperatura de incubación	1	8.46E+13	8.46E+13	212.90	0.000
C: Medio de Cultivo	1	7.91E+13	7.91E+13	199.07	0.000
AB	2	9.62E+13	4.81E+13	121.02	0.000
AC	2	5.77E+13	2.88E+13	72.61	0.000
BC	1	1.21E+14	1.21E+14	305.05	0.000
ABC	2	1.46E+13	7.31E+12	18.39	0.0002
ERROR	12	4.76E+12	3.97E+11		
TOTAL	23				

**Tabla B2.** Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco del factor A.

Origen de la Muestra	Ufc/g suelo seco	Rango
Muestra compuesta de sedimentos de lago	2.895E+7	A
Muestra compuesta de suelo	1.494E+7	B
Muestra compuesta de arena de playa	9.259E+6	C

**Tabla B3.** Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco de la interacción AxB.

Tratamientos Interacción AxB	Descripción	Ufc/g suelo seco	Rango
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	Muestra de sedimentos + 26°C	3.018E+7	A
a <sub>1</sub> b <sub>0</sub>	Muestra de sedimentos + 4°C	2.772E+7	B
a <sub>0</sub> b <sub>1</sub>	Muestra de suelo + 26°C	1.953E+7	C
a <sub>0</sub> b <sub>0</sub>	Muestra de suelo + 4°C	1.035E+7	D
a <sub>2</sub> b <sub>0</sub>	Muestra de arena + 4°C	9.445E+6	D
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	Muestra de arena + 26°C	9.073E+6	D

**Tabla B4.** Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco de la interacción AxC.

<b>Tratamientos Interacción AxC</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ufc/g suelo seco</b>	<b>Rango</b>
a <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de sedimentos + WA	2.922E+7	A
a <sub>1</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de sedimentos + AN	2.868E+7	A
a <sub>0</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de suelo + AN	1.721E+7	B
a <sub>2</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de arena + AN	1.271E+7	C
a <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de suelo + WA	1.267E+7	C
a <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de arena + WA	5.810E+6	D

**Tabla B5.** Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco de la interacción BxC.

<b>Tratamientos Interacción BxC</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ufc/g suelo seco</b>	<b>Rango</b>
b <sub>1</sub> C <sub>0</sub>	26°C + AN	2.366E+7	A
b <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	4°C + WA	1.627E+7	B
b <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	26°C + WA	1.553E+7	B
b <sub>0</sub> C <sub>0</sub>	4°C + AN	1.541E +7	B

**Tabla B6.** Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco de la interacción AxBxC.

<b>Tratamientos Interacción AxBxC</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ufc/g suelo seco</b>	<b>Rango</b>
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de sedimentos+26°C+AN	3.326E+7	A
a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de sedimentos+4°C+WA	3.134E+7	B
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de sedimentos+26°C+WA	2.710E+7	C
a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de sedimentos+4°C+AN	2.410E+7	D
a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de suelo+26°C+AN	2.349E+7	D
a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de suelo+26°C+WA	1.557E+7	E
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de arena+26°C+AN	1.422E+7	F

**Tabla B6. Continuación....**

a <sub>2</sub> b <sub>0</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de arena+4°C+AN	1.120E+7	G
a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de suelo+4°C+AN	1.092E+7	G
a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de suelo+4°C+WA	9.778E+6	H
a <sub>2</sub> b <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de arena+4°C+WA	7.694E+6	I
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de arena+26°C+WA	3.926E+6	J

**Tabla B7. Análisis de varianza para la diversidad bacteriana.**

Fuente de variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
A: Origen de la muestra	2	51.583	25.792	51.583	0.000
B: Temperatura de incubación	1	2.667	2.667	5.333	0.039
C: Medio de Cultivo	1	24	24	48	0.004
AB	2	8.583	4.292	8.583	0.000
AC	2	4.750	2.375	4.75	0.030
BC	1	10.667	10.667	21.33	0.000
ABC	2	3.083	1.542	3.083	0.083
ERROR	12	6	0.5		
TOTAL	23	111.333			

**Tabla B8. Separación de medias para la diversidad bacteriana del factor A.**

Origen de la Muestra	Diversidad	Rango
Muestra compuesta de arena de playa	7	A
Muestra compuesta de suelo	4	B
Muestra compuesta de sedimentos	3	B

**Tabla B9. Separación de medias para la diversidad bacteriana de la interacción AxB.**

Tratamientos Interacción AxB	Descripción	Diversidad	Rango
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	Muestra de arena + 26°C	8	A
a <sub>2</sub> b <sub>0</sub>	Muestra de arena + 4°C	6	AB
a <sub>0</sub> b <sub>1</sub>	Muestra de suelo + 26°C	5	BC
a <sub>1</sub> b <sub>0</sub>	Muestra de sedimentos + 4°C	4	CD
a <sub>0</sub> b <sub>0</sub>	Muestra de suelo + 4°C	3	D
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	Muestra de sedimentos + 26°C	3	D

**Tabla B10.** Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco de la interacción AxC.

<b>Tratamientos Interacción AxC</b>	<b>Descripción</b>	<b>Diversidad</b>	<b>Rango</b>
a <sub>2</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de arena + AN	8	A
a <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de arena + WA	5	AB
a <sub>0</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de suelo + AN	5	BC
a <sub>1</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de sedimentos + AN	4	C
a <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de suelo + WA	3	C
a <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de sedimentos + WA	3	C

**Tabla B11.** Separación de medias para la diversidad de la interacción BxC.

<b>Tratamientos Interacción BxC</b>	<b>Descripción</b>	<b>Diversidad</b>	<b>Rango</b>
b <sub>0</sub> C <sub>0</sub>	4°C + AN	6	A
b <sub>1</sub> C <sub>0</sub>	26°C + AN	5	AB
b <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	26°C + WA	5	B
b <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	4°C + WA	3	C

