



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

“Determinación del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas”

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

AUTORA: Diana Carolina Andrade Proaño

TUTOR: Dr. Carlos Rodríguez M.; PhD.

Ambato – Ecuador

2013

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del trabajo de Investigación: “DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE ESPORAS Y MICELIO DE ACTINOMICETES AISLADOS DE LA RIZÓSFERA DE LEGUMINOSAS”, realizado por la Egda. Diana Carolina Andrade Proaño, 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, Julio del 2013

Dr. Carlos Rodríguez M.; Ph.D

TUTOR DE TESIS

AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE ESPORAS Y MICELIO DE ACTINOMICETES AISLADOS DE LA RIZÓSFERA DE LEGUMINOSAS”, 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, Julio del 2013

Diana Carolina Andrade Proaño

180401134-2

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, Julio del 2013

Para constancia firman:

Presidenta del Tribunal

Miembro del Tribunal

Miembro del Tribunal

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas, él que me ha dado fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado; por ello, con toda la humildad que mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo a Dios.

A mi familia quienes por ellos soy quien soy.

A mi Madre Doris, por haberme dado la vida, por ser la persona que siempre ha estado a mi lado; por ser mi fuerza, mi apoyo, mi consejera, mi amiga y mi todo en la vida. Gracias por hacer hasta lo imposible para verme feliz y apoyarme con los recursos necesarios para culminar mis estudios, pero sobre todo Gracias por tu amor, paciencia y comprensión.

A mi Abuelita Piedad, por ser mi esperanza, mi compañera y amiga; por estar junto a mí en los momentos más difíciles y con sus palabras de alientos ayudarme a levantar.

Las dos personas más importante en mi vida me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos. No me va a alcanzar la vida para agradecerles todo lo que me han brindado.

A mi Abuelito Armando y a mi amiga Gaby, quienes ya partieron a la presencia del Creador, Gracias por ser la luz que siempre me acompaña, me guían y me bendicen en cada uno de los días de mi vida.

A mis tíos Oswaldo, Luis, Marcelo y Xavier, quienes han sabido ser como unos padres para mí, Gracias por su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

A mi amor, Emilio, Gracias por cada una de las palabras de aliento y por cada uno de los momentos maravillosos que hemos compartido. Mi felicidad se simplifica en una sola palabra "TÚ".

AGRADECIMIENTO

Dejo constancia de mi agradecimiento a:

A la Universidad Técnica de Ambato y en especial a mi querida Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Al Dr. Carlos Rodríguez, quién me brindó la gran oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por los conocimientos impartidos a lo largo de los nueve semestres de la carrera y por ser la guía para la culminación de este arduo trabajo.

Gracias por todas las experiencias vividas durante el transcurso de toda mi vida universitaria.

A los profesores que colaboraron como calificadoros del trabajo final: Ing. Dolores Robalino e Ing. Diego Salazar, porque con la mejor de las predisposiciones me han sabido guiar en la finalización de la tesis, mi eterna gratitud para con Uds.

A cada uno de mis queridos profesores, Gracias por impartir sus sabios conocimientos y enseñanzas, pero principalmente Gracias por su amistad brindada con toda sinceridad.

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

A mis amigos: Verito, Ely, Giova, Jess, Paúl y Mario. Gracias por cada una de las experiencias vividas, las locuras, los buenos y malos momentos compartidos y por enseñarme a que un amigo es para toda la vida. Es bueno saber que existen personas sinceras y de buen corazón.

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	xv
Índice de anexos	xvi
Resumen	xx

B. TEXTO

CAPÍTULO 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	3
1.2.2	Análisis crítico	4
1.2.2.1	Diagrama causa – efecto	4
1.2.3	Prognosis	4
1.2.4	Formulación del problema	5
1.2.5	Interrogantes	5
1.2.6	Delimitación	5
1.3	Justificación	6
1.4	Objetivos	7
1.4.1	General	7
1.4.2	Específicos	7

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1	Antecedentes investigativos	8
2.1.1	Los microorganismos y sus ambientes naturales	8
2.1.2	Consideraciones generales de los Actinomicetes	9
2.1.3	Condiciones de crecimiento	10
2.1.4	Clasificación de la clase Actinobacteria	12
2.1.5	Conservación de cultivos microbianos	12
2.1.5.1	Métodos de conservación a largo plazo	14

2.1.5.1.1	Método de conservación por liofilización	14
2.1.5.1.2	Método de conservación por congelación	15
2.1.5.2	Métodos alternativos de conservación	17
2.1.5.2.1	Método de conservación por transferencia periódica o subcultivo	17
2.1.5.2.2	Método de conservación por refrigeración	18
2.1.5.2.3	Método de conservación por suspensión en agua destilada	19
2.1.5.3	Métodos restringidos de conservación	19
2.1.5.3.1	Método de conservación por desecación de papel filtro	19
2.1.5.3.2	Método de conservación por desecación	19
2.1.6	Taxonomía numérica	20
2.1.7	Coeficiente de concordancia simple	23
2.2	Fundamentación filosófica	25
2.3	Fundamentación legal	26
2.4	Categorías fundamentales	27
2.5	Hipótesis	27
2.5.1	Hipótesis nula	27
2.5.2	Hipótesis alternativa	27
2.6	Señalamiento de variables de la hipótesis	27

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1	Enfoque	29
3.2	Modalidad básica de la investigación	29
3.3	Tipos o nivel de investigación	29
3.4	Población y muestra	29
3.5	Operacionalización de las variables	29
3.5.1	Variable independiente	30
3.5.2	Variable dependiente	31
3.6	Recolección de la información	32
3.6.1	Crecimiento y determinación de pureza de Actinomicetes	32
3.6.2	Determinación de la diversidad de Actinomicetes	32
3.6.2.1	Caracterización macroscópica	32
3.6.2.2	Caracterización microscópica	33
3.6.3	Pruebas fenotípicas	34
3.6.3.1	Rango de crecimiento en función del pH	34
3.6.3.2	Rango de crecimiento en función de la temperatura	35
3.6.3.3	Rango de crecimiento en función del porcentaje de salinidad	35
3.6.3.4	Solubilización de carbonato de calcio en pruebas de temperatura	36

3.7	Procesamiento y análisis de datos	37
3.7.1	Determinación de la eficiencia de almacenamiento de cultivos puros de Actinomicetes	37
3.7.2	Taxonomía numérica de datos fenotípicos	38

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1	Análisis de los resultados	43
4.1.1	Crecimiento y determinación de la pureza en Actinomicetes	43
4.1.2	Determinación de la diversidad de Actinomicetes.	44
4.1.3	Pruebas fenotípicas	45
4.1.3.1	Rango de crecimiento en función del pH	45
4.1.3.2	Rango de crecimiento en función de la temperatura	46
4.1.3.3	Rango de crecimiento en función del porcentaje de salinidad	46
4.1.3.4	Solubilización de carbonato de calcio en los experimentos de temperatura	46
4.1.4	Taxonomía de datos fenotípicos	47
4.2	Interpretación de datos	47
4.2.1	Pureza y viabilidad de cepas de actinomicetes recuperadas	47

4.2.2	Caracterización fenotípica	49
4.2.2.1	Rango de crecimiento en función del pH	49
4.2.2.2	Rango de crecimiento en función de la temperatura	49
4.2.2.3	Rango de crecimiento en función del porcentaje de salinidad	49
4.2.2.4	Solubilización de carbonato de calcio en los experimentos de temperatura	50
4.2.3	Taxonomía numérica de datos fenotípicos	50
4.2.4	Discusión general del trabajo	51
4.3	Verificación de hipótesis	54
4.3.1	Hipótesis nula	54
4.3.2	Hipótesis alternativa	54

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones	56
5.2	Recomendaciones	57

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1	Datos informativos	58
-----	--------------------	----

6.1.1	Título	58
6.1.2	Institución ejecutora	58
6.1.3	Beneficiarios	58
6.1.4	Ubicación	58
6.1.5	Tiempo estimado para la ejecución	58
6.1.6	Equipo técnico responsable	58
6.2	Antecedentes de la propuesta	59
6.3	Justificación	59
6.4	Objetivos	60
6.4.1	General	60
6.4.2	Específicos	60
6.5	Análisis de factibilidad	60
6.6	Fundamentación	61
6.7	Metodología – modelo operativo	61
6.7.1	Crecimiento y determinación de pureza en actinomicetes	61
6.7.2	Determinación de la diversidad de Actinomicetes	62
6.7.2.1	Caracterización macroscópica	62
6.7.2.2	Caracterización microscópica	62
6.7.3	Pruebas fenotípicas	62
6.7.3.1	Rango de crecimiento en función del pH	62
6.7.3.2	Rango de crecimiento en función de la temperatura	62

6.7.3.3	Rango de crecimiento en función del porcentaje de salinidad	63
6.8	Administración	63
6.9	Previsión de la evaluación	64

C. MATERIAL DE REFERENCIA

	Bibliografía	65
	Anexos	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de producción de antibióticos por diferentes Microorganismos.	10
Tabla 2. Clasificación de la clase Actinobacteria.	13
Tabla 3. Características utilizadas para los análisis de taxonomía numérica.	21
Tabla 4. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas.	33
Tabla 5. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función del pH.	34
Tabla 6. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.	35
Tabla 7. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la concentración de cloruro de sodio (NaCl) en el medio de cultivo.	36
Tabla 8. Número de cepas recibidas para cada tipo de leguminosa.	37
Tabla 9. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes.	39

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. DATOS EXPERIMENTALES

Tabla A1. Tipos de leguminosa.

Tabla A2. Número de cepas recibidas para cada tipo de leguminosa.

Tabla A3. Número de cultivos crecidos, no crecidos y contaminados para cada tipo de leguminosa.

Tabla A4. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados por tipo de leguminosa.

Tabla A5. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados

Tabla A6. Porcentaje de cultivos almacenados y de pérdida para cada tipo de leguminosas.

Tabla A7. Cálculo de los porcentajes globales de actinomicetes.

Tabla A8. Caracterización Macroscópica: Grupos de color. Caracterización Microscópica: Forma de la cadena de esporas, de los cultivos de actinomicetes recuperados aislados de la rizósfera de leguminosas.

Tabla A9. Distribución de cultivos de actinomicetes para cada grupo de color por tipo de leguminosa.

Tabla A10. Distribución de grupos de color de cultivos de actinomicetes por tipo de leguminosas.

Tabla A11. Caracterización Microscópica: Forma de la cadena de esporas de acuerdo al tipo de leguminosa.

Tabla A12. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH.

Tabla A13. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo y del tipo de leguminosa.

Tabla A14. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.

Tabla A15. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura y al tipo de leguminosa.

Tabla A16. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl.

Tabla A17. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo y tipos de leguminosas.

Tabla A18. Determinación de la solubilización de carbonato de calcio (CaCO_3) en cultivos de actinomicetes mediante pruebas fisiológicas de temperatura.

Tabla A19. Determinación de la solubilización de carbonato de calcio (CaCO_3) en cultivos de actinomicetes mediante pruebas fisiológicas de temperatura por tipo de leguminosa.

Tabla A20. Determinación del número de cultivos de actinomicetes solubilizadores y no solubilizadores de carbonato de calcio (CaCO_3).

Tabla A21. Caracterización fisicoquímica de los suelos de la rizósfera de las leguminosas.

Tabla A22. Número de miembros y grupos – especie basados en el 90% de similaridad a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes purificados.

ANEXO B. MATRÍZ DE CÓDIGO BINARIO

Tabla B1. Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de las cepas de actinomicetes purificadas en el presente estudio.

ANEXO C. FIGURAS

Figura C1. Número de cepas recibidas para cada tipo de leguminosa.

Figura C2. Número de cultivos crecidos, no crecidos y contaminados para cada tipo de leguminosa.

Figura C3. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados por tipo de leguminosa.

Figura C4. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados.

Figura C5. Porcentaje de cultivos almacenados y de pérdida para cada tipo de leguminosa.

Figura C6. Porcentajes globales de actinomicetes.

Figura C7. Distribución de grupos de color de cultivos de actinomicetes por tipo de leguminosas.

Figura C8. Caracterización microscópica: Forma de la cadena de esporas de acuerdo al tipo de leguminosa.

Figura C9. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo y del tipo de leguminosa.

Figura C10. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura y al tipo de leguminosa.

Figura C11. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo y tipos de leguminosas.

Figura C12. Determinación de la solubilización de carbonato de calcio (CaCO_3) en cultivos de actinomicetes mediante pruebas fisiológicas de temperatura por tipo de leguminosa.

Figura C13. Determinación del número de cultivos de actinomicetes solubilizadores y no solubilizadores de carbonato de calcio (CaCO_3).

Figura C14. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de las cepas de actinomicetes purificadas en este estudio.

ANEXO D. MEDIO DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Medios de cultivo.

Soluciones búfer.

ANEXO E. TABLA DE COLORES

ANEXO F. FOTOGRAFÍAS

RESUMEN

Durante la determinación del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas, se logró purificar, conservar y almacenar en cultivo puro, ochenta y seis cepas de actinomicetes, teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación y pérdida de las mismas. De las doscientas setenta y siete cepas aisladas originalmente del proyecto “Búsqueda de Actinomicetes Productores de Antibióticos” en el año 2009, las cuales se entregaron conservadas en glicerol al 20% (w/v) y almacenadas en refrigeración entre 1°C y 3°C, únicamente se lograron purificar ochenta y seis cepas, 21 se purificaron a partir de la rizósfera de fréjol, 20 de alfalfa, 19 de haba, 18 de arveja y 8 de chocho. La purificación de cepas no fue como se esperaba, ya que se reportó únicamente un 31.0% de cepas purificadas, mientras que un 69.0% de cepas perdidas entre no crecidas y contaminadas que dan un total de 191 cepas. La taxonomía numérica de datos fenotípicos permitió obtener un número menor de grupos especie, que los obtenidos solo en base a la coloración de micelio aéreo, micelio del sustrato y pigmento difusible, mostrando que la adición de características fenotípicas permite delimitar con mayor precisión a los grupos-especie. El dendrograma obtenido al 90% de coeficiente de similaridad dividió a las 86 cepas de actinomicetes purificadas en 36 grupos-especie. Los datos obtenidos en la investigación demuestran que las condiciones de almacenamiento deficientes, influyen sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes. Cabe recalcar que las técnicas de aislamiento y conservación inicial son la clave fundamental para poder establecer colecciones de cultivos por largos períodos de tiempos, los mismos que pueden ser utilizados en investigaciones futuras, permitiendo el descubrimiento de posibles nuevos compuestos bioactivos útiles en Biotecnología.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Tema de Investigación

Determinación del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas.

1.2 Planteamiento del Problema

1.2.1 Contextualización

1.2.1.1 Macro

Los actinomicetes representan un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en ecosistemas naturales. Constituyen un grupo de microorganismos procariotes completamente único, debido a la formación de esporas. Es el grupo microbiano más prolífico en cuanto a la producción de antibióticos. Presenta una diversidad considerable desde formas bacilares hasta formas filamentosas ramificadas a modo de esporulación compleja. En muchos casos, los actinomicetes constituyen gran parte de la población del suelo, especialmente bajo condiciones alcalinas y secas (Leveau & Bouix, 2000).

Morfológicamente son considerados como un grupo heterogéneo de microorganismos, son bacterias Gram-positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados conocidos con el nombre de hifas. El orden Actinomycetales comprende 63 géneros constituyendo

aproximadamente entre el 20 al 60% de la población microbiana del suelo (Franco, 2008).

La preservación de cepas microbianas no es tarea fácil ya que se debe preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas, los niveles de su productividad inicial y lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad. Este último puede ser un factor esencial en la selección de un método de preservación. El éxito en la preservación de los cultivos microbianos es esencial para las actividades de investigación o industriales basadas en la actuación de estos microorganismos. Las cepas valiosas se tienen que conservar durante períodos de tiempo libres de cambios fenotípicos adversos (Zamora, 2003).

1.2.1.2 Meso

En la actualidad, los actinomicetes se encuentran incluidos en el dominio *Bacteria*, debido a varias razones que combinan tanto datos fenotípicos, genotípicos y filogenéticos. La pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas (0.5 μm) es inferior al de los hongos (10 μm), presentan resistencia a compuestos antifúngicos, y la disposición de su material genético es típicamente procariótica. Se caracterizan por presentar un alto contenido de guanina y citosina en su ADN, encontrándose entre el rango de 51 al 78% G+C (Franco, 2008).

Existen tres factores principales que influyen en la distribución y en la actividad de muchos actinomicetes en el suelo, el pH, la temperatura, y el tipo y composición. En el suelo, intervienen en los procesos de descomposición de la materia orgánica, en donde son responsables principalmente del proceso de humificación. Los tres géneros más frecuentemente encontrados son *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Nocardia*, que pueden estar presentes como esporas o como hifas vegetativas. Los métodos de aislamiento convencionales muestran que un 95% de los actinomicetes aislados a partir de suelos pertenecen al género *Streptomyces* (Cuesta, 2004).

Un cultivo de aplicación e interés industrial debe contener el máximo número de células viables, estar libre de contaminación y ser activo en las condiciones de procesamiento. Por esta razón el mantenimiento de cultivos es extremadamente importante. No existe un método universal para mantener los cultivos de microorganismos, sin embargo la selección del método tiene que basarse en la naturaleza del cultivo y en las ventajas e inconvenientes del método escogido. Si el microorganismo no se conoce del todo es aconsejable utilizar varios métodos de conservación (Zamora, 2003).

El método de conservación que se elija debe garantizar la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original como sea posible, conserve las propiedades de importancia de los cultivos y minimice la ocurrencia de los eventos genéticos. De igual manera debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable (Weng *et al.*, 2005).

1.2.1.3 Micro

En general, existen 3 categorías en las que se agrupan los métodos de preservación según el tiempo en que permanecen viables las células conservadas, que son los métodos de conservación a largo, mediano y corto plazos (Weng *et al.*, 2005). Clasifican en la primera de estas categorías la congelación (a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) y la liofilización como técnicas que minimizan al máximo el riesgo de cambio genético en las células y las mantienen viables por 10 años o más, ventajas que han condicionado su extensa utilización para conservar disímiles materiales biológicos y que sean reconocidas como técnicas de elección. El elevado costo de los equipos que emplean estos métodos dificulta su implementación en muchos laboratorios (Weng *et al.*, 2005).

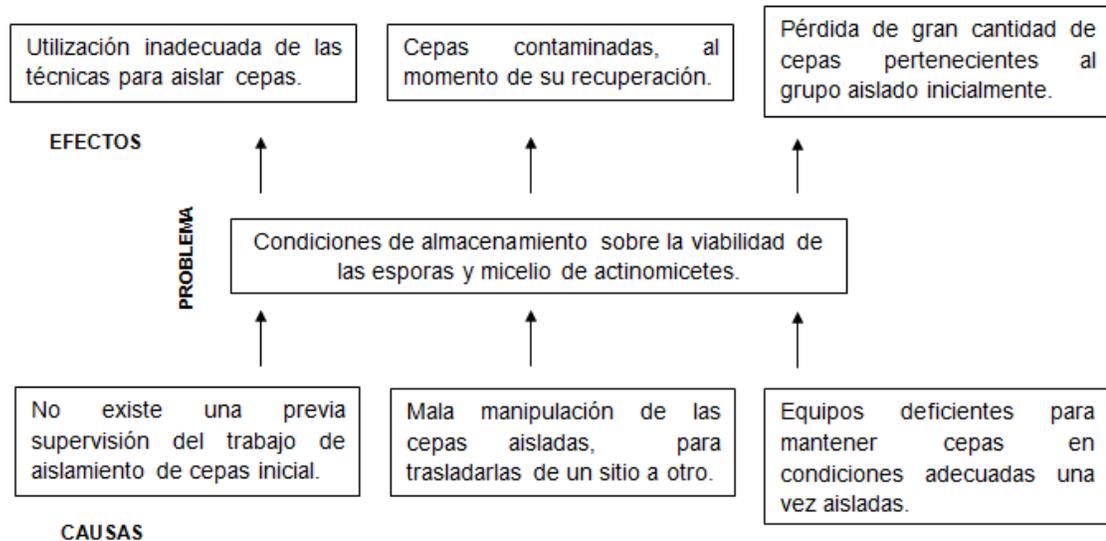
A mediano plazo, es el término que agrupa las técnicas con las que se logran mantenerla viabilidad de los cultivos entre 2 y 5 años. Se destacan en este

grupo la desecación en diferentes soportes (arena, sílica gel, perlas de vidrio) donde la paralización del crecimiento se produce por eliminación del agua disponible, así como el almacenamiento en tierra, parafina líquida y la suspensión en agua destilada estéril (Weng *et al.*, 2005).

Por último, es frecuente encontrar que una técnica de preservación resulte más efectiva para un grupo microbiano que para otro, lo que indica que además de considerar los aspectos anteriores es necesario revisar la literatura disponible sobre los microorganismos en cuestión y las alternativas de mantenimiento utilizadas, y adecuarlas a la situación real de la organización. Podemos entonces resaltar que no existe una técnica universal para conservar adecuadamente todos los microorganismos (Weng *et al.*, 2005).

1.2.2 Análisis Crítico

1.2.2.1 Diagrama Causa – Efecto



1.2.3 Prognosis

Si no se llega a culminar el trabajo de investigación se desconocería el efecto de las condiciones de almacenamiento como mecanismo para conservar cepas

de actinomicetes por varios años, y su influencia sobre la viabilidad de las esporas y micelio de actinomicetes.

1.2.4 Formulación del problema

¿Es factible determinar el efecto de las condiciones de almacenamiento de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas sobre la viabilidad de las esporas y micelio?

1.2.5 Interrogantes

¿Cómo se realiza la determinación del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de las esporas y micelio de actinomicetes?

¿Cómo se determina el efecto generado sobre en la viabilidad y pureza de cultivos almacenados en condiciones de refrigeración?

¿Cómo se determina la similaridad entre la población de cepas purificadas mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos?

1.2.6 Delimitación

Campo: Investigación.

Área: Microbiología.

Sub área: Biotecnología.

Aspecto: Conservación de Germoplasma Microbiano.

Geografía: Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Carrera de Ingeniería Bioquímica, Universidad Técnica de Ambato (UTA).

Temporal: Marzo 2012 – Julio 2013

1.3 Justificación

Los microorganismos son las más numerosos y antiguas entidades que existen, logrando colonizar exitosamente cada nicho ecológico sobre el planeta, incluso en lugares en los que no ha sido posible localizar otras formas de vida, además su presencia y actividad son esenciales para la salud y el funcionamiento de los ecosistemas a través de todo el medio ambiente (Vinueza, 2010).

El uso de los microorganismos en el enfrentamiento y la solución de los grandes problemas actuales de la humanidad, como son los relacionados con la salud humana y animal, la agricultura y la alimentación, la obtención de formas no convencionales de energía, el saneamiento y conservación del medio ambiente, entre otros, ha alcanzado un incremento considerable en el mundo entero, principalmente en los países desarrollados (Fernández *et al.*, 2005). Su explotación y conservación con fines investigativos es el interés de todo centro investigativo, pues permite disponer de cepas confiables cuando estas sean solicitadas, por lo que resulta de mucha importancia el empleo de técnicas que permitan el mantenimiento y preservación de los microorganismos por largos períodos de tiempo (Pérez *et al.*, 2005).

Existen diferentes métodos para la preservación de los microorganismos y todos tienen ventajas y desventajas, por lo tanto el método escogido debe ser el que mejor se adecue a las necesidades de la colección, teniendo en cuenta la competencia técnica, los recursos financieros y las facilidades disponibles y recordando siempre que no existe un método universal para la preservación adecuada de todos los microorganismos (Pérez *et al.*, 2005). Para la correcta conservación de las cepas se deben cumplir tres objetivos fundamentales, en primer lugar que el cultivo a conservar esté puro, en segundo lugar que se logre una supervivencia de al menos el 70 - 80% de las células, o sea que sean viables y en tercero que sean genéticamente estables (Pérez *et al.*, 2005).

Estos métodos pueden ser agrupados en métodos de conservación a largo plazo, son los mejores, ya que garantizan al máximo la estabilidad genética, a él

pertenecen los métodos de congelación y de liofilización. Métodos alternativos de conservación, ellos incluyen la transferencia periódica, refrigeración y la conservación por suspensión en agua destilada estéril; y métodos restringidos de conservación, se utilizan para grupos de microorganismos muy específicos que no resisten los métodos mencionados anteriormente, a él pertenecen la desecación en papel filtro, cultivo en tierra (Pérez *et al.*, 2005).

La investigación permitió establecer los efectos de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas, dicho aislamiento inicial se realizó en el proyecto “Búsqueda de Actinomicetes Productores de Antibióticos” año 2009. La importancia de esta investigación se centró en determinar el número de cepas puras de actinomicetes que se lograron recuperar después de ser conservadas en refrigeración entre 1°C y 3°C por un largo período de tiempo.

1.4. Objetivos

1.4.1 General

- Establecer la viabilidad y pureza de los cultivos almacenados en condiciones de refrigeración y caracterizarlos fenotípicamente.

1.4.2 Específicos

- Determinar la pureza y viabilidad de actinomicetes almacenados en suspensiones de glicerol al 20% entre 1°C y 3°C.
- Caracterizar fenotípicamente los actinomicetes viables.
- Determinar la diversidad biológica de los actinomicetes.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

2.1.1 Los microorganismos y sus ambientes naturales

En la naturaleza, los microorganismos viven asociadas a otros en conjuntos llamados comunidades, las mismas que están compuestas por grupos de células relacionadas, que por lo general se derivan de una única célula por sucesivas divisiones celulares. Los microorganismos que se desarrollan en medio ambientes pueden hacerlo tanto en ambientes familiares como en lugares poco comunes, como aquellos tan extremos en donde la mayoría de organismos superiores no lo harían (Madigan, 2004). Se han encontrado especies de microorganismos que viven a temperaturas comprendidas entre el punto de congelación y el punto de ebullición del agua, en agua salada y en agua dulce, en presencia y en ausencia de oxígeno (Carrillo, 2003). En consecuencia se ha establecido que estos seres diminutos se hallan capacitados para realizar una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse a muchos ambientes diferentes (Madigan, 2004).

Dentro de esta gama tan grande de microbios, los actinomicetes se encuentran distribuidos en la gran mayoría de sustratos naturales como: suelo, agua dulce, aire, estiércol, fango de los ríos y fondo de los lagos. Son saprófitos y algunas especies pueden provocar enfermedades a las plantas, animales domésticos e incluso al hombre. Han sido frecuentemente descritos como microorganismos de crecimiento lento, que no compiten eficientemente con bacterias u hongos de rápido crecimiento por el carbono disponible en el suelo. Sin embargo, son

microorganismos importantes en la mineralización del carbono y el nitrógeno, y en la descomposición de materia orgánica presente en el suelo. La descomposición de la materia orgánica en el suelo es llevada a cabo por los actinomicetes gracias a la diversidad de enzimas que poseen. Por ejemplo al producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, celulasas, peroxidasas y otras, han sido descritos como agentes de biocontrol (Franco, 2008).

2.1.2 Consideraciones generales de los Actinomicetes.

Los actinomicetes constituyen un grupo de microorganismos formado por bacterias generalmente aerobias, Gram-positivas y con alto contenido de G+C en su ADN que es superior a 55% (Cuesta, 2004). Desarrollan células filamentosas, ramificadas, que fragmentan en elementos cocoides y bacilares. En su gran mayoría son mesófilos y su crecimiento se registra entre 25°C a 30°C. En temperaturas inferiores a 5°C el crecimiento es nulo y a temperaturas superiores a 55°C solo algunas especies termofílicas de *Streptomyces*, y *Thermomonospora*, son capaces de crecer. El efecto de la alta temperatura posiblemente sea letal para el microorganismo si está acompañado de humedad (Sivakumar, 2001).

Se distribuyen ampliamente en ecosistemas tanto terrestres como acuáticos (incluidos los marinos), sin embargo su reservorio natural es el suelo donde comprenden aproximadamente del 20 al 60% del total de la población microbiana (Leveau & Bouix, 2000), predominan en forma libre en suelos secos y cálidos en cantidades de millones por cada gramo de suelo, se caracterizan por tener la capacidad de sintetizar el 69% de los antibióticos descritos (Tabla 1) y se han descrito como posibles promotores de crecimiento vegetal (Franco, 2008).

2.1.3 Condiciones de crecimiento

La adición de materia orgánica a los suelos estimulan la multiplicación y actividad de los actinomicetes. Los suelos alcalinos y neutros resultan ser más favorables para el desarrollo de estas bacterias (Franco, 2008). Están sobre todo presentes en la capa comprendida entre la superficie del suelo y los 2 metros de profundidad, su número varía en grandes proporciones según los casos pero es corriente en las tierras fértiles contar 1×10^6 unidades formadoras de colonias por gramo de tierra seca (Leveau & Bouix, 2000).

Tabla 1. Porcentaje de producción de antibióticos por diferentes microorganismos.

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS	PORCENTAJE TOTAL DE LOS ANTIBIÓTICOS DESCRITOS
Líquenes y algas	0.8
Hongos:	
• <i>Penicillium</i>	4.1
• <i>Aspergillus</i>	3.0
• <i>Fusarium</i>	1.2
• <i>Cephalosporium</i>	0.8
• Otros fungi imperfecti	5.4
• Basidiomicetos y ascomicetos	5.0
Bacterias:	
• <i>Pseudomonadaceae</i>	1.3
• <i>Bacillaceae</i>	7.0
• Otras eubacterias	1.7
Actinomicetes	69.7

Fuente: Leveau & Bouix, 2000.

El número y la proporción de actinomicetes en la microflora terrestre dependen de numerosos factores, la naturaleza y la abundancia de materia orgánica, la introducción de abono conlleva un aumento del número de actinomicetes, la adición de cultivos de actinomicetes a suelos ricos en materia orgánica apresura la descomposición de los residuos vegetales (Leveau & Bouix, 2000). La profundidad, entre 2 y 15 cm es generalmente la profundidad óptima, la rizosfera es más rica en actinomicetes, su número disminuye con la profundidad (Leveau & Bouix, 2000). El rango de pH óptimo para las actividades de estos microorganismos se encuentra entre 6.5 y 8, en suelos con pH por debajo de 5 es frecuente observar su ausencia. La aireación y la humedad, la mayor parte de los actinomicetes son aerobios y prefieren tasas de humedad poco elevadas del orden del 10 al 30%, suelos con humedad del 80 al 90% son perjudiciales para su desarrollo (Cuesta, 2004).

En condiciones *in vitro*, en su gran mayoría crecen en medios como agar nutritivo, agar sangre o agar infusión cerebro – corazón. Sin embargo para la diferenciación y el desarrollo de esporas o pigmentos que necesitan de medios suplementados con quitina coloidal, extracto de suelo, avena, almidón con sales inorgánicas, agar agua con determinados polisacáridos como fuente carbono, extracto de levadura o peptona (Cuesta, 2004). Por otro lado, las colonias de *Streptomyces* crecen como colonias duras, brillantes y pálidas en agar nutritivo. En medio avena o sales inorgánicas con almidón pueden crecer como colonias amarillas brillantes con micelio aéreo pulverulento blanco (Franco, 2008).

El crecimiento de las colonias de actinomicetes en medio sólido se puede ver a los 3 o 4 días de incubación pero el desarrollo del micelio aéreo maduro con esporas puede tardar entre 7 y 14 días . En algunas cepas de crecimiento lento se requiere hasta más de un mes de incubación (De los Santos, 1998). A diferencia de las bacterias no filamentosas, las que provocan turbidez, los actinomicetes pueden crecer formando pellets o agrupaciones filamentosas en medios líquidos (Prescott, 2002).

2.1.4 Clasificación de la clase Actinobacteria

Basado en análisis filogenéticos de la secuencia de ADNr/ARNr 16S, se propone un sistema de clasificación jerárquica de la clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997). De esta manera utilizando este tipo de análisis se divide a la clase *Actinobacteria* en órdenes, subórdenes y familias como se muestra a continuación en la Tabla 2.

2.1.5 Conservación de cultivos microbianos

Una vez que el microorganismo ha sido aislado y crecido en un cultivo puro, es necesario mantenerlo libre de contaminación para conservar la viabilidad, la pureza y la estabilidad del mismo. Normalmente, en los laboratorios, los cultivos puros son transferidos periódicamente a un medio fresco (cultivo secundario) para permitir el crecimiento continuo y la viabilidad de los microorganismos. La transferencia está siempre sujeta a las condiciones de asepsia para evitar la contaminación (Zamora, 2003).

Mantener un gran número de cultivos puros durante un largo tiempo llega a ser una tarea difícil. Además, existe el riesgo de cambios genéticos, así como la contaminación. Por lo tanto, está siendo sustituida por algunos métodos modernos que no necesitan cultivo sub frecuente. Estos métodos incluyen la refrigeración, el método de parafina, la criopreservación y la liofilización (secado por congelación) (Zamora, 2003). El éxito en la preservación de los cultivos microbianos es esencial para las actividades de investigación o industriales basadas en la actuación de estos microorganismos. Las cepas valiosas se tienen que conservar durante largos períodos de tiempo libres de cambios fenotípicos adversos (Zamora, 2003). La elección del método de conservación utilizado debe permitir mantener las características del microorganismo por las cuales fue seleccionado (Stanbury *et al.*, 1995).

Tabla 2. Clasificación de la clase Actinobacteria.

SUBCLASE	ORDEN	SUBORDEN	FAMILIA
<i>Acidimicrobidae</i>	<i>Acidimicrobiales</i>		<i>Acidimicrobiaceae</i>
<i>Rubrobacteridae</i>	<i>Rubrobacterales</i>		<i>Rubrobacteraceae</i>
<i>Coriobacteridae</i>	<i>Coriobacterales</i>		<i>Coriobacteriaceae</i>
<i>Sphaerobacteridae</i>	<i>Sphaerobacterales</i>		<i>Sphaerobacteraceae</i>
<i>Actinobacteridae</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycineae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
		<i>Micrococccineae</i>	<i>Micrococcaceae</i>
			<i>Brevibacteriaceae</i>
			<i>Cellulomonadaceae</i>
			<i>Dermabacteraceae</i>
			<i>Dermatophilaceae</i>
			<i>Intrasporangiaceae</i>
			<i>Jonesiaceae</i>
			<i>Microbacteriaceae</i>
			<i>Promicromonosporaceae</i>
			<i>Corynebacteriaceae</i>
		<i>Corynebacterineae</i>	<i>Dietziaceae</i>
			<i>Gordoniaceae</i>
			<i>Mycobacteriaceae</i>
			<i>Nocardiaceae</i>
			<i>Tsukamurellaceae</i>
		<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>
		<i>Propionibacterineae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>
			<i>Nocardiodaceae</i>
		<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardaceae</i>
		<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>
			<i>Streptosporangiaceae</i>
			<i>Nocardiodaceae</i>
		<i>Streptosporangineae</i>	<i>Thermomonosporaceae</i>
			<i>Frankiaceae</i>
			<i>Frankineae</i>
		<i>Geodermatophilaceae</i>	
		<i>Microsphaeraceae</i>	
<i>Sporichthyaceae</i>			
<i>Glycomycineae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>		
<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>		

Fuente: Stackebrandt *et al.*, 1997.

2.1.5.1 Métodos de conservación a largo plazo

Son los mejores porque en ellos se detiene el crecimiento de las células microbianas, sin provocar la muerte, garantizando la estabilidad genética, al evitar la aparición de generaciones sucesivas (García, 2004). Los métodos de conservación pertenecientes a este grupo son dos: Liofilización y Congelación.

2.1.5.1.1 Método de conservación por liofilización

La liofilización consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío. Este proceso consta de tres etapas, la precongelación del producto para asegurar una estructura completamente congelada, el secado primario con el que se elimina la mayor parte del agua por sublimación y el secado secundario con el que se remueve el agua que queda ligada (Arencibia, 2003).

En las células conservadas por este método no hay crecimiento puesto que la actividad de agua es cero igual que en la congelación pero a diferencia de la primera, los liófilos no tienen agua en el medio debido a la sublimación. Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores. Sin embargo, este es un método muy recomendable por su comodidad en almacenamiento y envío de las cepas, pues una vez conseguidos los liófilos pueden almacenarse a una temperatura ambiente de 18°C a 20°C o bien de 4°C a 6°C (Arencibia, 2003).

El éxito de la liofilización para la preservación de los microorganismos no sólo depende de los pasos de esta técnica (congelación y deshidratación) sino también de las características físico-químicas del medio de suspensión, el tipo de microorganismo, el estado fisiológico del cultivo, las condiciones del cultivo y la concentración de los microorganismos (Arencibia, 2003). Sin embargo, este método de conservación a largo plazo presentan limitaciones debido a la formación de cristales de hielo que pueden romper las células y, a su vez, causar efectos negativos al microorganismo en la etapa de reactivación, por

esto se emplean agentes crioprotectores tales como glicerol, dimetilsulfóxido, ácido glutámico, glucosa, sacarosa, inositol, lactosa, suero, peptona y leche descremada, que impiden la acción destructiva del congelamiento sobre las células, es decir, protegen de la formación de cristales de hielo disminuyendo su efecto adverso (Arencibia, 2003). Para liofilizar no se debe utilizar glicerol, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad, que provoca que los liófilos queden muy viscosos. Tampoco es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido, porque es algo tóxico, y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar a las células microbianas. Por lo tanto, para la liofilización se recomiendan como crioprotectores el inositol para la mayoría de las bacterias y la leche descremada para hongos y actinomicetos (García, 2004).

La liofilización es un buen sistema de conservación de cultivo de microorganismos porque la operación es compatible con el procesamiento en condiciones que evitan o minimizan las posibilidades de contaminación (Zamora, 2003). Sin embargo, el proceso es complejo y caro, pues aunque no necesariamente requiere de un equipo sofisticado, se necesita al menos de un sistema de vacío, por lo que no se puede aplicar en laboratorios con recursos limitados (González, 2002).

2.1.5.1.2 Método de conservación por congelación

La congelación se puede emplear como método de conservación de cultivos microbianos. La mayor tasa de destrucción microbiana se observa inmediatamente tras la congelación, después se reduce notablemente y llega a estabilizarse durante largos períodos de tiempo. Por eso, aunque el número de supervivientes disminuya, la congelación es un método efectivo para mantener la viabilidad de los microorganismos. Cuanto menor sea la temperatura de almacenamiento, mayor será la supervivencia de los microorganismos. Para conseguir una mínima destrucción de los microorganismos interesa que la cristalización sea extracelular y que los microorganismos se deshidraten parcialmente impidiéndose la nucleación intracelular, pero no lo suficiente como

para que se reduzca su viabilidad. Suele incluirse, además agentes crioprotectores a la suspensión celular, son compuestos químicos de gran afinidad por el agua y son utilizados para disminuir los daños durante el proceso de congelación, ejemplo de ellos son el glicerol y el dimetilsulfóxido (Zamora, 2003; Gonzáles, 2002).

Cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método, la edad de las células, en la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. Esto sucede en el caso de microorganismos que esporulan (García, 2004). La velocidad en la congelación y descongelación, aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37°C (García, 2004). La temperatura de almacenamiento, debe ser lo más baja posible, lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195°C, o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C (García, 2004).

El principal problema del mantenimiento de microorganismos a temperaturas por debajo del punto de congelación es la muerte durante los procesos de congelación y descongelación. Si los microorganismos pueden sobrevivir a temperaturas del orden o por debajo de -20°C seguidas de un recalentamiento rápido hasta la temperatura ambiente es posible conservarlos congelados (Zamora, 2003).

Para la conservación en armarios congeladores, las células se almacenan en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que

cierran herméticamente), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión. De esta manera se evita que las cepas se congelen y se descongelen varias veces (García, 2004).

En este proceso juega un papel fundamental la estructura multifuncional de la membrana celular, que permite llevar a cabo procesos metabólicos esenciales para la preservación de la viabilidad, razón por la cual en los procesos de congelación, pese a que la célula es sometida a cambios biofísicos y químicos del ambiente, logra adaptarse (Arencibia, 2003).

2.1.5.2 Métodos alternativos de conservación

Se utilizan cuando no se pueden emplear métodos de conservación de largo plazo, bien por carecer de los equipos necesarios o porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar al microorganismo empleando varios de estos métodos (Zamora, 2003).

2.1.5.2.1 Método de conservación por transferencia periódica o subcultivos

La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido. Sin embargo, estas células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celulares, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco (García, 2004).

Este es el peor método para conseguir la estabilidad genética, puesto que al estar las células creciendo hay una alternancia de generaciones, y al cabo del tiempo las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus

características (García, 2004). Si se va a utilizar este método es aconsejable retardar el envejecimiento y alargar los periodos entre dos resiembras. Esto se puede conseguir de varias maneras, disminuyendo la cantidad de inóculo, rebajando la proporción de algunos nutrientes en el medio de cultivo e inoculando en picadura los microorganismos que son anaerobios facultativos, ya que el crecimiento en presencia de oxígeno es más rápido y origina productos generalmente tóxicos; y almacenando los cultivos a 4°C y 8°C. A veces también se suele recubrir el crecimiento con una capa de aceite mineral estéril (García, 2004). Con esto se consigue también evitar en la medida de lo posible la desecación del medio de cultivo, que podría ser tóxico para las células al aumentar su concentración. Otro inconveniente que tiene la transferencia periódica es que la contaminación de los cultivos resulta más fácil al tener que manejar los tubos a lo largo del tiempo y también por la posibilidad de entrada de ácaros en los mismos (García, 2004).