**Tabla B12.** Análisis de varianzas para la interacción ABC.

<b>Tratamiento Interacción ABC</b>	<b>Descripción</b>	<b>Medias</b>
a <sub>2</sub> b <sub>0</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de arena+4°C+AN	9
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de arena+26°C+AN	8
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de arena+26°C+WA	7
a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de suelo+4°C+AN	5
a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de suelo+26°C+AN	5
a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de suelo+26°C+WA	5
a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de sedimentos+4°C+AN	5
a <sub>2</sub> b <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de arena+4°C+WA	4
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> C <sub>0</sub>	Muestra de sedimentos+26°C+AN	4
a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de sedimentos+4°C+WA	3
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de sedimentos +26°C+WA	3
a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	Muestra de suelo+4°C+WA	2





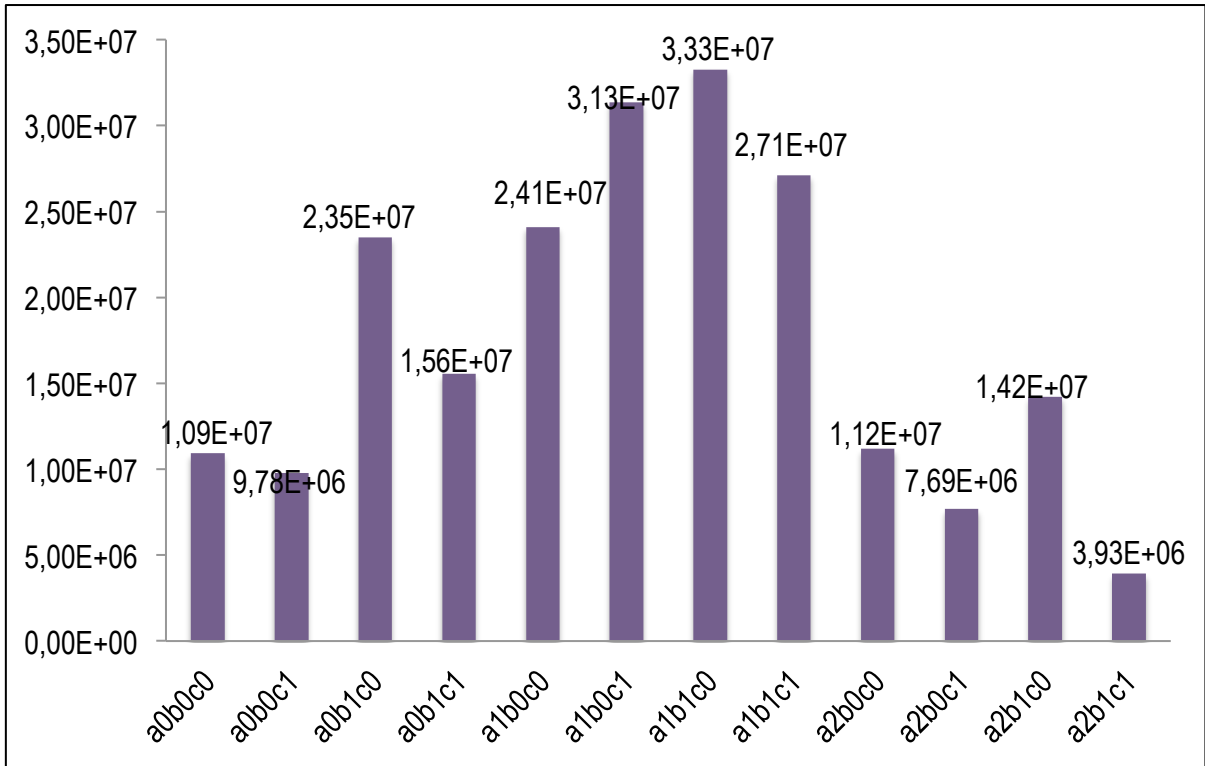
**Tabla B14.** Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de los actinomicetes aisladas en el presente estudio.

Código	Micelio Aéreo			Micelio de Sustrato					Forma de la cadena		Temperatura				pH					Salinidad		
	Blanco	Lavanda	Gris	Melocotón	Amarillo Piel	Plata	Gris lunar	Marfil	Recta	Incompleta	4 °C	26 °C	37 °C	50 °C	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	1%	5%	10%
DG-106	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
DG-122	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
DG-131	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
DG-180	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
DG-133	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
DG-139	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
DG-148	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
DG-142	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
DG-144	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0
DG-149	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0
DG-161	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1