2.1.5.2.2 Método de conservación por refrigeración

El objetivo general de la refrigeración es incrementar la vida útil de los cultivos, y en consecuencia incrementar sus posibilidades de conservación. Los cultivos puros pueden ser exitosamente almacenados entre 0°C y 4°C, ya sea en refrigeradores o en cuartos fríos. Este método se aplica para corta duración (de 2 a 3 semanas para las bacterias y de 3 a 4 meses para los hongos) debido a que las actividades metabólicas de los microorganismos son muy lentas pero no se detienen. Así, su crecimiento continúa lentamente, los nutrientes son utilizados y los productos de desecho liberados en el medio. Esto da como resultado, finalmente, la muerte de los microbios después de algún tiempo (Zamora, 2003). Los inconvenientes que presenta este método son varios, incremento de la posibilidad de mutación con cada transferencia, con pérdida de las características del organismos, riesgo de contaminación y alteraciones en el medio de cultivo, durante la estadía en frío, en la cual se produce una desecación gradual del mismo (Zamora, 2003).

2.1.5.2.3 Método de conservación por suspensión en agua destilada

Es un método alternativo muy usado y que da altos porcentajes de viabilidad superiores a 5 años, en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como en levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua estéril, unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar, se pueden preparar en criotubos (García, 2004).

2.1.5.3 Métodos restringidos de conservación

En este grupo se engloban métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos que no resisten bien la liofilización o la congelación. Los fundamentos de los métodos se basan en detener el crecimiento de las células al eliminar el agua disponible (García, 2004).

2.1.5.3.1 Método de conservación por desecación de papel filtro

El empleo de un soporte de papel bastante absorbente Whatmann nº 3 para el mantenimiento de células en condiciones de ausencia de agua es un procedimiento adecuado y sencillo, para conservar cepas (García, 2004). La técnica consiste en embeber tiras de papel de filtro con una suspensión densa de microorganismos en suero, en glutamato de sodio o en otro agente. Las tiras de papel son posteriormente colocadas en tubos para su posterior secado al aire libre, en condiciones estériles o bajo vacío (García, 2004). De esta forma se han logrado conservar cepas de los géneros *Salmonella* y *Streptomyces* por períodos de hasta 2 años a temperatura ambiente (García, 2004).

2.1.5.3.2 Método de conservación por desecación

El método de almacenamiento de microorganismos en estado de secado ha sido aplicado como un método de preservación particularmente para bacterias y hongos que consiste en la separación del agua y la prevención de la rehidratación. Para el desarrollo de los métodos de desecación se han

empleado arena, tierra, sílica gel, discos y tiras de papel, tapones de algodón y discos de gelatina (González, 2002).

La desecación es un método simple para la preservación de microorganismos, el trabajo no es muy intenso, el costo es pequeño y la contaminación de los subcultivos es menos probable que con los subcultivos periódicos. Además, puede utilizarse para el almacenamiento de un gran número de cultivos. A pesar de esto, resulta difícil evaluar detalladamente su confiabilidad, pues, en la mayoría de los casos, la información apropiada no está disponible y en otros está restringida a un número limitado de microorganismos. De cualquier modo, los cultivos no deben ser preservados solamente por este método sin una investigación previa (González, 2002).

2.1.6 Taxonomía numérica

Una disciplina importante en microbiología es la clasificación microbiana, ya que permite establecer tanto las relaciones entre diferentes microorganismos, como el marco necesario para el desarrollo de una taxonomía natural (evolutiva). La taxonomía de actinomicetes a evolucionado significativamente durante los últimos treinta años, ya que un gran número de géneros han sido descubiertos y descritos. El aumento puede atribuirse en una parte importante, al interés industrial de este grupo microbiano (Leveau & Bouix, 2000). El fenotipo de las bacterias comprende características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, en la Tabla 3 se observan algunas de las pruebas que se realizan con este fin. La morfología de una bacteria incluye características celulares (forma, endosporas, flagelos, cuerpos de inclusión, coloración de Gram) y de la colonia (color, dimensiones, forma). Habitualmente, la taxonomía se ha basado en los análisis fenotípicos que incluyen el aspecto de un organismo, su metabolismo, sus enzimas, etc (Vandamme *et al.*, 1996).

En la taxonomía numérica, se determina varias características y los resultados se utilizan para agrupar los organismos en la escala taxonómica, principalmente al nivel de especie y subespecie. Las características fisiológicas y bioquímicas

incluyen datos sobre el crecimiento a diferentes temperaturas, valores de pH, concentraciones de sal, condiciones atmosféricas, crecimiento en presencia de diversas sustancias tales como agentes microbianos, y datos sobre la presencia o actividad de diversas enzimas, metabolización de los compuestos, entre otros (Leveau & Bouix, 2000; Vandamme *et al.*, 1996). 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 (Leveau & Bouix, 2000).

Tabla 3. Características utilizadas para los análisis de taxonomía numérica.

CARACTERÍSTICAS	DETALLES
Tiempo de máxima turbiedad	1, 2, 3, 5, 7, 14, 28 días
Crecimiento a	0, 3, 6, 10, 15, 20, 27, 32, 35, 37, 40, 42, 45°C
Crecimiento a pH	4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0
Requerimiento de sal	NaCl, MgSO ₄ , CaCl ₂ , KCl, medio sin sal
Requerimiento de aminoácidos y purinas	Ácido Glutámico, Alanina, Ácido Aspártico, Arginina, Prolina, Metionina, Leucina, Fenilalanina, Tirosina, Triptófano, Treonina, Serina, Histidina, Isoleucina, Valina, Lisina, Adenina,
Única fuente de carbono y nitrógeno	Alanina, Prolina, Ácido Glutámico, Metionina, Lisina, Treonina,

Fuente: Vinueza, 2010.

Tabla 3. Continuación.....

CARACTERÍSTICAS	DETALLES
Requerimiento de vitaminas	Ácido fólico, Riboflavina, Niacina, Tiamina, Pantotenato, Vitamina B12, Piridoxina, Colina. Biotina.
Sensibilidad a antibióticos	Penicilina G, Clortetraciclina, Tetraciclina, Strepomycina, Cloramfenicol.
Ácidos a partir de	Glucosa, Lactosa, Manitol, Arabinosa, Sucrosa, Galactosa, Rafinosa, Ramnosa.
Hidrólisis de	Esculina, Almidón, Caseína, Gelatina.
Producción de	H ₂ S, Indol, NO ₂ a partir de NO ₃ , NH ₃ a partir de arginina, Catalasa, Ureasa.
Utilización de glucosa	Oxidación o fermentación
Tinción de Gram	Positiva, negativa o variable
Inclusiones	Gránulos, grasas
Morfología Celular	
Largo	< 0.5 µm, 0.5-1.2 µm, 1.3-3.0 µm, > 3.0 µm
Ancho	Delgado, [largo(l) x ancho(a)] 3:1 – 6:1 Corto, [largo(l) x ancho(a)] 2:1 – 3:1

Fuente: Vinueza, 2010.

Tabla 3. Continuación.....

CARACTERÍSTICAS	DETALLES
Forma	Recta, curva, espiral, coco-bacilar, coco ramificado, borde cuadrado, borde redondo, borde cónico, borde fusiforme, pleomórfico.
Características de la Colonia	
Tamaño	< 2 mm de diámetro, 2-5 mm de diámetro, diámetro > a 5 mm.
Forma (elevación)	Plana, convexa, umbonada.
Forma (borde)	Entero, ondulado, filamentoso, rizado.
Densidad de la colonia	Transparente, translúcida, opaca.
Formación de Pigmento	
No difusible	Blanco, blanco grisáceo, rojo, rosado, tomate, amarillo, violeta, café, negro, azul.
Difusible	Amarillo, verde, café negro.

Fuente: Vinuesa, 2010.

2.1.7 Coeficiente de concordancia simple

Las pruebas descritas anteriormente se utilizan para determinar el grado de similitud entre los organismos. En estudios numéricos, los investigadores suelen calcular el coeficiente de similitud o el porcentaje de similaridad entre las cepas. Los árboles de clasificación o dendrogramas son la representación universal más empleada para plasmar los resultados de los agrupamientos entre los

datos fenotípicos de las distintas cepas microbianas y permiten determinar el porcentaje de similitud (Herrera, 2000).

Un determinado grado de similitud puede estar en relación con el género, la especie, y, a veces a nivel de subespecies. Por ejemplo, cepas de determinadas especies pueden agruparse a un nivel de similitud del 90%, las especies dentro de un determinado género pueden agruparse a un nivel del 70%, y diferentes géneros de una misma familia puede agruparse al 50% o en menor grado. Cuando este enfoque es la única base para la definición de una especie, es difícil saber cuántas y qué pruebas deben ser elejidas, y qué nivel de similitud debe ser escojido para reflejar la relación entre género y especie (Vinueza, 2010).

Suelen ocurrir errores cuando las especies se clasifican únicamente sobre la base de su fenotipo. Por ejemplo, diferentes enzimas, especificadas por diferentes genes, pueden catalizar la misma reacción. Varias características de las cepas pueden afectar a a caracterización fenotípica, entre ellas la tasa de crecimiento, la temperatura de incubación, el requerimiento de sal, y pH. Un mismo conjunto de pruebas no se pueden utilizar para clasificar a todos los grupos de organismos, y no hay ningún número específico de reacciones que permita la identificación de una especie (Vinueza, 2010).

Uno de los coeficientes de similitud más utilizados es el Coeficiente de Concordancia Simple, el mismo que se define como la proporción de características que coinciden entre dos OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas). Es el coeficiente más utilizado en los estudios de investigación. Es una forma sencilla de establecer la similitud entre dos muestras contando el número de variables que ambas poseen en la misma forma y dividir entre el número total de variables (Tipán, 2012).

Este índice toma valores de cero o uno indistintamente, donde cero significa ningún patrón en común y uno patrones idénticos (Tipán, 2012). Su fórmula es:

$$S_{SMC}(X_1, X_2) = \frac{a + b}{a + b + c + d}$$

Donde:

X_1, X_2 = Son las dos especies comparadas.

a = Número de lugares donde tanto X_1 como X_2 se han encontrado.

b = Número de lugares donde X_1 se ha encontrado pero X_2 no.

c = Número de lugares donde X_2 se ha encontrado pero X_1 no.

d = Número de lugares donde ni X_1 ni X_2 se han encontrado.

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).

2.2. Fundamentación filosófica

La investigación tiene un sustento filosófico en la Dialéctica, por ser un tema eminentemente científico.

Desde tiempos remotos los microorganismos han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de medicamentos (antibióticos, vitaminas y aminoácidos), elaboración de alimentos (pan, queso, leche, bebidas y licores) y fabricación de solventes y reactivos, entre otras aplicaciones. El creciente uso de estos materiales biológicos en la biotecnología y la protección medioambiental han fortalecido la necesidad de mantener los cultivos

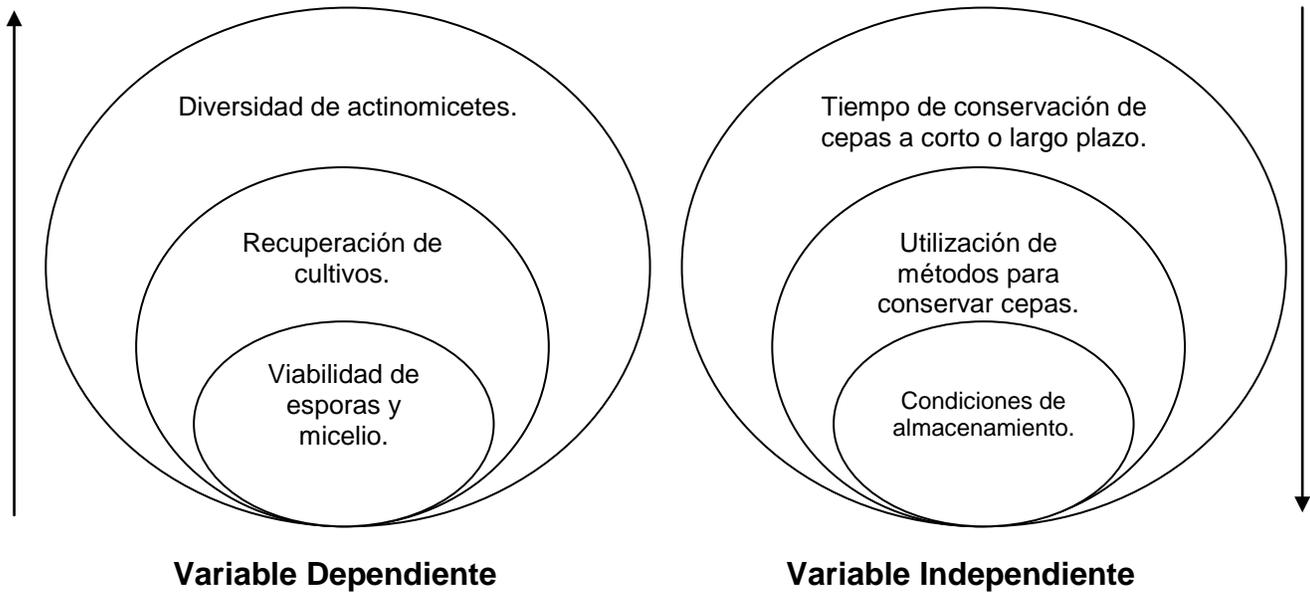
microbianos de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables.

La preservación de cepas microbianas no es tarea fácil y debe garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación. Colecciones de cultivos y bancos de genes se encuentran en el centro mismo de los esfuerzos por conservar la diversidad biológica, su objetivo principal es preservar sus propiedades de deformación mientras que proporciona las culturas puras y materiales genéticos necesarios para la aplicación de la biotecnología, la docencia, la investigación y otros fines, ya que su principal tarea es recoger, preservar y hacer accesibles las cepas microbianas para el público.

2.3 Fundamentación legal

La investigación 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.

2.4 Categorías Fundamentales



2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis nula

- Las condiciones de almacenamiento no influyen sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosa luego de recuperar las cepas.

2.5.2 Hipótesis alternativa

- Las condiciones de almacenamiento influyen sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosa luego de recuperar las cepas.

2.6 Señalamiento de variables de la hipótesis

- Número de cultivos de actinomicetes recuperados.
- Pureza de cultivos de actinomicetes.
- Diversidad de actinomicetes.

- Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos
 - Caracterización macroscópica: Color de micelio aéreo, micelio del sustrato y pigmento difusible.
 - Caracterización microscópica: Morfología de la cadena de esporas.
- Caracterización fenotípica de los cultivos de actinomicetes.
 - Rango de crecimiento relacionado al pH.
 - Rango de crecimiento relacionado a la temperatura.
 - Rango de crecimiento relacionado al porcentaje de salinidad.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Enfoque

La investigación tiene un enfoque predominante cuantitativo.

3.2 Modalidad básica de la investigación

Experimental.

3.3 Tipo o nivel de investigación

Básica exploratoria.

3.4 Población y muestra

En la investigación se utilizaron 277 cepas de actinomicetes, aislados a partir de la rizósfera de leguminosas, pertenecientes al proyecto “Búsqueda de Actinomicetes Productores de Antibióticos” y depositados en la colección de cultivos de microorganismos útiles para Biotecnología, de la Carrera de Ingeniería Bioquímica de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato”. Estos cultivos se recibieron en forma de suspensión de células en glicerol al 20% (w/v), y que han sido almacenadas en condiciones de refrigeración (1°C – 3°C) desde el año 2009.

3.5 Operacionalización de las variables

3.5.1 Variable Independiente: Condiciones de almacenamiento.

Conceptualización	Categorías	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas e Instrumentos
<p>Condiciones de almacenamiento se conceptualiza como:</p> <p>Empleo de técnicas que permitan el mantenimiento y preservación de los microorganismos por largos o cortos períodos de tiempo.</p>	Características macroscópicas	Coloración del reverso de la colonia, micelio aéreo y cualquier producción de pigmento difusible.	¿Cómo identificar el tipo de coloración?	Tabla de colores. Microsoft Excel.
	Características microscópicas	Tipo de morfología de las cadenas de espora.	¿Cuántas tipos de forma de la cadena de esporas?	Microscopio.
	Características fenotípicas de crecimiento a diferentes rangos de: Temperatura, pH y % de salinidad.	Presencia o ausencia de crecimiento: Evaluación por código binario. Presencia = 1, Ausencia = 0.	¿Por qué evaluar mediante código binario?	Potenciómetro. Incubador. Refrigerador.
	Solubilización de CaCO ₃ .	Solubilización de: CaCO ₃ en el medio de cultivo. Evaluación por código binario: Presencia = 1, Ausencia = 0.	¿Por qué evaluar mediante código binario?	Incubador. Cajas Petri.

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

3.5.2 Variable Dependiente: Viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes.

Conceptualización	Categorías	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas e Instrumentos
<p>Viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes se conceptualiza como:</p> <p>Supervivencia de células, libres de contaminación y que presenten estabilidad para investigaciones futuras.</p>	Número de cepas purificadas.	Cepas de actinomicetes recuperadas.	¿Cuántas?	Calculadora.
	Similaridades mayores al 80% indican miembros de un mismo grupo especie.	Grupos especie identificados en los dendrogramas respectivos de acuerdo al porcentaje de similitud.	¿Cómo establecer el número de grupos-especie identificados?	Software estadístico NTSys. Microsoft Excel.

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

3.6 Recolección de la información

3.6.1 Crecimiento y determinación de pureza en actinomicetes

Doscientas setenta y siete cepas de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas se recibieron como suspensiones de células en glicerol al 20% (w/v). Posteriormente, 20 μ L de cada una fueron inoculadas en cajas tetrapetri que contenían agar glucosa extracto de malta extracto de levadura (agar GYM), y cultivados mediante estría simple. Los platos sembrados fueron incubados a 28°C por 5 días. Una vez comprobado el crecimiento de cada actinomicete se realizó un repique en cajas petri que contenía agar GYM mediante estría compuesta.

Los platos sembrados fueron incubados a 28°C por 5 días. Aquellos que se encontraron contaminados, fueron repicados las veces necesarias hasta obtener finalmente un cultivo puro. Aquellos que luego del período de incubación presentaron características de cultivo puro, fueron etiquetados y posteriormente almacenados en tubos plásticos que contenían 1ml de glicerol al 20% (w/v) y almacenados a -10°C en un congelador, para su preservación a largo plazo. Al mismo tiempo se preparó un stock de células en tubos plásticos con 700 μ L de agua de llave estéril, los cuales fueron almacenados a 4°C en un refrigerador, para la realización de las pruebas fisiológicas y metabólicas posteriores.

3.6.2 Determinación de la diversidad de Actinomicetes.

3.6.2.1 Caracterización macroscópica.

Los cultivos puros obtenidos se agruparon de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias. Para la determinación del color del micelio del sustrato, micelio aéreo y pigmento difusible se utilizó una tabla estándar de colores (Anexo E). Aquellas cepas que presentaron características macroscópicas similares fueron ubicadas en un mismo grupo.

3.6.2.2 Caracterización microscópica.

Los microorganismos aislados fueron usados para preparar muestras que fueron observadas bajo el microscopio. La morfología de los actinomicetes se determinó mediante el micelio aéreo de acuerdo a las características que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas.

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

Fuente: Philips, 1994.

3.6.3 Pruebas fenotípicas.

3.6.3.1 Rango de crecimiento en función del pH.

Se inoculó 3µL de las suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar GYM, ajustando a los pHs 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y 9.5. El pH se ajustó con la ayuda de sistemas de búferes, evitando cambios en el mismo debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas fueron incubadas a 28°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se observó su crecimiento, evaluándose mediante código binario. Al actinomicete que presentó crecimiento, se asignó como 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, se asignó como 0. La clasificación de los actinomicetes en función del pH del medio de cultivo fue establecido a partir de los datos de la Tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función del pH del medio.

pH del medio							Clasificación
3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	
+	+	+	-	-	-	-	Acidófilo
+	+	+	+	-	-	-	Neutrotolerante
+	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
-	-	+	+	+	-	-	Neutrófilo
-	-	-	+	+	-	-	Neutrófilo
-	-	-	+	-	-	-	Neutrófilo
-	-	+	+	+	+	-	Alcalitolerante
-	-	-	+	+	+	-	Alcalitolerante
-	-	-	-	+	+	+	Alcalófilo

3.6.3.2 Rango de crecimiento en función de la temperatura.

Se inoculó 3µL de las suspensiones de células previamente preparadas, sobre la superficie de agar GYM. Los platos inoculados fueron incubados a una temperatura de 4°C, 37°C y 50°C durante 7 días, respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluó las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes mediante código binario. Al actinomicete que presentó crecimiento, se asignó como 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, se asignó como 0. La clasificación de los actinomicetes en función de la temperatura fue establecida a partir de la siguiente Tabla 6 que se muestra a continuación.

Tabla 6. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.

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

3.6.3.3 Rango de crecimiento en función del porcentaje de salinidad.

Se inoculó 3µL de las suspensiones de células sobre la superficie de agar GYM que contenía 1, 5, 10, 15 y 30% de NaCl (w/v). Las cajas fueron incubadas a 28°C por 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluó las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes mediante código binario. Al

actinomicete que presentó crecimiento, se asignó como 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, se asignó como 0. La clasificación de los actinomicetes en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo fue establecida a partir de la siguiente Tabla 7.

Tabla 7. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la concentración de Cloruro de Sodio (NaCl) del medio de cultivo.

Concentración de NaCl (%)						
1	5	10	15	30		Clasificación
+	-	-	-	-		No halófilo
+	+	-	-	-		Halófilo débil
+	+	+	-	-		Halófilo
+	+	+	+	-		Halófilo extremo
+	+	+	+	+		Halófilo extremo

3.6.3.4 Solubilización de carbonato de calcio en los experimentos de temperatura

Durante la ejecución de los experimentos de temperatura se notó la capacidad para solubilizar el carbonato de calcio por parte de ciertos actinomicetes en el medio de cultivo Agar GYM, debido a esto se decidió tomar en consideración esta prueba para la realización de la matriz de datos fenotípicos. Al actinomicete que presentó la característica de formar halos en el medio de cultivo, se asignó como 1, en caso contrario, es decir, ausencia de la formación de halos, se asignó como 0.

3.7 Procesamiento y análisis de datos

3.7.1 Determinación de la eficiencia de almacenamiento de cultivos puros de actinomicetes

Se reportó el número de actinomicetes recuperados por especie de leguminosa. Luego del periodo de inoculación e incubación, se procedió a contar cuantos han crecido y se encuentran en cultivo puro. Se calculó el porcentaje de pérdida de actinomicetes, para lo cual se dividió el número de cultivos no crecidos, sobre el total de cultivos recibidos y multiplicado por 100. Se obtuvo un porcentaje global y por leguminosa.

En la Tabla 8 se detallan el número de cepas iniciales recibidas para cada tipo de las leguminosas.

Tabla 8. Número de cepas recibidas para cada tipo de leguminosas.

TIPO DE LEGUMINOSA	NÚMERO DE CEPAS RECIBIDAS
Alfalfa	61
Arveja	38
Chocho	49
Fréjol	63
Haba	66
TOTAL	277

A continuación se detallan las fórmulas utilizadas para el respectivo cálculo de los porcentajes tanto de pérdida como de crecimiento de forma global y para

cada una de las leguminosas de las cuales fueron aisladas las cepas iniciales de actinomicetes.

Porcentaje Global:

Porcentaje de Pérdida de Actinomicetes:

$$\% \text{ de Pérdida de Actinomicetes} = \frac{\# \text{ de cultivos no crecidos}}{\# \text{ de cultivos recibidos}} \times 100$$

Porcentaje de Cultivos Contaminados:

$$\% \text{ de Cultivos Contaminados} = \frac{\# \text{ de cultivos contaminados} \times 100}{\# \text{ de cultivos recibidos}}$$

Porcentaje por Leguminosa:

Porcentaje de Pérdida de Actinomicetes por Leguminosa:

$$\% \text{ de Pérdida de Actinomicetes por Leguminosa} = \frac{\# \text{ de cultivos no crecidos por Leguminosa}}{\# \text{ de cultivos recibidos por Leguminosa}} \times 100$$

Porcentaje de Cultivos Contaminados por Leguminosa:

$$\% \text{ de Cultivos Contaminados por Leguminosa} = \frac{\# \text{ de cultivos contaminados} \times 100}{\# \text{ de cultivos recibidos}}$$

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 similaridad, usando el coeficiente de similaridad 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 9. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes.

#	PRUEBA	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
1	Color del Micelio Aéreo	Lavanda	LAV
2		Blanco	BLA
3		Melocotón	MEL
4		Tierra tostada	TIT
5		Verde glacial	VEG
6		Café	CAF
7		Marfil	MAR
8		Verde veronese	VEV
9		Verde metálico	VEM
10		Azul turquesa	AZT
11		Cobre glitter	COG
12		Lila	LIL
13		Sienna natural	SIN
14		Rosa	ROS
15		Verde pistache	VEP

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla 9. Continuación.....

#	PRUEBA	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
16	Color del Micelio de Sustrato	Plata metálico	PLM
17		Cobre metálico	COM
18		Cristal	CRI
19		Incoloro	INC
20		Amarillo piel	amp
21		Melocotón	mel
22		Sienna natural	sin
23		Marrón	mar
24		Capuchino	cap
25		Verde bandera	veb
26		Salmón	sal
27		Cobre	cob
28		Ocre oro	oco
29		Violeta	vio
30		Azul invierno	azi
31		Verde pino	vep
32	Coral	cor	
33	Verde gramo	veg	

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla 9. Continuación.....

#	PRUEBA	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
34	Color del Pigmento Difusible	Naranja	nar
35		Amarillo cadmio	amc
36		Amarillo piel	Amp
37		Melocotón	Mel
38		Azul	Azu
39		Violeta	Vio
40		Salmón	Sal
41		Verde	Ver
42		Espiral	ESP
43		Incompletas	INC
44	Tipo de cadena de esporas	Rectas cortas	REc
45		Rectas largas	REl
46		Fragmentadas	FRA
47		No determinadas	NOD
48	Rango de crecimiento en función del pH	3.5	3.5
49		4.5	4.5
50		5.5	5.5
51		6.5	6.5

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla 9. Continuación.....

#	PRUEBA	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
52		7.5	7.5
53		8.5	8.5
54		9.5	9.5
55	Rango de crecimiento en función de la Temperatura de Incubación	4°C	4°C
56		37°C	37°C
59		1%	1%
60	Rango de crecimiento en función de la Concentración de NaCl (%)	5%	5%
61		10%	10%
62		15%	15%
63	Solubilización de Carbonato de Calcio en experimentos de temperatura	4°C	4°C
64		37°C	37°C

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis de los resultados

4.1.1 Crecimiento y determinación de la pureza en Actinomicetes

En la Tabla A1 (Anexo A), se detallan los tipos de leguminosas de las cuales se aislaron las cepas de actinomicetes para el trabajo inicial. Se recibieron 277 cepas para la realización del trabajo de investigación, las cuales fueron distribuidas en 66 cepas aisladas de la rizósfera de haba, 63 cepas de fréjol, 61 cepas de alfalfa, 49 cepas de chocho y 38 cepas de arveja (Tabla A2; Anexo A). La Figura C1 (Anexo C) muestra la distribución del número de cepas para cada tipo de leguminosa.

Luego de realizados la recuperación de cada uno de los stocks, 21 cultivos crecieron para fréjol, seguido por 20 de alfalfa, 19 de haba, 18 de arveja y 8 de chocho, generando un total de 86 cepas recuperadas. Treinta y cinco no crecieron para el caso de alfalfa y chocho, seguido por 12 de alfalfa, 8 de haba y 6 de fréjol, dando un total de 96 cepas no crecidas. Para el caso de cultivos contaminados se obtuvieron 39 para haba, 36 para fréjol, 8 para arveja, 6 para alfalfa y 6 para chocho respectivamente, obteniéndose un total de 95 cepas contaminadas (Figura C2; Anexo C), como se muestra en la Tabla A3 (Anexo A).

Para el total de cultivos no recuperados y contaminados se formó un solo grupo entre cultivos que no crecieron y aquellos que presentaron contaminación los cuales arrojaron los siguientes resultados, 47 pertenecieron a haba, 42 a fréjol,

41 para alfalfa y chocho respectivamente y 20 a arveja dando un total de 191 cepas no recuperadas (Figura C3; Anexo C), como se muestra en la Tabla A4, (Anexo A).

Los cultivos puros se almacenaron en un total de 86, mientras que 191 fueron desechados de un total de 277 stocks iniciales (Figura C4; Anexo C) como se muestra en la Tabla A5 (Anexo A). La Tabla A6 (Anexo A) muestra claramente los porcentajes de los cultivos almacenados y cultivos perdidos para cada tipo de leguminosa, registrándose el mayor porcentaje de recuperación de cepas para el caso de la arveja con un 47.4%, seguido por un 33.3% para el fréjol, el porcentaje mayor de cultivos perdidos fue del 83.7% que corresponde a chocho, seguido por un 71.2% en fréjol como se muestra en la Figura C5 (Anexo C). Se obtuvieron porcentajes de manera global para determinar la purificación y pérdida de cultivos, se registraron los siguientes resultados, 31.0% que corresponde a cultivos puros y almacenados y 69.0% a cultivos perdidos entre no crecidos y contaminados (Figura C6; Anexo C), estos datos se muestran en la Tabla A7 (Anexo A).

4.1.2 Determinación de la diversidad de Actinomicetes

En la Tabla A8 (Anexo A) se muestra la caracterización macroscópica y microscópica de las 86 cepas de actinomicetes recuperadas, se obtuvieron un total de 41 grupos de color de los cuales, el grupo 22 presentó el mayor número de miembros con 12 actinomicetes, seguido por los grupos 1 y 10 con 6 actinomicetes cada uno respectivamente, mientras que los grupos 3, 4, 7, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 presentaron un solo miembro.

La Tabla A9 (Anexo A) muestra la distribución de cultivos de actinomicetes para cada grupo de color por tipo de leguminosa, registrándose el mayor número de cepas en el grupo de color 22, con 4 miembros para arveja y haba respectivamente, seguido por 2 miembros en fréjol y para arveja y chocho 1 miembro por cada una. Es evidente que las cepas aisladas de alfalfa se

distribuyeron dentro de un gran número de grupos de color (16), seguido por fréjol (15), (Figura C7; Anexo C), como se muestra en la Tabla A10 (Anexo A).

Para la caracterización microscópica se tomó en consideración la forma de la cadena de esporas. En la Tabla A11 (Anexo A) se muestra la distribución de la forma de la cadena de esporas para cada uno de los tipos de leguminosas, 25 cepas presentaron cadenas de esporas rectas cortas de las cuales el número mayor se registró en arveja con un total de 6, cadenas de esporas incompletas se registran un total de 25, el número mayor se encontró en arveja con 8, para el caso de las cadenas de esporas rectas largas se obtuvieron un total de 23, el número mayor se determinó en haba con 7, cadenas de esporas no determinadas dan un número total de 8, registrándose 4 como número mayor para el caso de alfalfa, cadenas de esporas en forma de espiral se obtuvieron un total de 3, teniendo un número mayor de 2 en fréjol y cadenas de esporas fragmentadas se registraron un total de 2, este único valor se muestra en alfalfa como se muestra en la Figura C8 (Anexo C).

4.1.3 Pruebas fenotípicas

4.1.3.1 Rango de crecimiento en función del pH

Los resultados para la clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH se muestran en la Tabla A12 (Anexo A). Se registraron mayor cantidad de cultivos neutrotolerantes (52) que alcalitolerantes (14) o neutrófilos (12) o acidófilos (6) y alcalófilos (2). Además se analizó el rango de crecimiento en función del pH de acuerdo al origen de la muestra, en este caso los aislamientos iniciales realizados de rizósfera de leguminosas. De los 52 cultivos clasificados como neutrotolerantes, 13 pertenecen a alfalfa y haba respectivamente, 12 a arveja, 11 a fréjol y 3 a chocho, como se muestra en la Tabla A13 (Anexo A), (Figura C9; Anexo C).

4.1.3.2 Rango de crecimiento en función de la temperatura

Los resultados para la clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación se muestra en la Tabla A14 (Anexo A). De las 86 cepas de actinomicetes recuperadas, 60 presentaron características de mesófilos, 14 se clasificaron como psicrótrofos, 12 como mesófilos extremos y cero como psicrófilos. De los 60 cultivos clasificados como mesófilos, 15 pertenecen a fréjol, 14 a haba, 13 a arveja, 11 a alfalfa y 7 a chocho como se muestra en la Tabla A15 (Anexo A), (Figura C10; Anexo C).

4.1.3.3 Rango de crecimiento en función del porcentaje de salinidad

Los resultados para la clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de concentración de NaCl se muestra en la Tabla A16 (Anexo A). De las 86 cepas de actinomicetes recuperadas, 39 presentaron características de halófilos, 26 se clasificaron como halófilos extremos, 20 como halófilos débiles y solo 1 como no halófilo. De los 39 cultivos clasificados como halófilos, 11 pertenecen a haba, arveja y fréjol cuentan con 9 miembros para cada uno respectivamente, 8 corresponden a alfalfa y 2 a chocho, como se muestra en la Tabla A17 (Anexo A), (Figura C11; Anexo C).

4.1.3.4 Solubilización de carbonato de calcio en los experimentos de temperatura

Los resultados para determinar la solubilización de carbonato de calcio en cultivos de actinomicetes mediante pruebas fisiológicas de temperatura se muestran en la Tabla A18 (Anexo A). De las 86 cepas de actinomicetes recuperadas, 48 registraron formación de halos en el medio de cultivo Agar GYM a una temperatura de incubación de 37°C, mientras que a 4°C únicamente 6 cepas de actinomicetes. De las 48 cepas formadoras de halos a 37°C, 14 pertenecen a haba, 13 a arveja, 10 a fréjol, 8 a alfalfa y 3 a chocho, como se muestra en la Tabla A19 (Anexo A), (Figura C 12; Anexo C). Cultivos no solubilizadores de carbonato de calcio a ninguna de las temperaturas de

incubación, se registraron un total de 32, mientras que aquellos cultivos solubilizadores de carbonatos de calcio a 4°C y 37°C se obtuvieron un total de 54, datos que se muestran en la Tabla A20 (Anexo A), (Figura C13; Anexo C).

4.1.4 Taxonomía numérica de datos fenotípicos

El dendrograma basado en el coeficiente de similaridad, calculado a partir de las pruebas fenotípicas (Tabla B1; Anexo B), de las cepas de actinomicetes purificadas en este estudio se muestra en la Figura C14 (Anexo C). Se identificaron treinta y seis grupos especies, de los cuales 21 grupos presentaron más de un solo representante, mientras que los 15 grupos restantes fueron recuperados como cultivos individuales. El grupo 1 considerado como el grupo más grande con 8 representantes. La Tabla A22 (Anexo A), muestra los treinta y seis grupos especie con sus respectivos miembros.

4.2 Interpretación de datos

4.2.1 Pureza y viabilidad de cepas de Actinomicetes recuperadas

Los stocks utilizados para la realización de este trabajo de investigación fueron aislados de cinco tipos diferentes de leguminosas, alfalfa (AL), arveja (AR), chocho (CH), fréjol (FR) y haba (HA). La recuperación de cultivos para cada tipo de leguminosa mostró resultados inesperados, el valor más alto se mostró en fréjol (21), mientras que el valor más bajo se registró en chocho (8), obteniéndose únicamente un 31.0% de cepas recuperadas. Es evidente que las condiciones de conservación y almacenamiento iniciales fueron las mismas para todas las cepas aisladas, ya que todas se mantuvieron en glicerol al 20%(w/v) y en refrigeración entre 1°C y 3°C.

Por otra parte, es evidente el gran número de cultivos no recuperados ya que superan el 65%, esto se ve influenciado principalmente por la aplicación deficiente de las técnicas de aislamiento inicial con las que se trabajó, es decir, la falta de material microbiológico (biomasa) contenido en los tubos con glicerol al 20% (w/v), fue evidente observar que en los tubos iniciales existió total

transparencia, evidenciando la falta de esporas y biomasa al ser comparados con los realizados y almacenados en el presente estudio.

El glicerol es considerado como agente crioprotector cuyo objetivo es proteger del daño que se pueda producir en las células microbianas mientras transcurre el tiempo de conservación y es utilizado principalmente en la aplicación del método de conservación a largo plazo de cepas por congelación (García, 2004).

No se puede dejar de lado los equipos deficientes en los que se mantuvieron en refrigeración a las cepas por alrededor de tres años, tiempo en el cual se perdió la viabilidad de algunas de ellas, ya que el método de conservación por refrigeración es considerado como un método alternativo para la conservación de cepas microbianas, puesto a que se aplica cuando son períodos de corta duración (Zamora, 2003).

La congelación y liofilización son los métodos más aceptados para conservar microorganismos, ya que paralizan el crecimiento de las células microbianas y permiten tiempos de conservación bastante largos. El método por congelación, según la técnica empleada, la temperatura de congelación varía, se usan congeladores normales (-30°C), industriales (-70°C) o nitrógeno líquido (hasta -200°C). Cuanto más baja sea la temperatura, mejor es la conservación.

Para evitar la formación de cristales en el interior de las células, que pueden producir daños en sus estructuras, se adicionan compuestos crioprotectores, como dimetilsulfóxido. Para el método por liofilización, se hace una congelación previa antes de pasar al liofilizador. En él, el agua se sublimará por bajada de presión y el cultivo microbiano queda en el seno de una matriz porosa protectora (que por lo general es leche descremada o sacarosa). Debido a las características del método, se sella a vacío.

4.2.2 Caracterización fenotípica

4.2.2.1 Rango de crecimiento en función del pH

Al analizar los datos de rango de crecimiento en función del pH, la mayoría de actinomicetes presentaron características de ser neutrótolerantes, alcalitolerantes y neutrófilos, esto se mantiene cuando se comparan los resultados en función del origen de la muestra. Los valores de pH de los suelos utilizados en el trabajo de investigación inicial “Búsqueda de Actinomicetes Productores de Antibióticos”, presentaron características neutras a ligeramente ácidas (Tabla A21; Anexo A).

4.2.2.2 Rango de crecimiento en función de la temperatura

En lo referente al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación, la mayoría de actinomicetes presentaron características de mesófilos y psicrótrofos. La Provincia de Tungurahua y en especial el Cantón Ambato posee un clima templado con temperaturas que oscilan entre los 10°C y 25°C, 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 actinomicetes que crecen.

4.2.2.3 Rango de crecimiento en función del porcentaje de salinidad

Con relación a los datos del rango de crecimiento en función del porcentaje de salinidad, la mayoría de actinomicetes presentaron características de ser halófilos, una de las características físicoquímicas que determina el grado de salinidad que presenta el suelo es la conductividad eléctrica, dicha característica no fue tomada en consideración en el trabajo de investigación inicial “Búsqueda de Actinomicetes Productores de Antibióticos”. Los suelos exclusivos para uso agrícola se ven afectados por el agua de riego y fertilizantes, ya que esta puede acarrear grandes contenidos de sales, generando la pérdida gradual de la fertilidad del suelo.

4.2.2.4 Solubilización de carbonato de calcio en los experimentos de temperatura

Al realizar los experimentos de temperatura se pudo observar un dato curioso, el mayor número de cepas de actinomicetes logró solubilizar el carbonato de calcio presente en el medio de cultivo a 37°C. Las melazas son consideradas fuentes exclusivas de carbono, en este caso el extracto de malta (ingrediente principal del agar GYM) es una de ellas, y el carbonato de calcio como compuesto activo del medio de cultivo, esto se pudo determinar gracias a la formación de un halo de coloración café – cremoso alrededor de la colonia del microorganismo en estudio. Cabe recalcar que de esta manera la capacidad que tienen ciertos actinomicetes para poder solubilizar carbonato de calcio (compuesto insoluble) debido a la producción de ácidos orgánicos, estos provienen del metabolismo de los actinomicetes.

4.2.3 Taxonomía numérica de datos fenotípicos

El análisis de datos fenotípicos en taxonomía numérica, arrojó un número menor de grupos especies (36), que los registrados preliminarmente basados únicamente en los grupos de color iniciales (41). 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 está basado en la comparación de 64 características, mientras que la agrupación por color únicamente se basa en la pigmentación de la colonia. Entonces es más arbitraria la ubicación de los actinomicetes purificados en base a la coloración que presentó el micelio aéreo, micelio del sustrato y pigmento difusible, por lo tanto es más inexacta. Sin embargo, esta etapa es esencial para ordenar preliminarmente y facilitar el estudio de los actinomicetes.

Es importante recalcar que existe repetición de cultivos aislados ya que de las 86 cepas de actinomicetes purificadas al principio del experimento, el dendrograma de similaridad de las pruebas fenotípicas muestra la existencia de 36 posibles especies diferentes. Esto constituye que el 42% de las 86 cepas

purificadas, son diferentes. Este tipo de resultados no hacen sino justificar el uso de pruebas rápidas de identificación de microbios similares en programas de recuperación y purificación de cepas que permiten evitar la pérdida económica y de tiempo que significa trabajar con un gran número de microorganismos repetidos. Por otra parte se debe mencionar el gran número de cepas iniciales que no se lograron recuperar (191), debido a la deficiente aplicación de técnicas para aislar y conservar microorganismos de interés.

4.2.4 Discusión general del trabajo

La investigación se enfocó en la determinación de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas. Para este fin se logró determinar una metodología adecuada para la recuperación de cepas aisladas inicialmente pertenecientes al proyecto “Búsqueda de Actinomicetes Productores de Antibióticos” y depositados en la colección de cultivos de microorganismos útiles para Biotecnología. Las cepas aisladas y almacenadas en cultivos puros se mantuvieron en suspensiones de glicerol al 20% (w/v) y en refrigeración entre 1°C y 3°C, por alrededor de tres años aproximadamente. Transcurrido este tiempo se trató de recuperar las cepas en su mayor número pero de un total de 277 cepas aisladas y almacenadas inicialmente, únicamente se lograron recuperar 86 cepas que corresponden a un 31.0%.