# **ANEXO C**

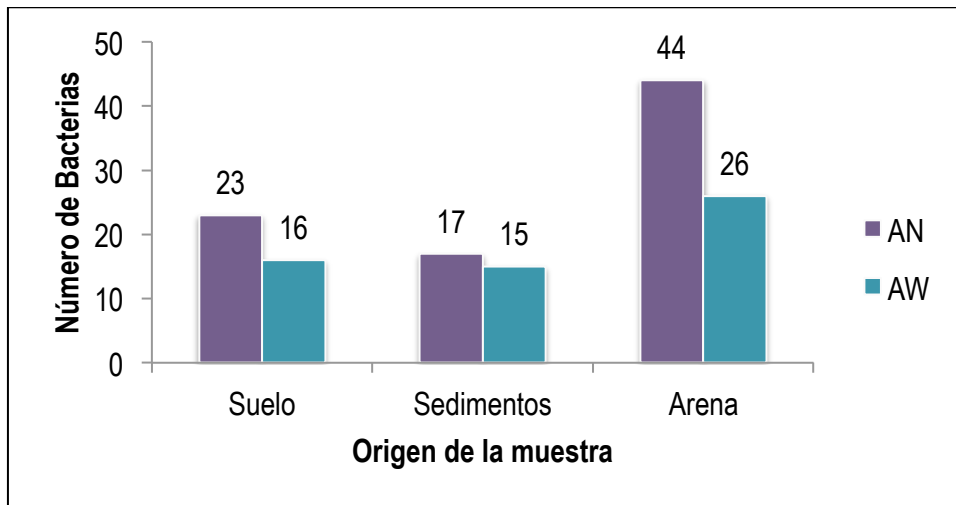
## **GRÁFICOS**

**Figura C1.** Número de ufc/g de suelo seco para los tratamientos en estudio.

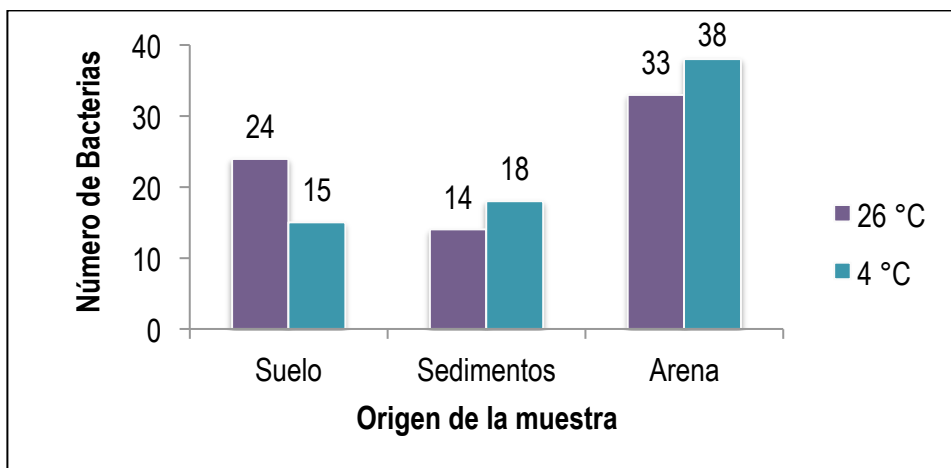


Tratamiento	Descripción
a0b0c0	Suelo, 4°C, AN
a0b0c1	Suelo, 4°C, WA
a0b1c0	Suelo, 26°C, AN
a0b1c1	Suelo, 26°C, WA
a1b0c0	Sedimentos, 4°C, AN
a1b0c1	Sedimentos, 4°C, WA
a1b1c0	Sedimentos, 26°C, AN
a1b1c1	Sedimentos, 26°C, WA
a2b0c0	Arena, 4°C, AN
a2b0c1	Arena, 4°C, WA
a2b1c0	Arena, 26°C, AN
a2b1c1	Arena, 26°C, WA

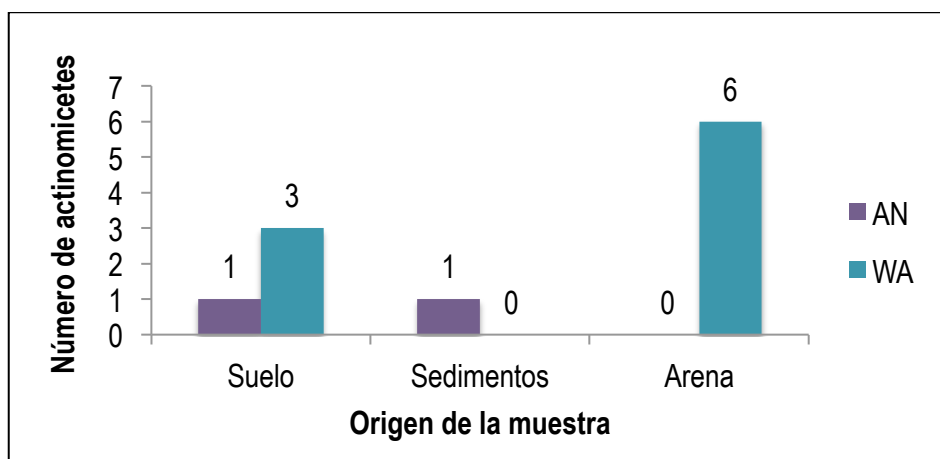
**Figura C2.** Número de bacterias aisladas en cada medio de cultivo, según el origen de la muestra utilizada.



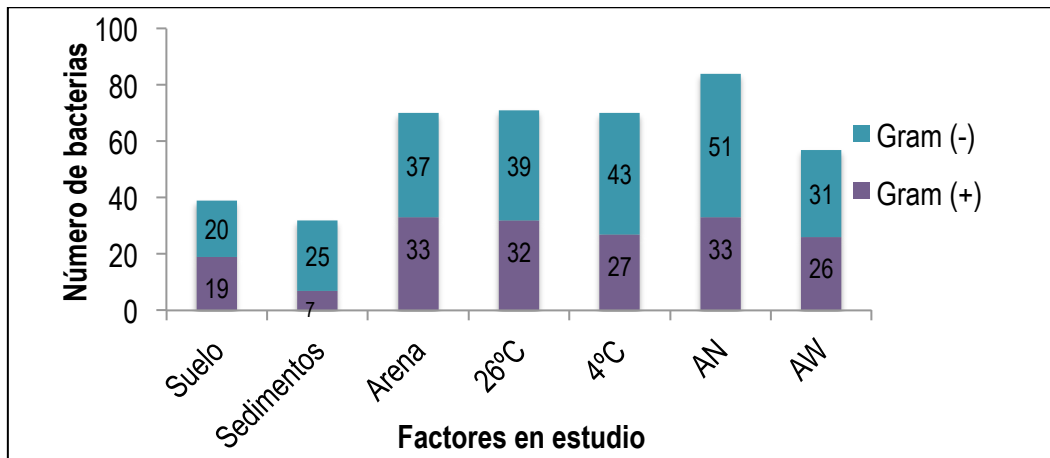
**Figura C3.** Número de bacterias aisladas en cada temperatura de incubación, según el origen de la muestra.



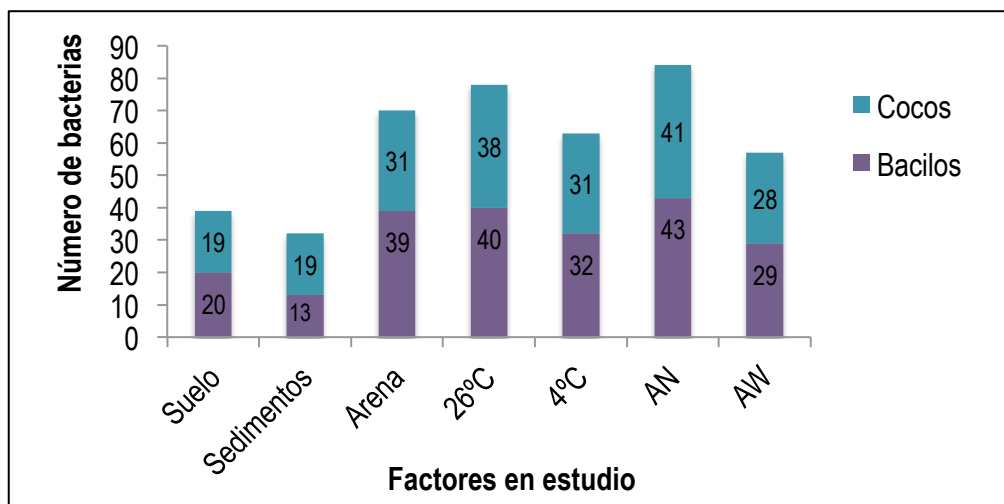
**Figura C4.** Número de actinomicetes aislados en cada medio de cultivo, según el origen de la muestra a 26°C.



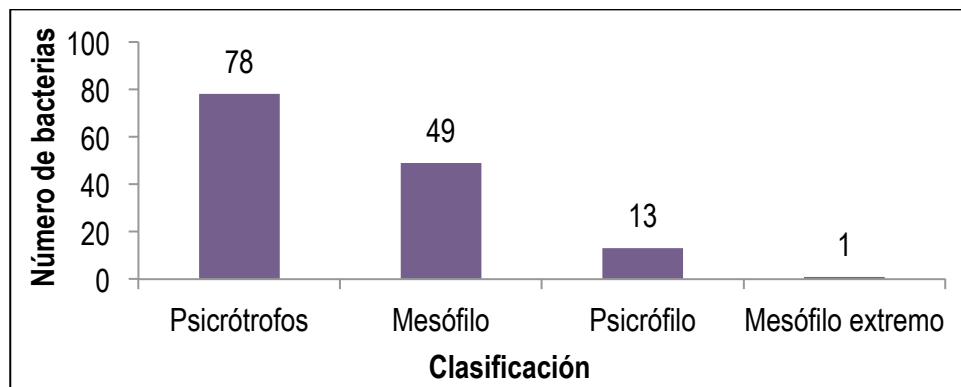
**Figura C5.** Distribución de las bacterias Gram (+) y Gram (-) aisladas de acuerdo a los factores en estudio.



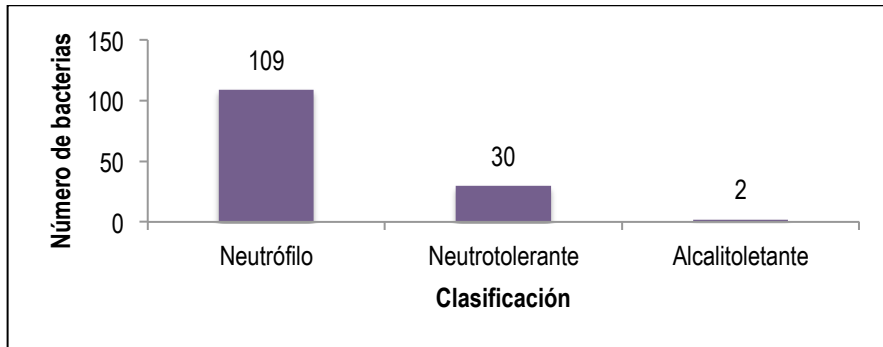
**Figura C6.** Distribución de las bacterias con forma cocoide y bacilar aisladas de acuerdo a los factores en estudio.



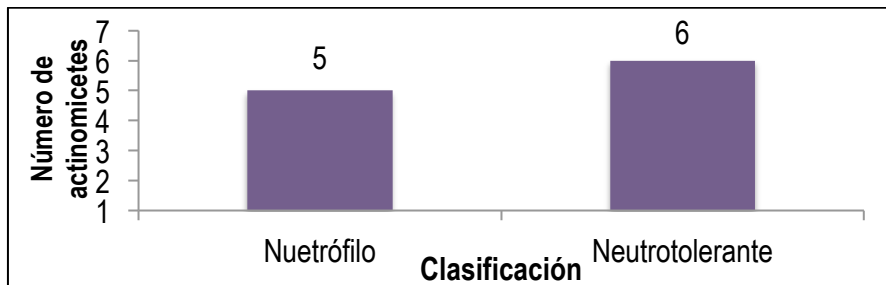
**Figura C7.** Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.



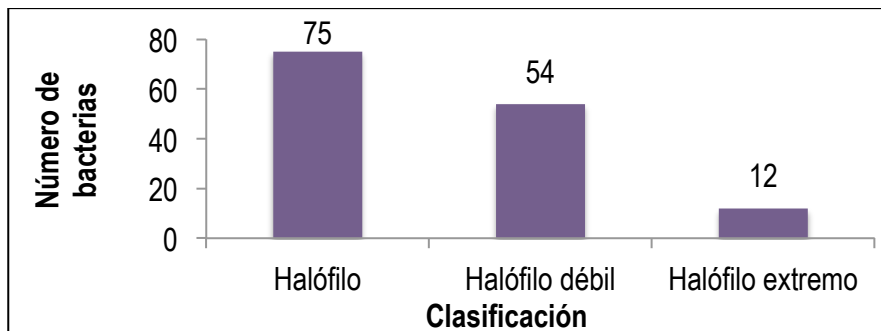
**Figura C8.** Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.