Como se citó anteriormente los actinomicetes fueron aislados de la rizósfera de leguminosas, se trabajó con alfalfa (AL), arveja (AR), chocho (CH), fréjol (FR) y haba (HA), de las 277 cepas iniciales, 61 cepas pertenecieron a alfalfa de las cuales sólo 20 cepas se lograron recuperar, lo que corresponde a un 32.8%, 38 cepas correspondieron a arveja de las cuales únicamente 18 cepas fueron recuperadas lo que generó un 47.4%, 49 cepas de chocho fueron almacenadas de las cuales sólo 8 cepas fueron recuperadas dando un 16.3%, 63 cepas pertenecieron a fréjol de las cuales 21 se lograron recuperar obteniéndose un

33.3%, y finalmente de 66 cepas de haba sólo 19 fueron recuperadas generando un 28.8%.

La recuperación de las cepas aisladas y almacenadas en cultivos puros no fue como se esperaba según los resultados que se observan en el párrafo anterior, existen varias causas que generaron la pérdida inevitable de cultivos, entre las principales se ha podido citar, la aplicación deficiente de las técnicas de aislamiento inicial de cultivos, es decir, los stocks no fueron preparados adecuadamente para su almacenamiento y conservación en cultivo puro ya que estos deben contener suficiente material microbiológico (biomasa) para su posterior recuperación (turbiedad del medio), para la conservación en cultivo puro se utilizó glicerol al 20% (w/v), el mismo que actúa como un agente crioprotector, los cuales son compuestos químicos no tóxicos para la célula, con facilidad para atravesar la membrana celular y acumularse intracelularmente. El mal estado de los equipos en los cuales se conservaron las cepas también es otra de las causas principales para la pérdida de cultivos, ya que estos no siempre están a la temperatura adecuada (entre 1°C y 3°C), ya sea por la falta de energía eléctrica o por descuido del personal a cargo.

La técnica de refrigeración, una de las más utilizadas para la conservación de cultivos, no es muy recomendada si se trata de almacenar cepas por largos períodos de tiempo, debido a que las actividades metabólicas de los microorganismos son muy lentas pero no se detienen. Así, su crecimiento continúa lentamente, los nutrientes son utilizados y los productos de desecho liberados en el medio. Esto da como resultado, finalmente, la muerte de los microbios después de algún tiempo (Zamora, 2003). Cepas aisladas inicialmente en el año 2009, de gran interés, que presentaron coloraciones verdes y azules (micelio aéreo), las mismas que formaban pigmentos difusibles verdes y azules, se llegaron a perder, posiblemente estas cepas podían llegar a metabolizar compuestos bioactivos de interés industrial.

Pruebas fenotípicas fueron indispensables para la realización de la taxonomía numérica, entre las cuales destacaron, el rango de crecimiento en función del pH, en función de la temperatura y en función del porcentaje de salinidad (NaCl), un dato curioso se registró mientras se llevaban a cabo los experimentos de temperatura y fue la solubilización del carbonato de calcio (CaCO_3), en el medio de cultivo agar GYM, esto se pudo evidenciar debido a la formación de halos en el medio, lo que indica la capacidad de ciertas cepas de actinomicetes para poder solubilizar compuesto insolubles como lo es el carbonato de calcio, mediante la producción de ácidos orgánicos. Un medio de cultivo para que permita el crecimiento adecuado de microorganismos debe contener como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, sales inorgánicas. Estos nutrientes generalmente se aportan con el extracto de malta y el carbonato de calcio como tal, ya que en su composición química contiene glucosa, la misma que es la principal fuente de carbono, y es considerado un sustrato excelente para muchos hongos filamentosos, levaduras y actinomicetes. Cabe recalcar que la prueba de solubilización de carbonato de calcio por parte de las cepas de actinomicetes no estaba considerada como una de las pruebas fisiológicas para la elaboración de la matriz de datos fenotípicos en código binario, pero finalmente se la tomó en consideración y se la anexó como una prueba fisiológica más.

La producción microbiana de ácidos orgánicos es un método prometedor para la obtención de sustancias de interés comercial que está desplazando paulatinamente los métodos de síntesis química. La mayoría de los obtenidos microbiológicamente proceden del ciclo de Krebs, por lo que, en teoría, son muchísimos los microorganismos capaces de sintetizarlos, aunque sólo unos pocos en cantidades adecuadas para la aplicación industrial.

Con el análisis de las pruebas fenotípicas (64) realizadas en la presente investigación fue posible obtener el dendrograma basado en el coeficiente de similitud al 90%, donde se identificaron treinta y seis grupos especie, de los cuales 21 presentaron más de un miembro y los 15 restantes fueron

recuperados como cultivos individuales. Es probable que muchos de estos grupos especie lleven al descubrimiento de nuevas especies de actinomicetes, incrementando así el conocimiento de la extensión de la diversidad de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas. Además, el poder haber recuperado 36 grupos especies diferentes también indica la gran diversidad de actinomicetes que pueden resistir las diversas condiciones que presentan los suelos agrícolas de la Provincia del Tungurahua. Es más que probable que estos microbios han desarrollado características metabólicas que permitan tratar de estudiar si existe algún proceso útil en Biotecnología, como es el caso de la producción de ácidos orgánicos. Ya que se ha demostrado que muchos de estos provienen del metabolismo de los actinomicetes.

Si bien es cierto que este estudio es de carácter básico, es evidente que los resultados obtenidos son alentadores y se convierte en la base fundamental para futuros estudios. Las técnicas empleadas para aislamiento y el método de conservación de cepas de microorganismos, juegan un papel muy importante si se trata de mantener la viabilidad de esporas y micelio de estos microorganismos al momento de ser purificadas para trabajos posteriores.

4.3. Verificación de hipótesis

4.3.1 Hipótesis nula

- Las condiciones de almacenamiento no influyen sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosa luego de recuperar las cepas.

4.3.2 Hipótesis alternativa

- Las condiciones de almacenamiento influyen sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosa luego de recuperar las cepas.

Después de analizar los resultados de la recuperación de cepas aisladas en el trabajo de investigación inicial “Búsqueda de Actinomicetes Productores de Antibióticos”, características macro y microscópicas y pruebas fisiológicas de crecimiento, se acepta la hipótesis alternante (H_1) afirmando que las condiciones de almacenamiento influyen sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosa luego de recuperar las cepas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se lograron recuperar únicamente 86 cultivos de actinomicetes de un total de 277, esto corresponde a un 31.0%, es evidente la pérdida de cultivos, lo cual corresponde a un 69.0%, esto se debe a la aplicación deficiente de las técnicas de aislamiento y conservación de cepas, equipos deficientes para su conservación y mala manipulación, lo cual incluye transporte de tubos crioviales con material microbiológico (biomasa).
- El método de conservación inicial de cepas utilizada fue Refrigeración entre 1°C y 3°C, la misma que no es la adecuada si se quiere conservar cepas por un largo período de tiempo, estas debieron ser congeladas para evitar grandes pérdidas de cultivos de actinomicetes.
- De un total de ochenta y seis cultivos recuperados, 52 presentaron características de neutrotolerantes y 14 de alcalitolerantes. El resto presentaron características de neutrófilos, acidófilos y alcalófilos.
- Se registró mayor cantidad de cultivos mesófilos en cuanto al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación. Cultivos halófilos se registraron en un número de 39 y uno sólo no halófilo.
- La solubilización de carbonato de calcio se la incluyó en el presente trabajo de investigación debido a que se observó la formación de halos al momento de la realización de los experimentos de temperatura, de los cuales un total

de 54 fueron solubilizadores de CaCO_3 registrándose 48 de estos a 37°C y 6 a 4°C.

- En la taxonomía de datos fenotípicos las ochenta y seis cepas de actinomicetes purificadas fueron ubicadas en 36 grupos especies basados en un coeficiente de similaridad del 90%, 21 grupos estuvieron formados por más de un miembro, mientras que el resto se recuperó como cultivo individual (15).

5.2 Recomendaciones

- Realizar caracterización molecular, es decir el secuenciamiento del ADN ribosomal 16S de los distintas cepas de actinomicetes purificadas en este estudio.
- Profundizar el estudio de las cepas purificadas en el presente trabajo con pruebas de caracterización fenotípica que determinen la producción de metabolitos secundarios.
- Establecer pruebas de actividad antagónica para las cepas de actinomicetes purificadas.
- Efectuar un estudio a profundidad que indique el porqué se obtuvieron mayor pérdida de cultivos en chocho y menor pérdida de cultivos en arveja.

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1 Datos Informativos

6.1.1 Título

Determinación de la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes almacenadas en condiciones de refrigeración con glicerol.

6.1.2 Instituciones ejecutoras

Universidad Técnica de Ambato.

6.1.3 Beneficiarios

Investigadores. Centros e instituciones de investigaciones microbiológicas y biotecnológicos. Empresas privadas relacionadas a la conservación de germoplasma microbiano.

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 le ejecución

Ocho meses.

6.1.6 Equipo técnico responsable

Docentes, investigadores, estudiantes y tesistas que se encuentren trabajando en la determinación de la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes almacenadas en condiciones de refrigeración con glicerol.

6.2 Antecedentes de la propuesta

Las colecciones microbianas son consideradas como centros de recursos genéticos que custodian dicho germoplasma, entre sus funciones principales se encuentra la conservación de los microorganismos, lo que permite garantizar el suministro de cepas requerido para realizar actividades docentes, investigativas o productivas. Las colecciones de cultivos microbianos surgieron con el nacimiento de la Microbiología y su misión es garantizar la calidad de los microorganismos que custodian, que consiste en conservarlos a través de métodos adecuados para que mantengan la pureza, viabilidad y estabilidad genética inherentes a cada cepa en particular. Una actividad propia de las colecciones, es el programa de investigaciones, por su contribución al conocimiento de la morfología, taxonomía, genética, bioquímica y fisiología, de los grupos mantenidos, permitiendo el desarrollo de condiciones óptimas para su crecimiento.

La investigación “Determinación del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas” demostró la estrecha relación que guarda el método seleccionado para el aislamiento inicial, conservación y almacenamiento en cultivo puro de cepas de interés industrial, ya que la pérdida de cepas se registró de manera drástica. Las pocas cepas que se lograron purificar, fueron sometidas a diversas pruebas fenotípicas y posteriormente se realizó taxonomía numérica de datos fenotípicos que serán la base fundamental para encontrar nuevas especies de actinomicetes, con rutas metabólicas para el descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos, dichas cepas de interés industrial podrán ser almacenadas en colecciones de cultivos para futuras investigaciones.

6.3 Justificación

El estudio “Determinación del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la

rizósfera de leguminosas”, demostró que las técnicas de aislamiento y conservación en cultivo puro de cepas de actinomicetes no fue la correcta. Las cepas de actinomicetes que se lograron recuperar en esta investigación servirán para establecer un protocolo para la correcta aplicación de las técnicas de aislamiento iniciales, y la mejor elección del método por el cual se van a conservar en cultivo puro dichas cepas. La aplicación de esta técnica a gran escala permitirá la conservación de cepas por largos períodos de tiempo, evitando la pérdida de muchas de ellas ya sea por contaminación o por daño celular mientras transcurre el tiempo de conservación. De este modo de podrá contar con un gran número de cepas viables para la realización de trabajos de investigación posteriores.

6.4 Objetivos

6.4.1 General

- Establecer un protocolo de purificación de cepas de actinomicetes conservadas en condiciones de refrigeración con glicerol.

6.4.2 Específicos

- Purificar selectivamente cepas de actinomicetes de diferentes tipos de rizósfera de leguminosas.
- Determinar las condiciones óptimas de cultivo para el desarrollo in vitro de cepas de actinomicetes procedentes de aislamientos y conservaciones en cultivo puro.

6.5 Análisis de factibilidad

La viabilidad de la propuesta “Determinación de la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes almacenadas en condiciones de refrigeración con glicerol”, se asegura con los resultados obtenidos en la investigación “Determinación del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de

leguminosas”. 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 del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas”, es la base científica para la formulación de la siguiente propuesta.

6.7 Metodología - modelo operativo

6.7.1 Crecimiento y determinación de pureza en actinomicetes

Cepas de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas se recibirán como suspensiones de células en glicerol al 20% (w/v). Posteriormente, ~~20~~ de cada serán inoculadas en cajas tetrapetri que contendrá agar glucosa extracto de malta extracto de levadura (agar GYM), y cultivados mediante estría simple.

Los platos sembrados serán incubados a 28°C por 5 días. Una vez comprobado el crecimiento de cada actinomicete se realizará un repique en cajas petri que contendrá agar GYM mediante estría compuesta. Los platos sembrados serán incubados a 28°C por 5 días.

Aquellos que luego del período de incubación presentaran características de cultivo puro, serán etiquetados y posteriormente almacenados en tubos plásticos que contendrán 1ml 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 de células en tubos plásticos con ~~700~~ de agua de llave estéril, los cuales serán almacenados a 4°C en un refrigerador. Estos últimos serán usados para los diferentes experimentos que se desarrollaran en el

presente estudio. Aquellos que se encontraran contaminados, serán repicados las veces necesarias hasta obtener finalmente un cultivo puro.

6.7.2 Determinación de la diversidad de Actinomicetes.

6.7.2.1 Caracterización macroscópica.

Los cultivos puros obtenidos se agruparan de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias. Para la determinación del color del micelio del sustrato, micelio aéreo y pigmento difusible se utilizará una tabla estándar de colores, estableciéndose grupos de color mediante la determinación de similitud en sus pigmentaciones.

6.7.2.2 Caracterización microscópica.

Los microorganismos aislados serán usados para preparar muestras que fueron observadas bajo el microscopio. La morfología de los actinomicetes se determinará mediante el micelio aéreo de acuerdo a las características que presenten las cadenas de esporas.

6.7.3 Pruebas fenotípicas

6.7.3.1 Rango de crecimiento en función del pH.

Se inocularán 3 μ L de las suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar GYM, a pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y 9.5. El pH será ajustado con la ayuda de sistemas de búfferes para así evitar cambios del mismo debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas serán incubadas a 28°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se observará su crecimiento, evaluándose mediante código binario. Presencia de crecimiento, se asignará como 1, ausencia de crecimiento, se asignará como 0.

6.7.3.2 Rango de crecimiento en función de la temperatura.

Se inoculará 1 μ L de las suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar GYM. Los platos inoculados serán incubados a una

temperatura de 50°C, 37°C y 4°C respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación se observará el crecimiento el que será evaluado mediante código binario. Presencia de crecimiento, se asignará como 1; ausencia de crecimiento, se asignará como 0.

6.7.3.3 Rango de crecimiento en función del porcentaje de salinidad.

Se inoculará 3µL de las suspensiones de células sobre la superficie de agar GYM que contendrá 1, 5, 10, 15 y 30% de NaCl (w/v). Los platos serán incubados a 28°C por 5 días. Transcurrido este tiempo se evaluará las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes. Esta evaluación se realizará mediante código binario. Presencia de crecimiento, se asignará como 1; ausencia de crecimiento, se asignará como 0.

6.8 Administración

INDICADORES A MEJORAR	SITUACIÓN ACTUAL	RESULTADOS ESPERADOS	ACTIVIDADES	RESPONSABLES
Planteamiento de una metodología para la purificación de cepas de actinomicetes.	Desconocimiento del método óptimo para la conservación de cepas microbianas.	Purificación de un gran número de cepas de microorganismos, conservadas en glicerol al 20% y en refrigeración a 1°C.	Determinación de la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes. Pruebas fisiológicas y bioquímicas de las cepas de actinomicetes recuperadas.	Docente Investigador
	Actividad antagónica con diversos microorganismos modelo.	Determinación del número de actinomicetes que presentan actividad frente a <i>Fusarium</i> , <i>Botrytis</i> , bacteria G+, bacteria G- y levadura	Análisis de datos fenotípicos	Estudiante Tesisistas

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

6.9 Previsión de la evaluación

PREGUNTAS BÁSICAS	EXPLICACIÓN
¿Quiénes solicitan evaluar?	<p>Docente</p> <p>Investigador</p>
¿Por qué evaluar?	<p>Proporciona información acerca del efecto de las condiciones de almacenamiento de cepas de actinomicetes, aisladas inicialmente en el trabajo de investigación “Búsqueda de Actinomicetes Productores de Antibióticos”, 2009.</p>
¿Para qué evaluar?	<p>Para la determinación de la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas.</p>
¿Qué evaluar?	<p>Datos obtenidos a partir de taxonomía numérica.</p>
¿Quién evalúa?	<p>Docente</p>
¿Cuándo evaluar?	<p>Al finalizar las pruebas de taxonomía numérica.</p>
¿Cómo evaluar?	<p>Realizando una matriz en código binario y analizando los datos obtenidos en todas las pruebas.</p>
¿Con qué evaluar?	<p>Programa NTSys.</p>

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ARENCIBIA, D.; ROSARIO, L., 2003.** Métodos de conservación de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames. *Revista de Toxicología en Línea*, Pp. 1-19
2. **BURGET, N. & SIERRA, N., 2012.** Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* **3**, 1-4.
3. **CARRILLO, L., 2003.** Actividad microbiana. *Microbiología Agrícola* **3**, 1-28.
4. **CUESTA, G., 2004.** Detección y caracterización por métodos Fenotípicos y moleculares de mycolata formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología, Pp. 1-4.
5. **DE LOS SANTOS, A., 1998.** Diferenciación de actinomicetes mediante el análisis de ácidos micólicos. Universidad Autónoma de Nuevo León, Pp. 1-10.
6. **FRANCO, M., 2008,** Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetes e interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de micorrizas, Pp. 37-53.
7. **FERNÁNDEZ, C.; MARTÍNEZ, G.; PERURENA, M.; ILLNAIT, M.; VALDÉS, I., 2005.** La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”: Funciones y retos. *Revista Cubana de Medicina Tropical* **57(3)**, 1-7.
8. **GARCÍA, M.; URUBURU, F., 2004.** La conservación de cepas microbianas. *Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)* **30**, 12-15.

9. **GONZÁLES, R.; MONTES DE OCA, N.; RIVERÓN, Y.; NÚÑEZ, A., 2002.** Aseguramiento de la calidad en las colecciones de de cultivos microbianos. Centro Nacional de de Sanidad Agropecuaria, CENSA, Pp. 1-30.
10. **HERRERA, A., 2000.** La clasificación numérica y la aplicación en la ecología. Instituto Tecnológico de Santo Domingo. República Dominicana. Pp. 42.
11. **LEVEAU, J & BOUIX, M., 2000.** Microbiología Industrial, Los organismos de interés industrial. Primera Edición. Editorial Acribia, España, Pp. 430-450.
12. **MADIGAN, M.; MARTINKO, J. & PARKER, J., 2004.** Biología de los Microorganismos. Décima Edición. Pearson Prentice Hall, España, Pp. 56-81.
13. **MORALES, M.; IGLESIAS, E.; ORTIZ, E., 2007.** Actividad desarrollada por la sección de colecciones de cultivos microbianos y otros materiales biológicos de la ATAC. *Revista ATAC*, Pp. 1-10.
14. **PÉREZ, J.; CASAS, M.; BELTRÁN, C., 2005.** Conservación de bacterias por el método de suspensión en agua destilada estéril. Instituto Nacional de Investigaciones de la caña de azúcar, INICA, Pp. 1-1.
15. **PHILIPS, L., 1994.** Manual de Actinomycetes, Pp. 150.
16. **PINZON, Y.; BUSTAMANTE, S.; BUITRAGO, G., 2003.** Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología, Pp. 1-4.
17. **PRESCOTT, L.; HARLEY, J.; KLEIN, D., 2002.** Microbiología. Mc.GRAW HILL Interamericana Editorial. Quinta Edición. Madrid, Pp. 1-78.

18. **SÁNCHEZ, L. & CORRALES, L., 2005**, Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *NOVA – Publicación Científica ISSN. 3:1794-2470*.
19. **SIVAKUMAR, K.** Actinomycetes. Centre of Advanced Study in Marine Biology Annamalai University. Pp.197-203.
20. **SMITH, D., 2003**, Culture collection over the world. *Int Microbiol. 6:95-100*.
21. **STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. & WARD-RAINEY, N., 1997**. Proporsal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47(2):479-491**.
22. **STANBURY, P.; WHITAKER, A. & HALL, S., 1995**. Principles of fermentation technology. Pp. 357.
23. **TIPÁN, D., 2012**, Determinación de la producción de antibióticos por actinomicetes acidófilicos. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.
24. **UZCÁTEGUI-NEGRÓN, M., 2009**. Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: un estudio fenotípico comparativo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, Pp. 91-97.
25. **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.
26. **VINUEZA, G., 2010**, Determinación de la relación entre la caracterización fenotípica y genotípica de actinomicetes como mecanismo de redeplicación de microorganismos útiles en Biotecnología. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

- 27. WENG, Z.; DÍAZ, E.; ÁLVAREZ, I., 2005,** Conservación de microorganismos: ¿Qué debemos conocer?. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* **43**, 1-4.
- 28. ZAMORA, L., 2003,** Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Universidad de Giorgia. Instituto de Tecnología Agroalimentaria.