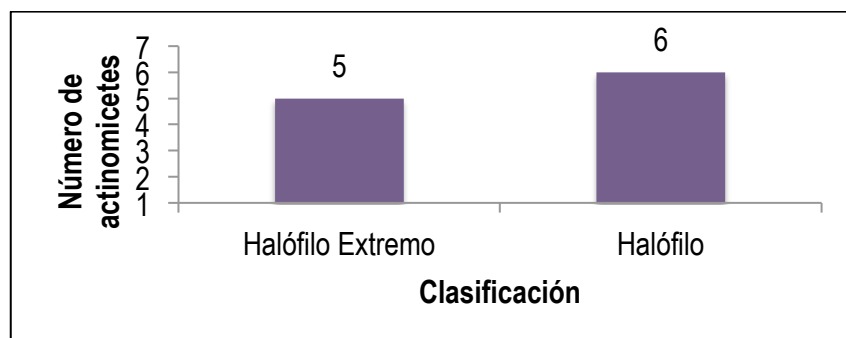
**Figura C9.** Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.



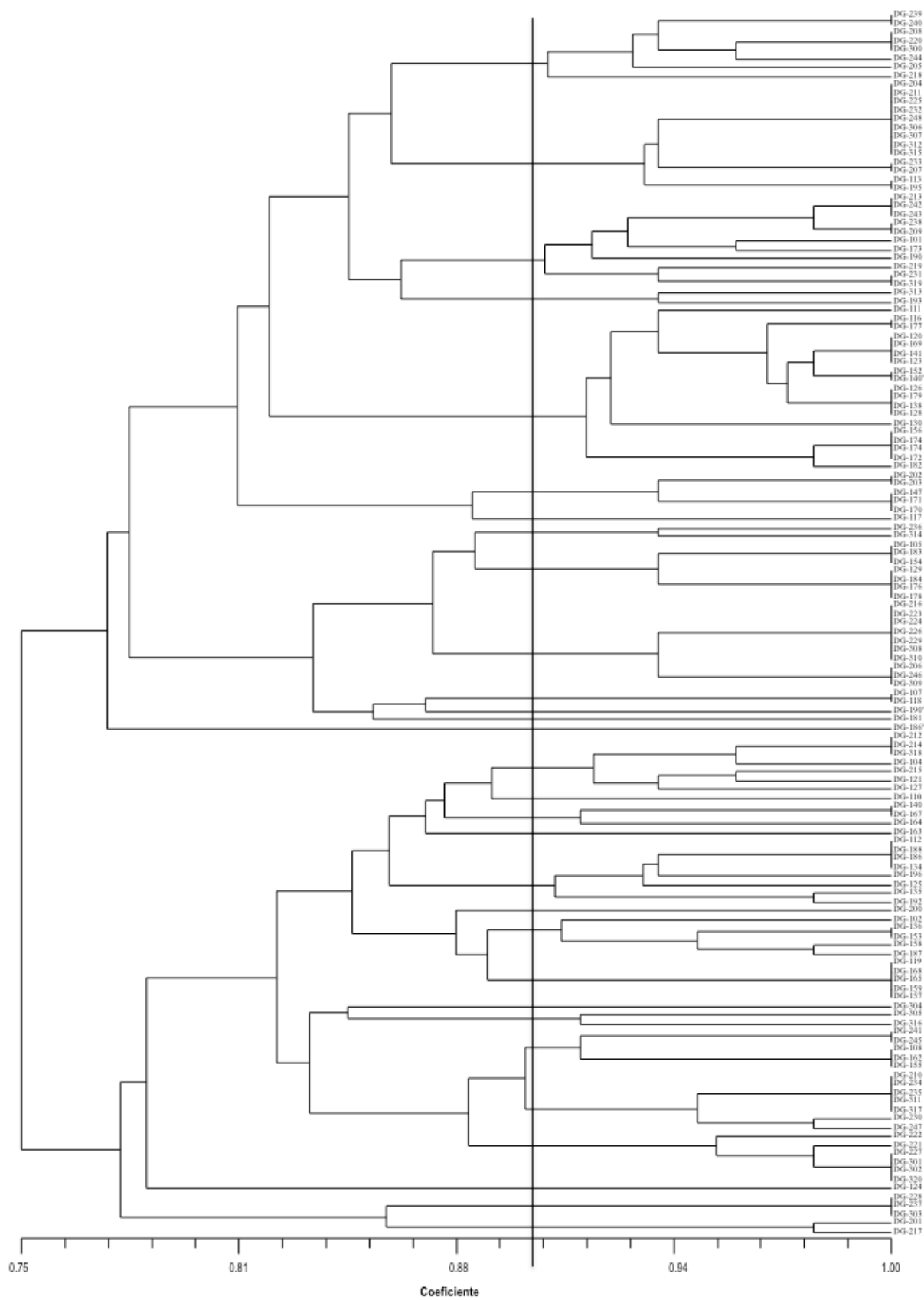
**Figura C10.** Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.