ANEXOS

ANEXO A.

DATOS

EXPERIMENTALES

Tabla A1. Tipos de leguminosa.

NÚMERO	TIPO DE LEGUMINOSA
1	Alfalfa
2	Arveja
3	Chocho
4	Fréjol
5	Haba

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A2. Número de cepas recibidas para cada tipo de leguminosa.

TIPO DE LEGUMINOSA	NÚMERO DE STOCKS RECIBIDOS
Alfalfa	61
Arveja	38
Chocho	49
Fréjol	63
Haba	66
TOTAL	277

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A3. Número de cultivos crecidos, no crecidos y contaminados para cada tipo de leguminosa.

TIPO DE LEGUMINOSA	CULTIVOS CRECIDOS	CULTIVOS NO CRECIDOS	CULTIVOS CONTAMINADOS	TOTAL
Alfalfa	20	35	6	61
Arveja	18	12	8	38
Chocho	8	35	6	49
Fréjol	21	6	36	63
Haba	19	8	39	66
TOTAL	86	96	95	277

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A4. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados por tipo de leguminosa.

TIPO DE LEGUMINOSA	CULTIVOS ALMACENADOS	CULTIVOS PERDIDOS	TOTAL
Alfalfa	20	41	61
Arveja	18	20	38
Chocho	8	41	49
Fréjol	21	42	63
Haba	19	47	66
TOTAL	86	191	277

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A5. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados.

TIPO DE CULTIVO	NÚMERO DE CULTIVOS
Purificados	86
Perdidos	191
Total	277

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A6. Porcentaje de cultivos almacenados y de pérdida para cada tipo de leguminosa.

TIPO DE LEGUMINOSA	PORCENTAJE DE CULTIVOS ALMACENADOS	PORCENTAJE DE PÉRDIDA
Alfalfa	32.8	67.2
Arveja	47.4	52.6
Chocho	16.3	83.7
Fréjol	33.3	66.7
Haba	28.8	71.2

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A7. Cálculo de los porcentajes globales de actinomicetes.

CULTIVOS	PORCENTAJE GLOBAL (%)
Recuperados	31.0
Perdidos	69.0

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A8. Caracterización Macroscópica: Grupos de color. Caracterización Microscópica: Forma de la cadena de esporas, de los cultivos de actinomicetes recuperados aislados de la rizósfera de leguminosas.

GRUPO DE COLOR		COLOR	CÓDIGOS		
Caracterización Macroscópica					Caracterización Microscópica
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	Pigmento Difusible	Códigos	Forma de la Cadena
1	Lavanda	Amarillo piel	Amarillo piel	FR012, AR002, AL018, FR011, AR008, HA005	Incompleta
2	Blanco	Melocotón	-	AR012, CH006, CH007	Incompleta
3	Melocotón	Sienna natural	-	CH008	Recta larga
4	Tierra tostada	Marrón	-	FR001	No determinada
5	Blanco	Marrón	-	AL007, AL009	Recta corta

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A8. Continuación.....

GRUPO DE COLOR	COLOR			CÓDIGOS	
	Caracterización Macroscópica			Caracterización Microscópica	
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	Pigmento Difusible	Códigos	Forma de la Cadena
6	Verde glacial	Amarillo piel	-	AR006, HA007, FR015, HA006	Incompleta
7	Verde glacial	Marrón	-	AL001	Recta corta
8	Café	Capuchino	-	AL002, HA016	Incompleta
9	Marfil	Melocotón	Melocotón	AL017, AL013, AL004, AL003	No determinada
10	Verde glacial	Melocotón	-	AR004, HA010, HA011, AR009, FR007, CH005	Recta corta
11	Verde veronese	Verde bandera	Verde	CH003, AR007	Recta corta

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A8. Continuación.....

GRUPO DE COLOR	COLOR			CÓDIGOS	
	Caracterización Macroscópica			Caracterización Microscópica	
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	Pigmento Difusible	Códigos	Forma de la Cadena
12	Verde glacial	Salmón	-	FR002, FR016, HA004, HA013	Recta larga
13	Lavanda	Cobre	-	AR005, AR003	Incompleta
14	Blanco	Ocre oro	-	FR017, HA001	Incompleta
15	Lavanda	Capuchino	-	HA014, FR013	Incompleta
16	Azul turquesa	Capuchino	Azul	AR017, AR018, FR009, FR010	Recta corta
17	Verde metálico	Salmón	-	AL020, CH004	Recta corta

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A8. Continuación.....

GRUPO DE COLOR	COLOR			CÓDIGOS	
Caracterización Macroscópica					Caracterización Microscópica
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	Pigmento Difusible	Códigos	Forma de la Cadena
18	Azul turquesa	Sienna natural	Azul	FR005, FR004	Espiral
19	Lavanda	Violeta	Violeta	AL016	Incompleta
20	Cobre glitter	Marrón	-	AL005	Recta corta
21	Melocotón	Ocre oro	-	HA018	Recta corta
22	Blanco	Salmón	-	FR003, HA019, HA012, AR001, FR008, AR013, AR015, AR014, AL014, HA008, CH002, HA015	Recta larga

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A8. Continuación.....

GRUPO DE COLOR	COLOR	CÓDIGOS			
Caracterización Macroscópica					Caracterización Microscópica
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	Pigmento Difusible	Códigos	Forma de la Cadena
23	Lila	Azul invierno	Azul	AL015	Recta larga
24	Cobre glitter	Capuchino	-	AR011, AR010	Incompleta
25	Marfil	Verde pino	Verde	AL019	Espiral
26	Sienna natural	Capuchino	-	AL011	Recta larga
27	Rosa	Coral	-	HA002	Recta corta
28	Verde pistache	Verde gramo	Verde	AR016	Recta corta
29	Melocotón	Amarillo piel	-	FR006	No determinada
30	Plata metálico	Capuchino	-	FR014	Recta larga

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A8. Continuación.....

GRUPO DE COLOR	COLOR			CÓDIGOS	
	Caracterización Macroscópica				Caracterización Microscópica
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	Pigmento Difusible	Códigos	Forma de la Cadena
31	Marfil	Naranja	Salmón	AL010	Fragmentada
32	Cobre metálico	Capuchino	-	FR018	No determinada
33	Blanco	Amarillo piel	-	HA017	Recta larga
34	Verde pistache	Capuchino	-	AL008	Recta larga
35	Verde glacial	Capuchino	-	FR021	Incompleta
36	Cristal	Melocotón	-	HA003	Recta corta
37	Blanco	Capuchino	-	AL006	Fragmentada
38	Plata metálico	Amarillo piel	-	CH001	Recta corta
39	Incoloro	Amarillo piel	-	HA009	No determinada

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A8. Continuación.....

GRUPO DE COLOR	COLOR			CÓDIGOS	
	Caracterización Macroscópica				Caracterización Microscópica
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	Pigmento Difusible	Códigos	Forma de la Cadena
40	Verde glacial	Capuchino	-	FR020, FR019	Recta corta
41	Marfil	Sienna natural	-	AL012	Recta larga

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A9. Distribución de cultivos de actinomicetes para cada grupo de color por tipo de leguminosa.

GRUPO DE COLOR	TIPO DE LEGUMINOSA					TOTAL
	Alfalfa	Arveja	Chocho	Fréjol	Haba	
1	1	2	0	2	1	6
2	0	1	2	0	0	3
3	0	0	1	0	0	1

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A9. Continuación.....

GRUPO DE COLOR	TIPO DE LEGUMINOSA					TOTAL
	Alfalfa	Arveja	Chocho	Fréjol	Haba	
4	0	0	0	1	0	1
5	2	0	0	0	0	2
6	0	1	0	1	2	4
7	1	0	0	0	0	1
8	1	0	0	0	1	2
9	4	0	0	0	0	4
10	0	2	1	1	2	6
11	0	1	1	0	0	2
12	0	0	0	2	2	4
13	0	2	0	0	0	2
14	0	0	0	1	1	2
15	0	0	0	1	1	2
16	0	2	0	2	0	4
17	1	0	1	0	0	2
18	0	0	0	2	0	2
19	1	0	0	0	0	1

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A9. Continuación.....

GRUPO DE COLOR	TIPO DE LEGUMINOSA					TOTAL
	Alfalfa	Arveja	Chocho	Fréjol	Haba	
20	1	0	0	0	0	1
21	0	0	0	0	1	1
22	1	4	1	2	4	12
23	1	0	0	0	0	1
24	0	2	0	0	0	2
25	1	0	0	0	0	1
26	1	0	0	0	0	1
27	0	0	0	0	1	1
28	0	1	0	0	0	1
29	0	0	0	1	0	1
30	0	0	0	1	0	1
31	1	0	0	0	0	1
32	0	0	0	1	0	1
33	0	0	0	0	1	1
34	1	0	0	0	0	1
35	0	0	0	1	0	1

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A9. Continuación.....

GRUPO DE COLOR	TIPO DE LEGUMINOSA					TOTAL
	Alfalfa	Arveja	Chocho	Fréjol	Haba	
36	0	0	0	0	1	1
37	1	0	0	0	0	1
38	0	0	1	0	0	1
39	0	0	0	0	1	1
40	0	0	0	2	0	2
41	1	0	0	0	0	1

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A10. Distribución de grupos de color de cultivos de actinomicetes por tipo de leguminosas.

TIPO DE LEGUMINOSA	NÚMERO DE GRUPOS	NÚMERO DE GRUPOS
Alfalfa	1, 5, 7, 8, 9, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 31, 34, 37 41	16
Arveja	1, 2, 6, 10, 11, 13, 16, 22, 24, 28	10
Chocho	2, 3, 10, 11, 17, 22, 38	7
Fréjol	1, 4, 6, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 22, 29, 30, 32, 35, 40	15
Haba	1, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 21, 22, 27, 33, 36, 39	13

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A11. Caracterización Microscópica: Forma de la cadena de esporas de acuerdo al tipo de leguminosa.

FORMA DE LA CADENA						Total
	Alfalfa	Arveja	Chocho	Fréjol	Haba	
Rectas cortas	5	6	4	5	5	25
Rectas largas	5	4	2	5	7	23
Espiral	1	0	0	2	0	3
Fragmentadas	2	0	0	0	0	2
Incompletas	3	8	2	6	6	25
No determinadas	4	0	0	3	1	8

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A12. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH.

CÓDIGO	pH							CLASIFICACIÓN
	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	
AL001	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AL002	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AL003	0	0	1	1	1	1	0	Alcalitolerante
AL004	0	0	0	1	1	1	0	Alcalitolerante
AL005	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AL006	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A12. Continuación.....

CÓDIGO	pH							CLASIFICACIÓN
	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	
AL007	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
AL008	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AL009	0	0	1	1	1	0	0	Neutrófilo
AL010	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AL011	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AL012	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AL013	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
AL014	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AL015	0	0	0	1	0	0	0	Neutrófilo
AL016	0	0	1	1	1	1	0	Alcalitolerante
AL017	0	0	1	1	1	1	0	Alcalitolerante
AL018	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
AL019	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AL020	0	0	0	1	1	0	0	Neutrófilo
AR001	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AR002	0	0	1	1	1	1	0	Alcalitolerante
AR003	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A12. Continuación.....

CÓDIGO	pH							CLASIFICACIÓN
	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	
AR004	0	0	1	1	1	1	0	Alcalitolerante
AR005	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AR006	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AR007	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AR008	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AR009	0	0	0	1	1	0	0	Neutrófilo
AR010	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
AR011	1	1	1	0	0	0	0	Acidófilo
AR012	0	0	1	1	1	0	0	Neutrófilo
AR013	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AR014	0	0	0	0	1	1	1	Alcalófilo
AR015	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
AR016	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
AR017	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
AR018	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
CH001	0	0	1	1	1	1	0	Alcalitolerante
CH002	0	0	1	1	1	0	0	Neutrófilo

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A12. Continuación.....

CÓDIGO	pH							CLASIFICACIÓN
	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	
CH003	0	0	0	1	1	1	0	Alcalitolerante
CH004	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
CH005	0	0	1	1	1	0	0	Neutrófilo
CH006	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
CH007	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
CH008	1	1	1	0	0	0	0	Acidófilo
FR001	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
FR002	0	0	1	1	1	0	0	Neutrófilo
FR003	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
FR004	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
FR005	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
FR006	0	0	0	1	1	1	0	Alcalitolerante
FR007	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
FR008	0	0	1	1	1	1	0	Alcalitolerante
FR009	0	0	0	1	1	0	0	Neutrófilo
FR010	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
FR011	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A12. Continuación.....

CÓDIGO	pH							CLASIFICACIÓN
	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	
FR012	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
FR013	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
FR014	1	1	1	0	0	0	0	Acidófilo
FR015	1	1	1	0	0	0	0	Acidófilo
FR016	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
FR017	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
FR018	1	1	1	0	0	0	0	Acidófilo
FR019	0	0	1	1	1	0	0	Neutrófilo
FR020	1	1	1	0	0	0	0	Acidófilo
FR021	0	0	1	1	1	0	0	Neutrófilo
HA001	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
HA002	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
HA003	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
HA004	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
HA005	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
HA006	0	0	0	1	0	0	0	Neutrófilo
HA007	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A12. Continuación.....

CÓDIGO	pH							CLASIFICACIÓN
	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	
HA008	0	0	0	1	1	1	0	Alcalitolerante
HA009	0	0	1	1	1	1	0	Alcalitolerante
HA010	0	0	0	0	1	1	1	Alcalófilo
HA011	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
HA012	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
HA013	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
HA014	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
HA015	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
HA016	0	0	1	1	1	1	0	Alcalitolerante
HA017	0	0	1	1	1	1	0	Alcalitolerante
HA018	1	1	1	1	0	0	0	Neutrotolerante
HA019	1	1	1	1	1	0	0	Neutrotolerante

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A13. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo y del tipo de leguminosa.

TIPO DE LEGUMINOSA						
	Alfalfa	Arveja	Chocho	Fréjol	Haba	TOTAL
Acidófilos	0	1	1	4	0	6
Neutrotolerantes	13	12	3	11	13	52
Neutrófilos	3	2	2	4	1	12
Alcalitolerantes	4	2	2	2	4	14
Alcalófilos	0	1	0	0	1	2

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A14. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.

CÓDIGO	Temperatura de Incubación				CLASIFICACIÓN
	4°C	26°C	37°C	50°C	
AL001	0	1	1	0	Mesófilo
AL002	0	1	1	0	Mesófilo
AL003	1	1	1	1	Mesófilo extremo
AL004	1	1	1	1	Mesófilo extremo
AL005	1	1	1	1	Mesófilo extremo
AL006	0	1	1	0	Mesófilo

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A14. Continuación.....

CÓDIGO	Temperatura de Incubación				CLASIFICACIÓN
	4°C	26°C	37°C	50°C	
AL007	1	1	0	0	Psicrótrofo
AL008	1	1	1	1	Mesófilo extremo
AL009	0	1	1	0	Mesófilo
AL010	1	1	1	1	Mesófilo extremo
AL011	0	1	1	0	Mesófilo
AL012	0	1	1	0	Mesófilo
AL013	1	1	1	0	Mesófilo
AL014	1	1	0	0	Psicrótrofo
AL015	1	1	1	0	Mesófilo
AL016	0	1	1	0	Mesófilo
AL017	1	1	1	0	Mesófilo
AL018	1	1	0	0	Psicrótrofo
AL019	1	1	0	0	Psicrótrofo
AL020	0	1	1	0	Mesófilo
AR001	0	1	1	0	Mesófilo
AR002	1	1	0	0	Psicrótrofo
AR003	0	1	1	0	Mesófilo

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A14. Continuación.....

CÓDIGO	Temperatura de Incubación				CLASIFICACIÓN
	4°C	26°C	37°C	50°C	
AR004	0	1	1	0	Mesófilo
AR005	0	1	1	0	Mesófilo
AR006	1	1	1	1	Mesófilo extremo
AR007	1	1	1	0	Mesófilo
AR008	1	1	1	0	Mesófilo
AR009	1	1	1	0	Mesófilo
AR010	0	1	1	0	Mesófilo
AR011	1	1	1	0	Mesófilo
AR012	1	1	1	1	Mesófilo extremo
AR013	1	1	1	0	Mesófilo
AR014	1	1	1	0	Mesófilo
AR015	1	1	1	0	Mesófilo
AR016	1	1	1	1	Mesófilo extremo
AR017	0	1	1	0	Mesófilo
AR018	1	1	1	1	Mesófilo extremo
CH001	0	1	1	0	Mesófilo
CH002	1	1	1	0	Mesófilo

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A14. Continuación.....

CÓDIGO	Temperatura de Incubación				CLASIFICACIÓN
	4°C	26°C	37°C	50°C	
CH003	0	1	1	0	Mesófilo
CH004	1	1	0	0	Psicrótrofo
CH005	0	1	1	0	Mesófilo
CH006	0	1	1	0	Mesófilo
CH007	0	1	1	0	Mesófilo
CH008	1	1	1	0	Mesófilo
FR001	0	1	1	0	Mesófilo
FR002	0	1	1	0	Mesófilo
FR003	0	1	1	0	Mesófilo
FR004	1	1	1	0	Mesófilo
FR005	1	1	0	0	Psicrótrofo
FR006	0	1	1	0	Mesófilo
FR007	1	1	0	0	Psicrótrofo
FR008	1	1	1	0	Mesófilo
FR009	0	1	1	0	Mesófilo
FR010	0	1	1	0	Mesófilo
FR011	0	1	1	0	Mesófilo

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A14. Continuación.....

CÓDIGO	Temperatura de Incubación				CLASIFICACIÓN
	4°C	26°C	37°C	50°C	
FR012	1	1	0	0	Psicrótrofo
FR013	1	1	1	1	Mesófilo extremo
FR014	0	1	1	0	Mesófilo
FR015	0	1	1	0	Mesófilo
FR016	0	1	1	0	Mesófilo
FR017	1	1	1	0	Mesófilo
FR018	0	1	1	0	Mesófilo
FR019	1	1	0	0	Psicrótrofo
FR020	1	1	1	1	Mesófilo extremo
FR021	0	1	1	0	Mesófilo
HA001	1	1	1	0	Mesófilo
HA002	0	1	1	0	Mesófilo
HA003	0	1	1	0	Mesófilo
HA004	0	1	1	0	Mesófilo
HA005	1	1	1	0	Mesófilo
HA006	1	1	1	0	Mesófilo
HA007	1	1	1	0	Mesófilo

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A14. Continuación.....

CÓDIGO	Temperatura de Incubación				CLASIFICACIÓN
	4°C	26°C	37°C	50°C	
HA008	1	1	1	0	Mesófilo
HA009	1	1	1	0	Mesófilo
HA010	0	1	1	0	Mesófilo
HA011	1	1	1	0	Mesófilo
HA012	0	1	1	0	Mesófilo
HA013	0	1	1	0	Mesófilo
HA014	1	1	0	0	Psicrótrofo
HA015	1	1	0	0	Psicrótrofo
HA016	1	1	0	0	Psicrótrofo
HA017	1	1	0	0	Psicrótrofo
HA018	1	1	1	1	Mesófilo extremo
HA019	1	1	1	0	Mesófilo

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A15. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura y al tipo de leguminosa.

TIPO DE LEGUMINOSA						
	Alfalfa	Arveja	Chocho	Fréjol	Haba	TOTAL
Mesófilo extremo	5	4	0	2	1	12
Mesófilo	11	13	7	15	14	60
Psicrótrofo	4	1	1	4	4	14
Psicrófilo	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A16. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl.

CÓDIGO	Concentración de NaCl				CLASIFICACIÓN
	1%	5%	10%	15%	
AL001	1	1	1	0	Halófilo
AL002	1	1	1	0	Halófilo
AL003	1	1	0	0	Halófilo débil
AL004	1	1	0	0	Halófilo débil
AL005	1	1	0	0	Halófilo débil
AL006	1	1	1	0	Halófilo
AL007	1	1	1	1	Halófilo extremo

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A16. Continuación.....

CÓDIGO	Concentración de NaCl				CLASIFICACIÓN
	1%	5%	10%	15%	
AL008	1	1	1	1	Halófilo extremo
AL009	1	1	1	1	Halófilo extremo
AL010	1	1	1	1	Halófilo extremo
AL011	1	1	1	0	Halófilo
AL012	1	1	1	0	Halófilo
AL013	1	1	1	1	Halófilo extremo
AL014	1	1	1	0	Halófilo
AL015	1	1	1	0	Halófilo
AL016	1	1	0	0	Halófilo débil
AL017	1	1	0	0	Halófilo débil
AL018	1	1	0	0	Halófilo débil
AL019	1	1	1	1	Halófilo extremo
AL020	1	1	1	0	Halófilo
AR001	1	1	0	0	Halófilo débil
AR002	1	1	0	0	Halófilo débil
AR003	1	1	0	0	Halófilo débil
AR004	1	1	0	0	Halófilo débil

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A16. Continuación.....