**Figura C11.** Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

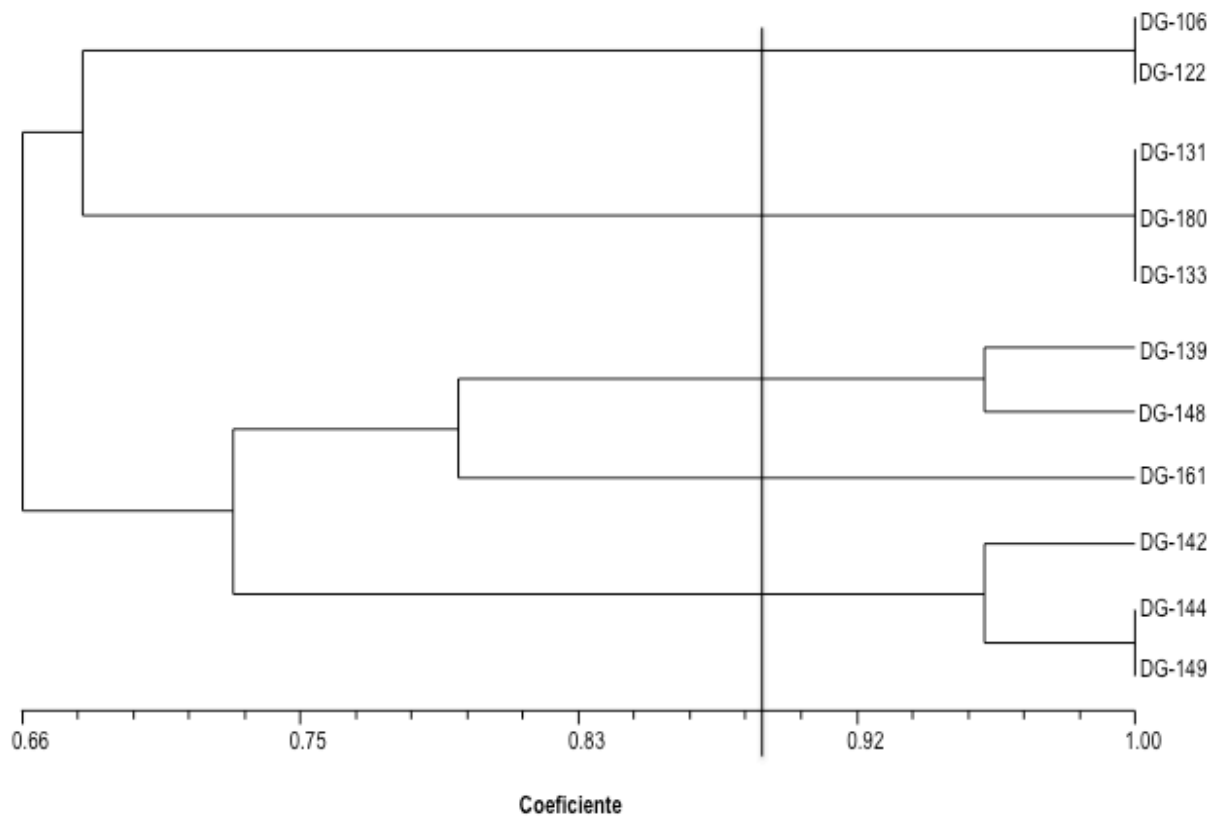


**Figura C12.** Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de las bacterias aisladas en este estudio.





**Figura C13.** Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de los actinomicetes aislados en este estudio.



# **ANEXO D**

## **MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES**

## MEDIOS DE CULTIVO

### Agar Nutritivo

---

Agar Nutritivo	23.00 g
Agua destilada	1000 ml

---

### Agar Agua de Llave

---

Agar Agar	15.00 g
Agua de llave	1000 ml

---

## SOLUCIONES BÚFER

### Búfer de Fosfato di Básico de Sodio y Ácido Cítrico

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

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

Se prepara un volumen final de 100 ml:

---

pH	0.1 M Ácido Cítrico (ml)	0.2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)
4.5	54.57	45.43
5.5	43.13	56.87
6.5	29.04	70.96
7.5	7.62	92.38

---

### Búfer de Hidróxido de Sodio y Ácido Bórico

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

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

Se prepara un volumen final de 100 ml:

---

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

---

# **ANEXO E**

## **TABLA DE COLORES**

Tabla de colores utilizada en 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"/> Acqua 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 Carmín	 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"/> Fucsia	 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**

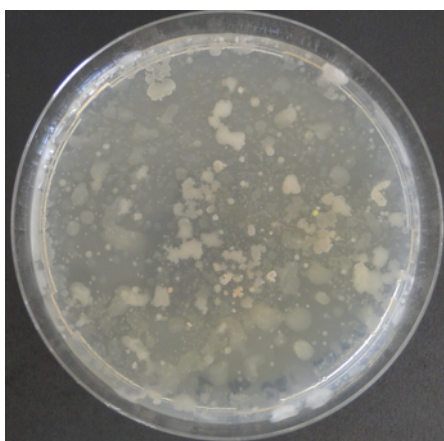
 209 <input type="checkbox"/> Cristal	 202 <input type="checkbox"/> Plata	 212 <input type="checkbox"/> Amarillo	 201 <input type="checkbox"/> Oro
 203 <input type="checkbox"/> Cobre	 205 <input type="checkbox"/> Rojo	 214 <input type="checkbox"/> Rose	 207 <input type="checkbox"/> Violeta
 211 <input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

**ACRILEX®**

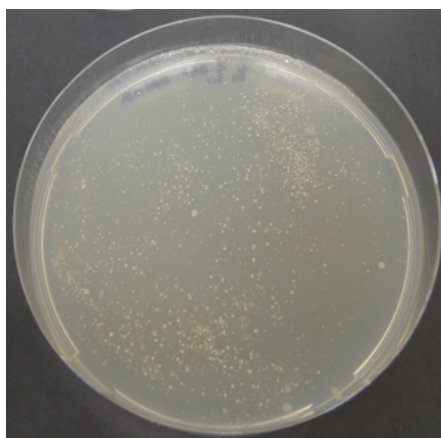
# **ANEXO F**

## **FOTOGRAFÍAS**

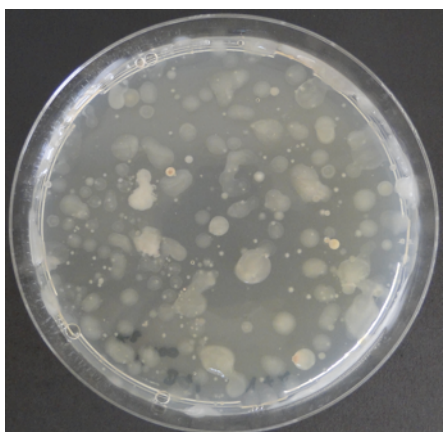
**Aislamiento selectivo de la muestra de suelo en AN.**



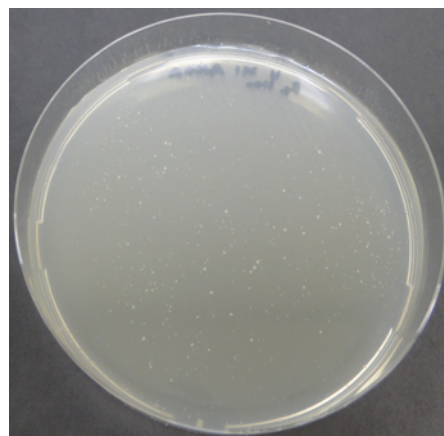
Dilución 1/10 Repetición 2, 26°C



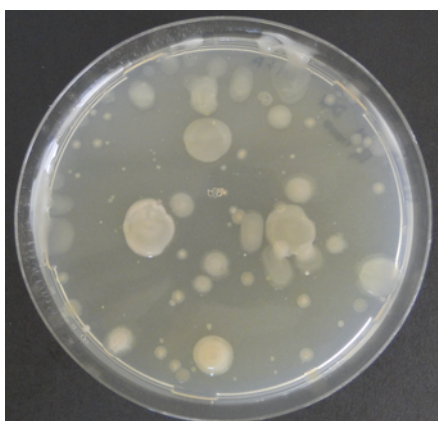
Dilución 1/10 Repetición 1, 4°C



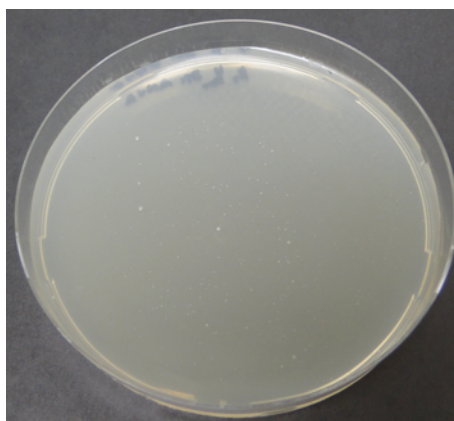
Dilución 1/100 Repetición 2, 26°C



Dilución 1/100 Repetición 2, 4°C



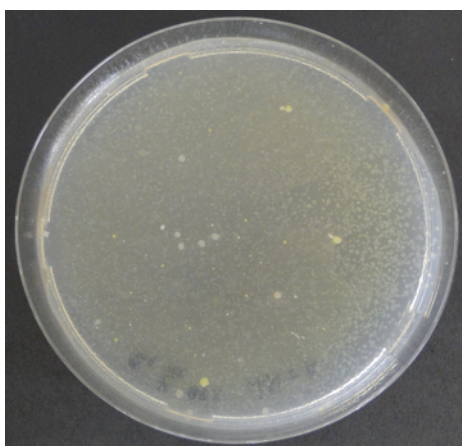
Dilución 1/1000 Repetición 1, 26°C



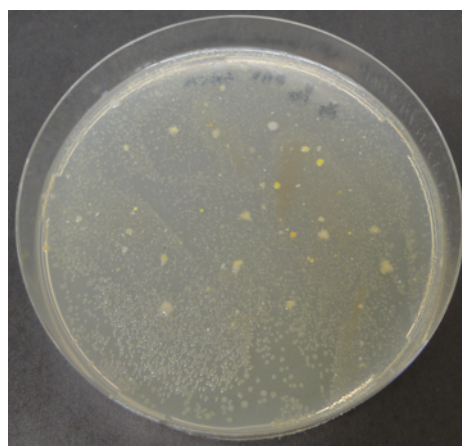
Dilución 1/1000 Repetición 1, 4°C



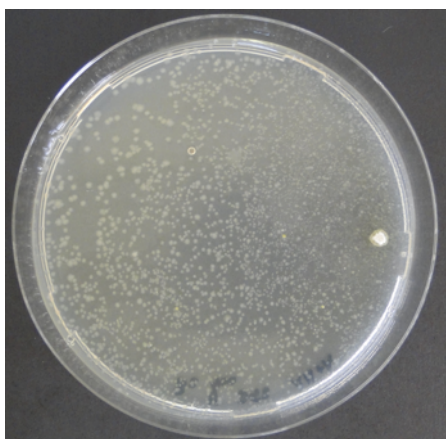
**Aislamiento selectivo de la muestra de sedimentos de lago en AN.**