CÓDIGO	Concentración de NaCl				CLASIFICACIÓN
	1%	5%	10%	15%	
AR005	1	1	1	0	Halófilo
AR006	1	1	1	0	Halófilo
AR007	1	1	1	1	Halófilo extremo
AR008	1	1	1	0	Halófilo
AR009	1	1	0	0	Halófilo débil
AR010	1	1	1	0	Halófilo
AR011	1	1	1	0	Halófilo
AR012	1	1	0	0	Halófilo débil
AR013	1	1	1	0	Halófilo
AR014	1	1	1	1	Halófilo extremo
AR015	1	1	0	0	Halófilo débil
AR016	1	1	1	0	Halófilo
AR017	1	1	1	0	Halófilo
AR018	1	1	1	0	Halófilo
CH001	1	1	1	1	Halófilo extremo
CH002	1	1	1	1	Halófilo extremo
CH003	1	1	0	0	Halófilo débil

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A16. Continuación.....

CÓDIGO	Concentración de NaCl				CLASIFICACIÓN
	1%	5%	10%	15%	
CH004	1	1	0	0	Halófilo débil
CH005	1	1	1	0	Halófilo
CH006	0	1	1	1	Halófilo extremo
CH007	0	1	1	1	Halófilo extremo
CH008	1	1	1	0	Halófilo
FR001	1	1	1	1	Halófilo extremo
FR002	1	1	1	0	Halófilo
FR003	1	1	1	0	Halófilo
FR004	1	1	1	0	Halófilo
FR005	1	1	1	0	Halófilo
FR006	1	1	1	1	Halófilo extremo
FR007	1	1	1	0	Halófilo
FR008	1	0	0	0	No halófilo
FR009	0	1	1	1	Halófilo extremo
FR010	1	1	1	1	Halófilo extremo
FR011	0	1	1	1	Halófilo extremo
FR012	1	1	1	0	Halófilo

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A16. Continuación.....

CÓDIGO	Concentración de NaCl				CLASIFICACIÓN
	1%	5%	10%	15%	
FR013	1	1	0	0	Halófilo débil
FR014	0	1	1	1	Halófilo extremo
FR015	0	1	1	1	Halófilo extremo
FR016	1	1	1	0	Halófilo
FR017	1	1	1	1	Halófilo extremo
FR018	1	1	1	0	Halófilo
FR019	0	1	1	1	Halófilo extremo
FR020	1	1	1	1	Halófilo extremo
FR021	1	1	1	0	Halófilo
HA001	0	1	1	1	Halófilo extremo
HA002	0	1	1	0	Halófilo
HA003	1	1	0	0	Halófilo débil
HA004	1	1	0	0	Halófilo débil
HA005	1	1	1	0	Halófilo
HA006	1	1	1	0	Halófilo
HA007	1	1	1	0	Halófilo
HA008	0	1	1	0	Halófilo

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A16. Continuación.....

CÓDIGO	Concentración de NaCl				CLASIFICACIÓN
	1%	5%	10%	15%	
HA009	0	1	1	0	Halófilo
HA010	1	1	1	0	Halófilo
HA011	0	1	1	0	Halófilo
HA012	1	1	1	0	Halófilo
HA013	1	1	0	0	Halófilo débil
HA014	1	1	1	0	Halófilo
HA015	0	1	1	1	Halófilo extremo
HA016	1	1	0	0	Halófilo débil
HA017	1	1	1	1	Halófilo extremo
HA018	1	1	1	0	Halófilo
HA019	1	1	1	1	Halófilo extremo

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A17. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo y tipos de leguminosas.

TIPO DE LEGUMINOSA						
	Alfalfa	Arveja	Chocho	Fréjol	Haba	TOTAL
No halófilo	0	0	0	1	0	1
Halófilo débil	6	7	2	1	4	20
Halófilo	8	9	2	9	11	39
Halófilo extremo	6	2	4	10	4	26

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A18. Determinación de la solubilización de carbonato de calcio (CaCO_3) en cultivos de actinomicetes mediante pruebas fisiológicas de temperatura.

CÓDIGO	Solubilización de Carbonato de Calcio – Pruebas de Temperatura	
	4°C	37°C
AL001	0	1
AL002	0	0
AL003	0	0
AL004	0	0
AL005	0	0
AL006	0	0

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A18. Continuación.....

CÓDIGO	Solubilización de Carbonato de Calcio – Pruebas de Temperatura	
	4°C	37°C
AL007	0	0
AL008	0	0
AL009	0	0
AL010	1	1
AL011	0	0
AL012	0	0
AL013	0	1
AL014	0	1
AL015	0	1
AL016	0	1
AL017	0	1
AL018	0	1
AL019	1	0
AL020	0	0
AR001	0	1
AR002	0	1

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A18. Continuación.....

CÓDIGO	Solubilización de Carbonato de Calcio – Pruebas de Temperatura	
	4°C	37°C
AR003	0	1
AR004	0	1
AR005	0	1
AR006	0	1
AR007	0	1
AR008	0	1
AR009	0	1
AR010	0	0
AR011	0	0
AR012	0	1
AR013	0	0
AR014	0	0
AR015	0	0
AR016	0	1
AR017	0	1
AR018	0	1

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A18. Continuación.....

CÓDIGO	Solubilización de Carbonato de Calcio – Pruebas de Temperatura	
	4°C	37°C
CH001	0	1
CH002	0	0
CH003	0	0
CH004	0	0
CH005	0	1
CH006	0	0
CH007	0	1
CH008	0	0
FR001	0	0
FR002	0	1
FR003	0	1
FR004	1	0
FR005	0	0
FR006	0	0
FR007	0	0
FR008	0	1

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A18. Continuación.....

CÓDIGO	Solubilización de Carbonato de Calcio – Pruebas de Temperatura	
	4°C	37°C
FR009	0	1
FR010	0	1
FR011	0	1
FR012	0	0
FR013	0	1
FR014	0	1
FR015	0	1
FR016	0	1
FR017	0	0
FR018	0	0
FR019	1	0
FR020	0	0
FR021	0	0
HA001	0	1
HA002	0	1
HA003	0	0

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A18. Continuación.....

CÓDIGO	Solubilización de Carbonato de Calcio – Pruebas de Temperatura	
	4°C	37°C
HA004	0	1
HA005	1	1
HA006	0	1
HA007	0	1
HA008	0	1
HA009	0	0
HA010	0	1
HA011	0	1
HA012	0	1
HA013	0	1
HA014	0	0
HA015	1	0
HA016	0	1
HA017	0	0
HA018	0	1
HA019	0	1

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A19. Determinación de la solubilización de carbonato de calcio (CaCO_3) en cultivos de actinomicetes mediante pruebas fisiológicas de temperatura por tipo de leguminosa.

TIPO DE LEGUMINOSA						
	Alfalfa	Arveja	Chocho	Fréjol	Haba	TOTAL
4°C	2	0	0	2	2	6
37°C	8	13	3	10	14	48

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A20. Determinación del número de cultivos de actinomicetes solubilizadores y no solubilizadores de carbonato de calcio (CaCO_3).

CULTIVOS	NÚMERO DE CULTIVOS
Solubilizadores de CaCO_3	54
No Solubilizadores de CaCO_3	32

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A21. Caracterización fisicoquímica de los suelos de la rizósfera de las leguminosas.

LEGUMINOSA	HUMEDAD (%)	MATERIA ORGÁNICA (%)	pH
Alfalfa	5.01	5.33	6.0
Arveja	4.10	1.33	6.6
Chocho	4.72	1.33	7.5
Fréjol	7.19	6.56	5.9
Haba	5.51	6.33	7.0

Fuente: “Búsqueda de Actinomicetes Productores de Antibióticos”, 2009.

Tabla A22. Número de miembros y grupos – especies basados en el 90% de similaridad a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes purificados.

GRUPO ESPECIE	MIEMBROS DEL GRUPO	NÚMERO DE MIEMBROS
1	AL001, HA012, AR001, HA004, HA013, FR003, FR016, HA019	8
2	AR003, AR005	2
3	AL014, AR013, AR015, CH004, HA015	5
4	AL007, FR001	2

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A22. Continuación.....

GRUPO ESPECIE	MIEMBROS DEL GRUPO	NÚMERO DE MIEMBROS
5	AL013	1
6	CH006, CH007, FR017, HA001	4
7	AL002, AR011, HA014, AR018, FR013	5
8	FR005, FR007	2
9	AL006, AL011, AR010, FR018, AL012, CH008	6
10	FR014	1
11	AL008, FR020	2
12	AL005, AR016, HA018	3
13	AR007	1
14	AR017, FR010, HA002	3
15	HA003	1
16	AL018, AR002, AR008, FR012, HA005	5
17	AR006, HA011, HA006, HA007	4
18	FR011, FR015	2
19	AL010	1

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Tabla A22. Continuación.....

GRUPO ESPECIE	MIEMBROS DEL GRUPO	NÚMERO DE MIEMBROS
20	AL019	1
21	FR004	1
22	AL003, AL004, AL017	3
23	AR009, AR012	2
24	AL016	1
25	HA016	1
26	AR004, HA010	2
27	CH005, FR002, FR021	3
28	CH003	1
29	AL009, CH002, HA017, AR014	4
30	AL020, HA008	2
31	FR008	1
32	CH001	1
33	FR006, HA009	2
34	AL015	1
35	FR009	1
36	FR019	1

Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

ANEXO B.

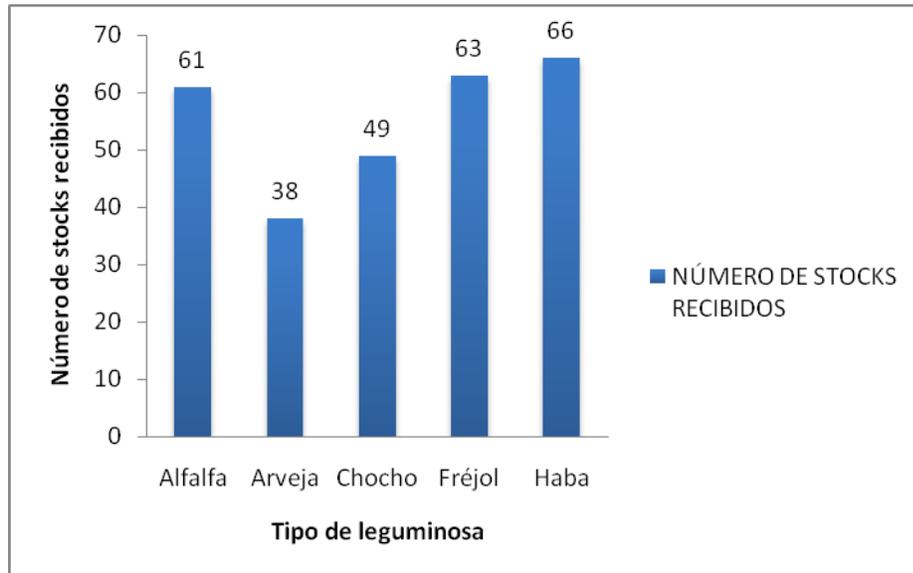
MATRIZ DE CÓDIGO

BINARIO

ANEXO C.

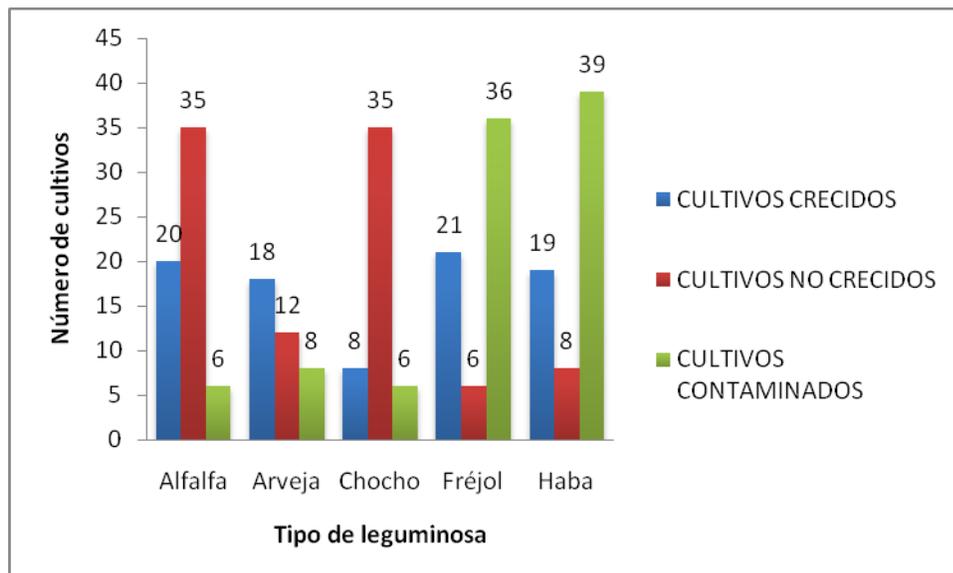
GRÁFICOS

Figura C1. Número de cepas recibidas para cada tipo de leguminosa.



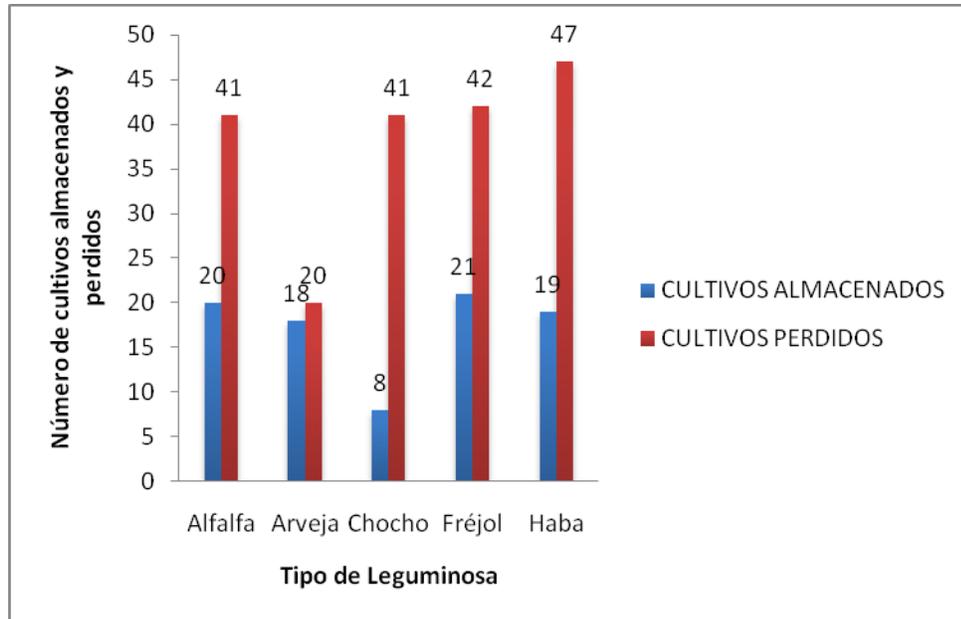
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C2. Número de cultivos crecidos, no crecidos y contaminados para cada tipo de leguminosa.



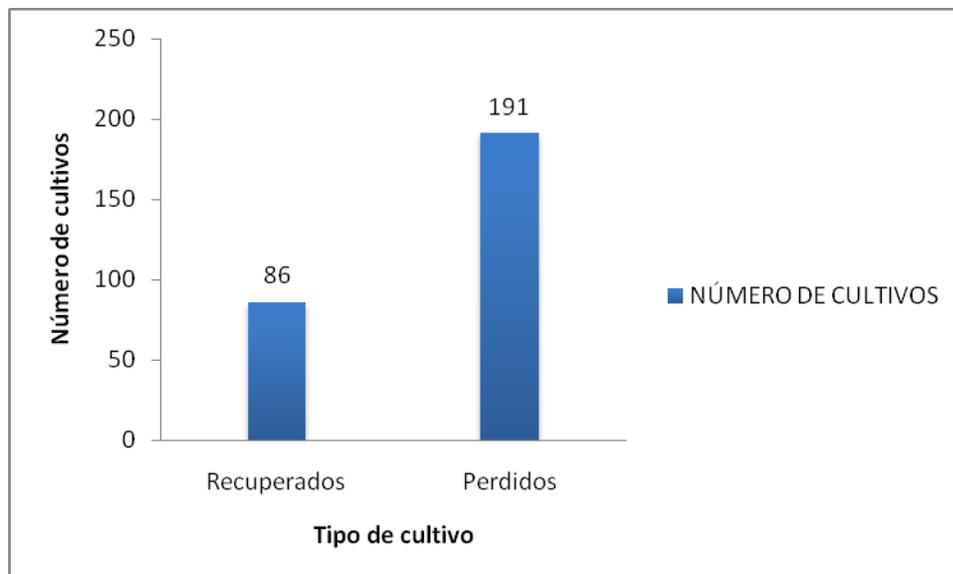
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C3. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados por tipo de leguminosa.



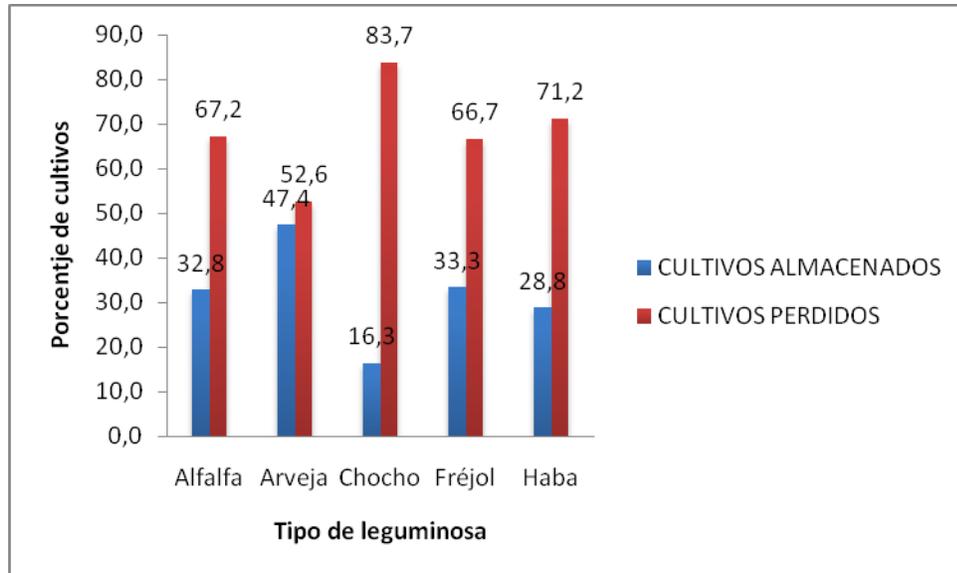
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C4. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados.



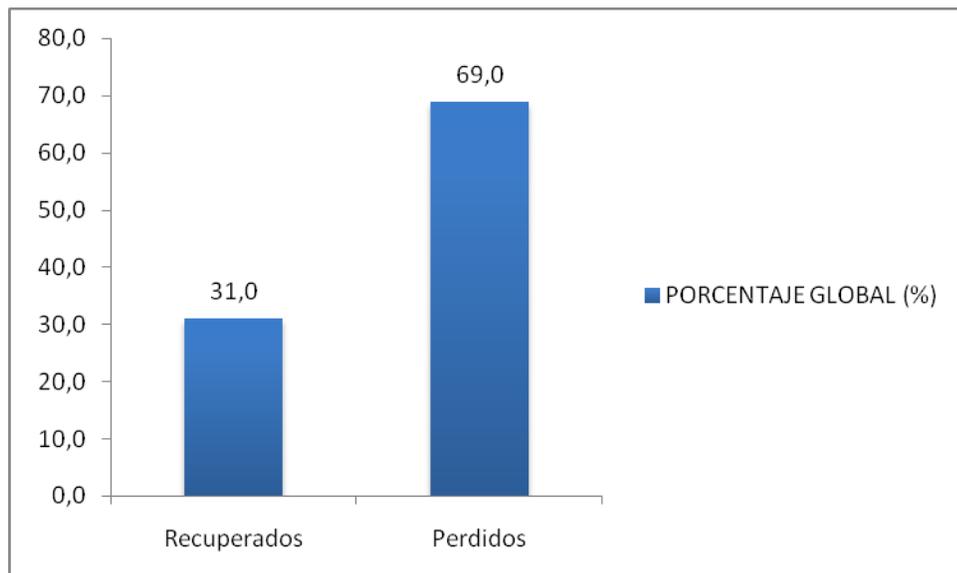
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C5. Porcentaje de cultivos almacenados y de pérdida para cada tipo de leguminosa.