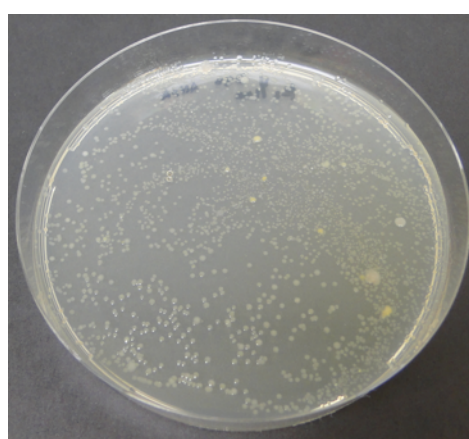
Dilución 1/10 Repetición 1, 26°C



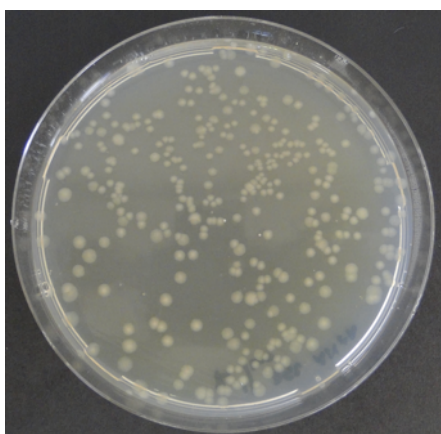
Dilución 1/10 Repetición 2, 4°C



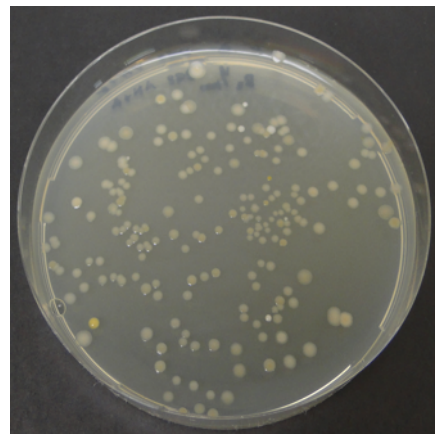
Dilución 1/100 Repetición 2, 26°C



Dilución 1/100 Repetición 2, 4°C



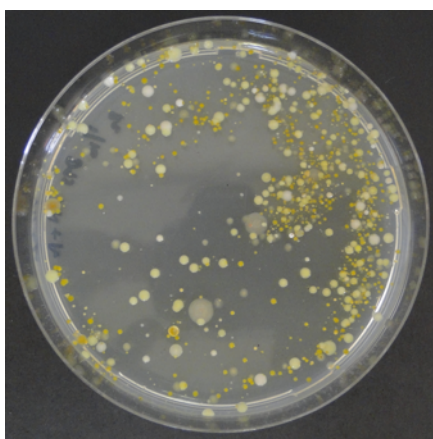
Dilución 1/1000 Repetición 1, 26°C



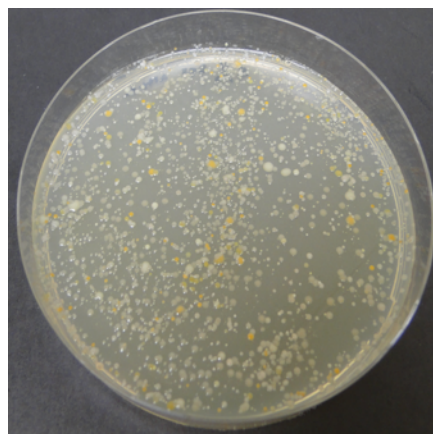
Dilución 1/1000 Repetición 2, 4°C



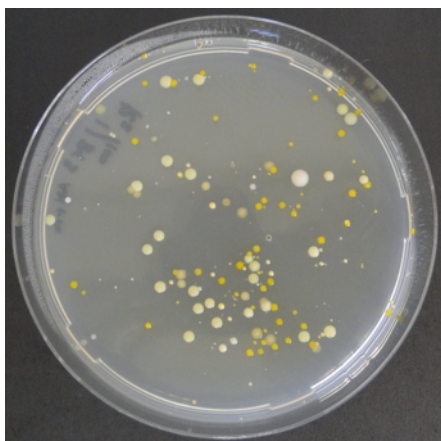
**Aislamiento selectivo de la muestra de arena de playa en AN.**



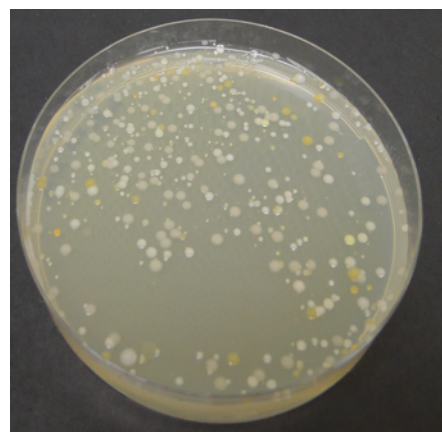
Dilución 1/10 Repetición 2, 26°C



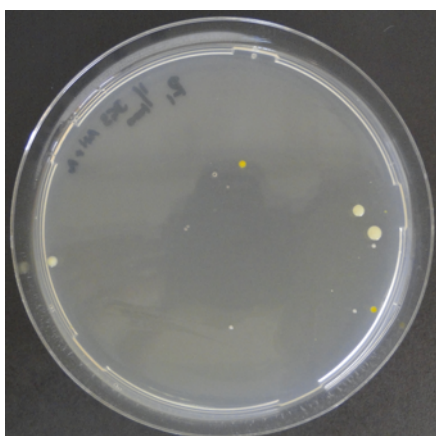
Dilución 1/10 Repetición 1, 4°C



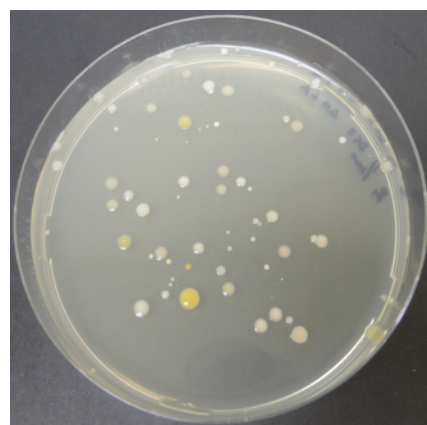
Dilución 1/100 Repetición 2, 26°C



Dilución 1/100 Repetición 2, 4°C



Dilución 1/1000 Repetición 1, 26°C



Dilución 1/1000 Repetición 1, 4°C