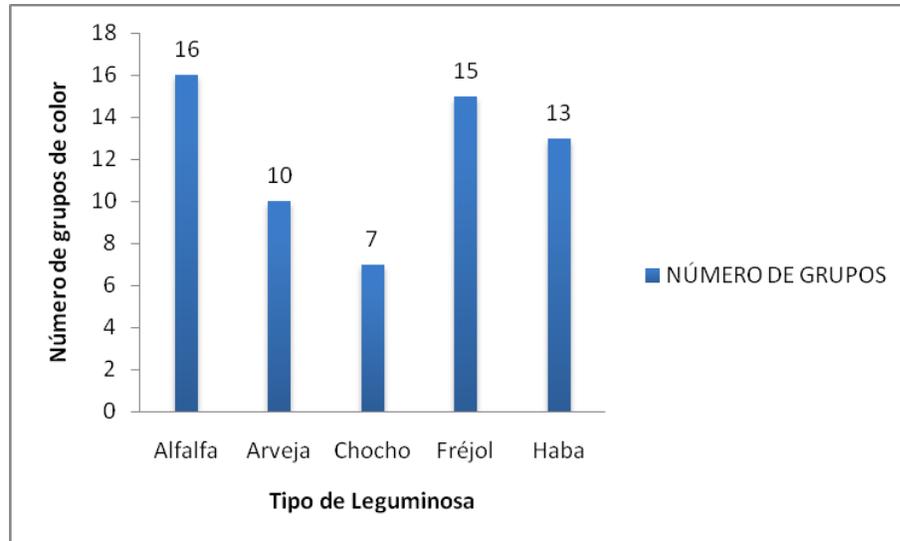
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C6. Porcentajes globales de actinomicetes.



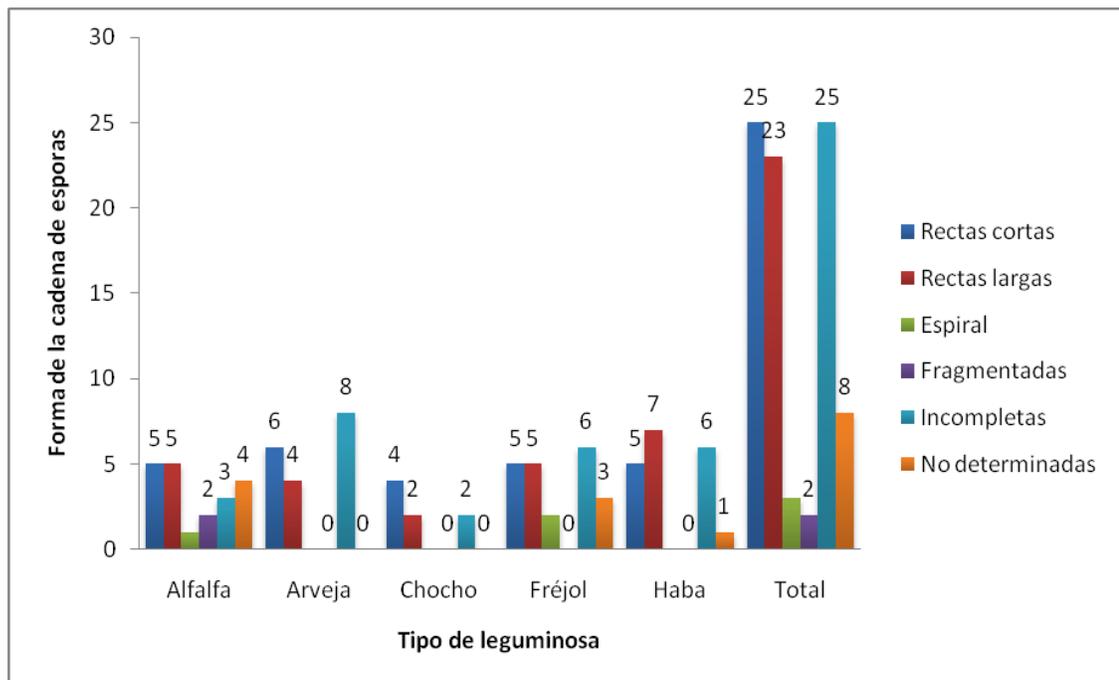
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C7. Distribución de grupos de color de cultivos de actinomicetes por tipo de leguminosas.



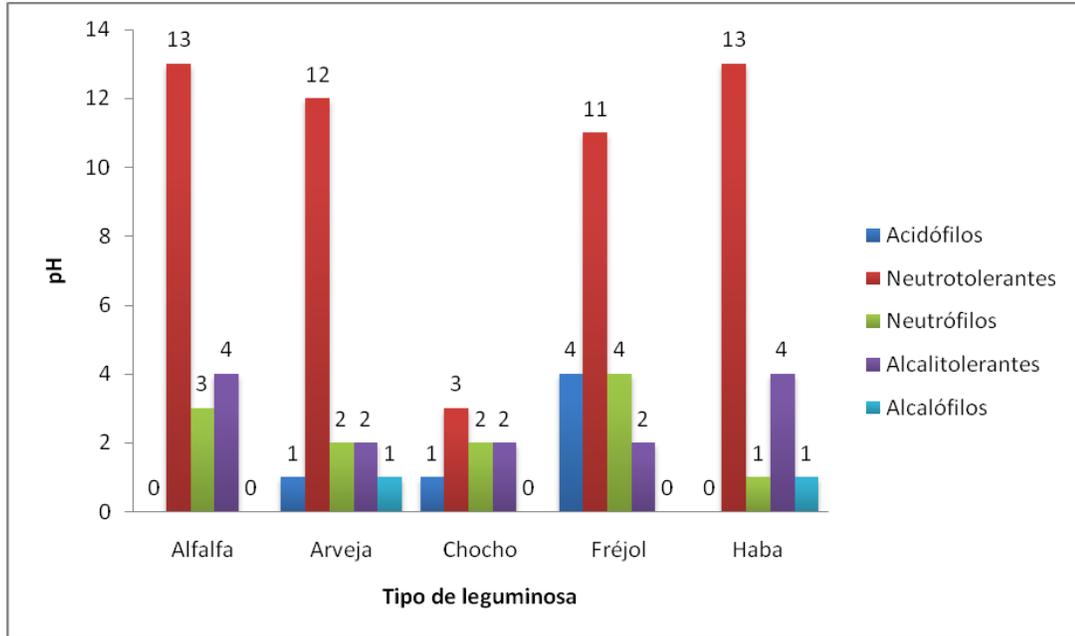
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C8. Caracterización microscópica: Forma de la cadena de esporas de acuerdo al tipo de leguminosa.



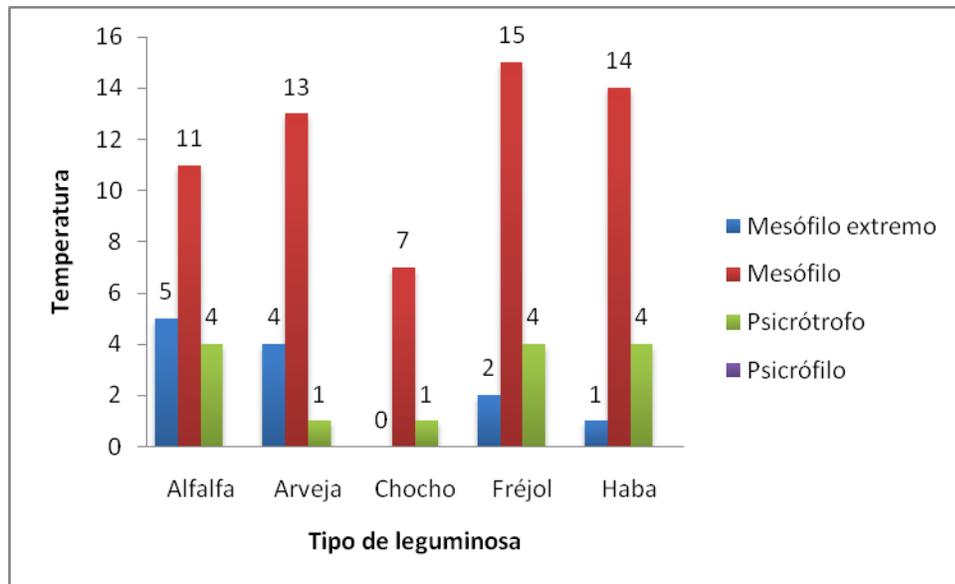
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C9. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo y del tipo de leguminosa.



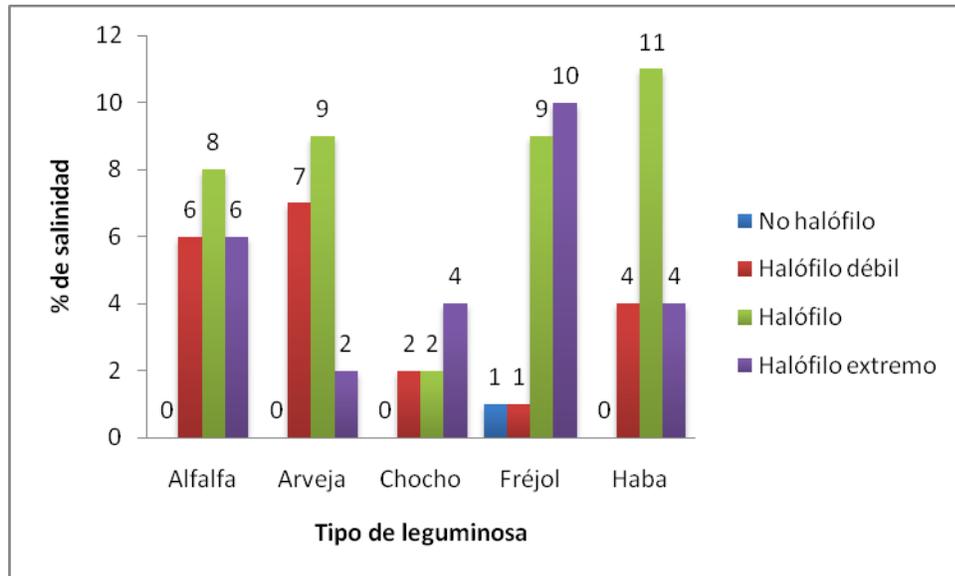
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C10. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura y al tipo de leguminosa.



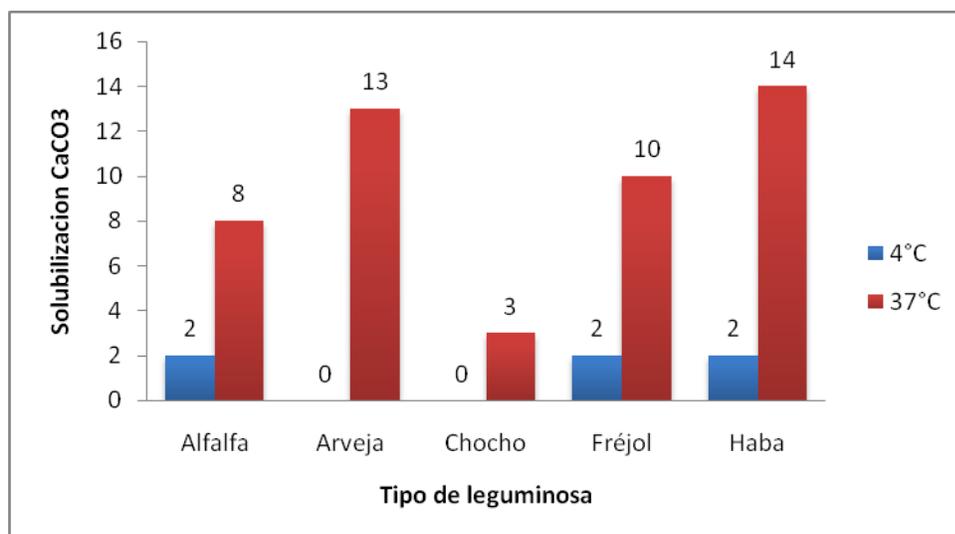
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C11. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo y tipos de leguminosas.



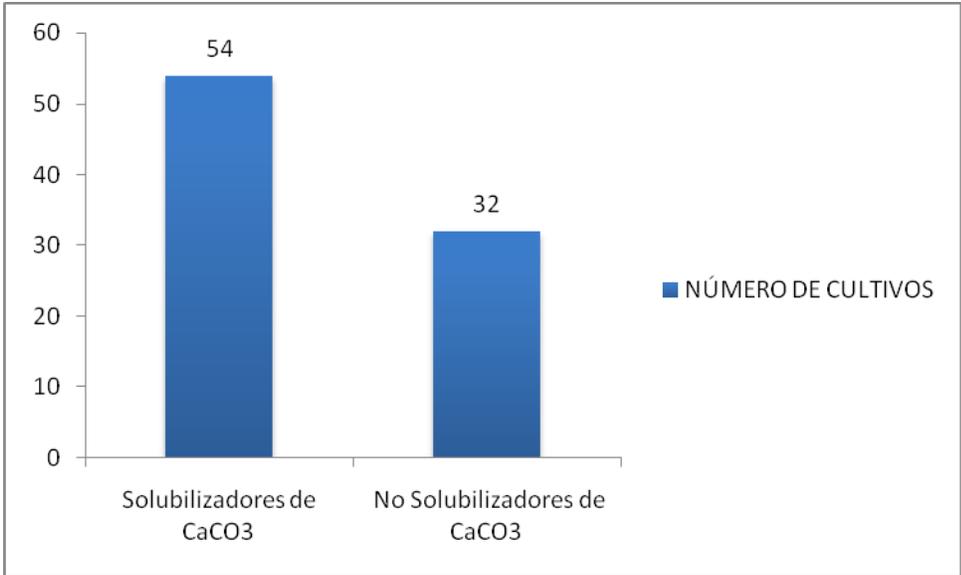
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C12. Determinación de la solubilización de carbonato de calcio (CaCO_3) en cultivos de actinomicetes mediante pruebas fisiológicas de temperatura por tipo de leguminosa.



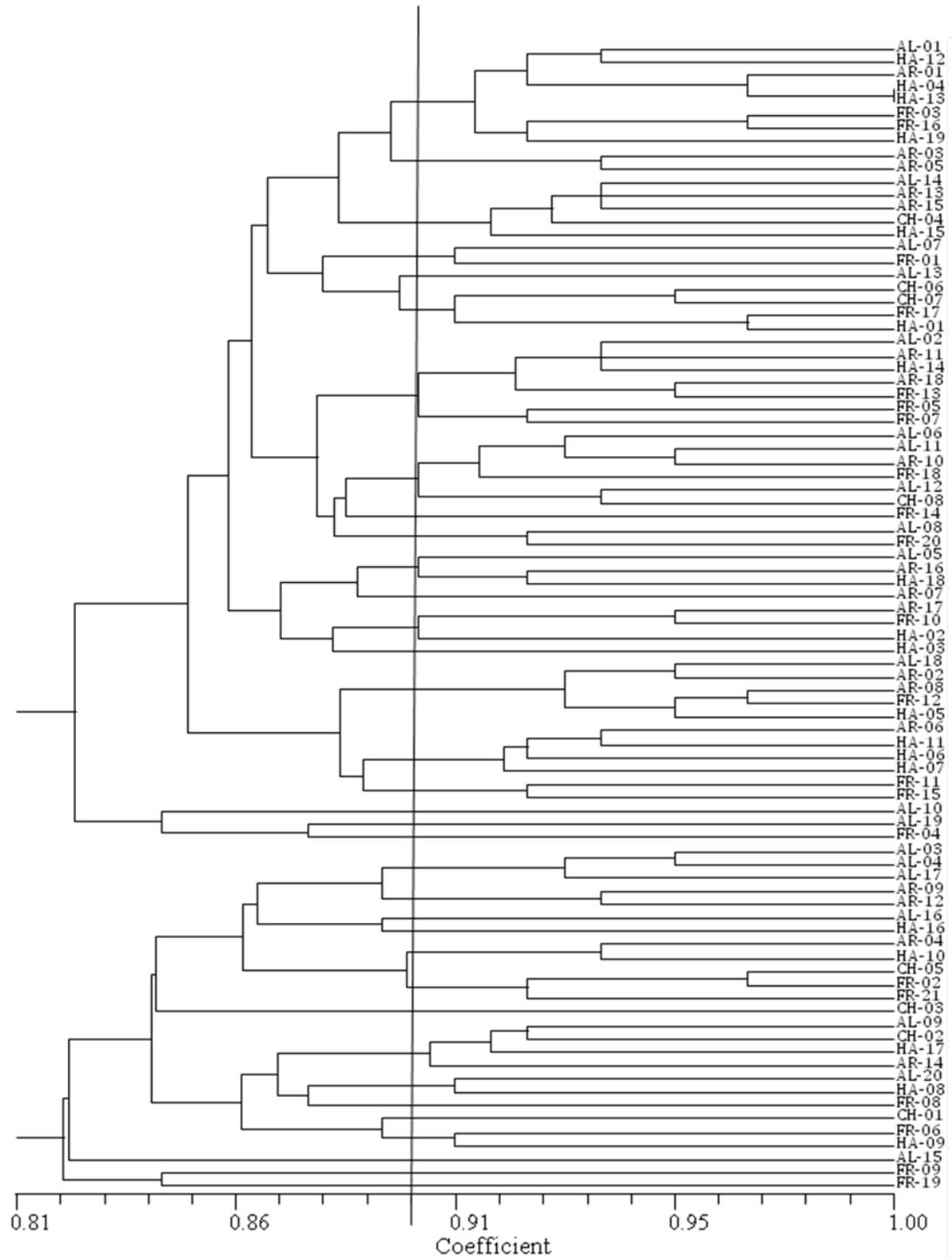
Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C13. Determinación del número de cultivos de actinomicetes solubilizadores y no solubilizadores de carbonato de calcio (CaCO_3).



Elaborado por: Diana Andrade, 2013.

Figura C14. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de las cepas de actinomicetes purificadas en este estudio.



ANEXO D.

MEDIOS DE CULTIVO Y

SOLUCIONES

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR GYM

REACTIVOS	CANTIDAD
Glucosa	4.00 (g)
Extracto de levadura	10.00 (g)
Extracto de malta	10.00 (g)
CaCO ₃	2.00 (g)
Agar	15 (g)
Agua	1000 (ml)

SOLUCIONES BÚFER

Buffer 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 ₂ HPO ₄ (ml)
2.6	89.10	10.90
3.0	79.45	20.55
3.5	69.75	30.25

Continuación.....

pH	0.1 M Ácido Cítrico (ml)	0.2 M Na ₂ HPO ₄ (ml)
4.0	61.45	38.55
4.5	54.57	45.43
5.0	48.50	51.50
5.5	43.13	56.87
6.0	36.85	63.15
6.5	29.04	70.96
7.0	17.65	82.35
7.5	7.62	92.38

Buffer de Hidróxido de Sodio y Ácido Bórico

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

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

Se prepara un volumen final de 100 ml:

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

ANEXO E.

TABLA DE COLORES

Tabla de colores utilizada en la caracterización macroscópica.



Fuente: Laboratorio de Microbiología, FCIAL.

ANEXO F.
FOTOGRAFÍAS

Crecimiento y determinación de pureza de actinomicetes.

Stocks iniciales.



Stocks con cepas aisladas inicialmente año 2009 (izquierda) – Stocks realizados en el presente estudio (derecha).

Cultivos de actinomicetes obtenidos de los stocks iniciales (Estrías simples – difusión en placa).



Cultivo puro

Cultivo sin crecimiento

Cultivo contaminado

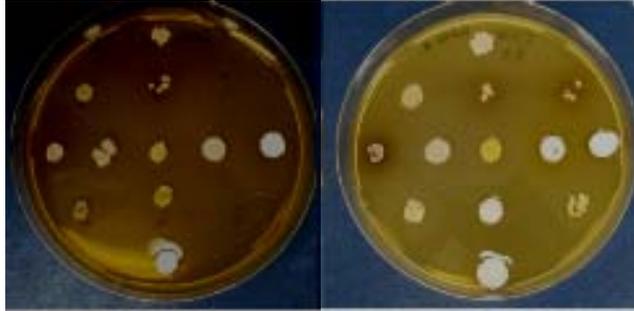
Cultivos de actinomicetes obtenidos en estría compuesta (Repicados).



Estrías compuestas, realizadas con cepas obtenidas de estrías simples.

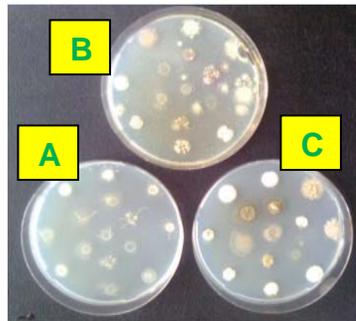
Pruebas fenotípicas:

pH



Crecimiento a pH 4.5 y 5.5

Temperatura, % de Salinidad y Solubilización de CaCO_3



A: Crecimiento: Temperatura 26°C.

B: Crecimiento: % de Salinidad 5%.

C: Solubilización de CaCO_3 a 37°C.

Stocks finales – colección de cepas.



Stocks finales – colección de cultivos (86 cepas de actinomicetes purificadas).