



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



“DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y METABÓLICA DE ACTINOMICETES AISLADOS DE SUELO Y ARENA DE ECOSISTEMAS GLACIARES DE LA ANTÁRTIDA Y DEL NORTE DEL CHIMBORAZO”.

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

Autor: Juan José Villacís Barraqueta.

Tutor: Dr. Carlos Rodríguez. Ph.D.

Ambato - Ecuador

2015

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del trabajo de investigación: “DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y METABÓLICA DE ACTINOMICETES AISLADOS DE SUELO Y ARENA DE ECOSISTEMAS GLACIARES DE LA ANTÁRTIDA Y DEL NORTE DEL CHIMBORAZO”, realizado por el Egdo. Juan José Villacís Barraqueta, certifico que el trabajo fue realizado por la persona indicada. Considero que dicho informe reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Marzo de 2015

Dr. Carlos Rodríguez M.; Ph.D.

TUTOR DE TESIS

AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: “DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y METABÓLICA DE ACTINOMICETES AISLADOS DE SUELO Y ARENA DE ECOSISTEMAS GLACIARES DE LA ANTÁRTIDA Y DEL NORTE DEL CHIMBORAZO”, es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido, efectos legales y académicos que se desprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Ambato, Marzo de 2015

Juan José Villacís Barraqueta

180444634-0

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

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

Ambato, Marzo de 2015

Para constancia firman:

Presidenta Tribunal

xxxxxxx

Miembro del Tribunal

xxxxxxx

Miembro del Tribunal

xxxxxxx

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

A. PÁGINAS PRELIMINARES

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

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
1.2.2. Análisis Crítico	3
1.2.3. Prognosis	3
1.2.4. Formulación del problema	4
1.2.5. Preguntas directrices	4
1.3. Justificación	4
1.4. Objetivos	5
1.4.1. General	5
1.4.2. Específicos	5

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos	6
2.1.1. Ecosistemas Glaciares	6
2.1.2. Actinomicetes psicrófilos	8
2.1.3. Actinomicetes	8
2.1.4. Metabolitos secundarios en Actinomicetes	10
2.1.5. Aislamiento selectivo de Ecosistemas Glaciares	11
2.1.6. Antibióticos	11
2.1.7. Taxonomía numérica	12
2.2. Fundamentación filosófica	14
2.3. Fundamentación legal	15
2.4. Categorías fundamentales	18
2.5. Hipótesis	18
2.5.1. Hipótesis nula	18
2.5.2. Hipótesis alternativa	18
2.6. Señalamiento de variables de la hipótesis	18

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Enfoque	20
3.2. Modalidad básica de la investigación	20
3.3. Nivel o tipo de investigación	20
3.4. Población y muestra	20
3.5. Operacionalización de variables	20
3.6. Plan de recolección de información	20
3.6.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales	20
3.6.2. Aislamiento selectivo de actinomicetes psicrótrofos	22
3.6.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento de actinomicetes	23
3.6.4. Caracterización macroscópica	24

3.6.5. Caracterización microscópica	24
3.6.6. Pruebas fisiológicas de crecimiento	25
3.7. Determinación de la actividad microbiana	27
3.7.1. Preparación de los platos con los microorganismos modelo	27
3.7.2. Instalación del experimento para determinar la capacidad anatagónica	28
3.8. Plan de procesamiento y análisis de la información	28
3.8.1. Diseño experimental	28
3.9. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	31

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de Resultados	35
4.1.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales	35
4.1.2. Aislamiento selectivo de actinomicetes	35
4.1.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento de actinomicetes	36
4.1.4. Caracterización microscópica de los cultivos de actinomicetes	36
4.1.5. Pruebas fisiológicas de crecimiento	37
4.1.6. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	38
4.1.7. Capacidad Antagónica	38
4.2. Interpretación de datos	39
4.2.1. Población y diversidad de actinomicetes	39
4.2.2. Caracterización fenotípica	40
4.2.3. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	41
4.2.4. Capacidad Antagónica	42
4.2.5. Discusión general del trabajo	43
4.3. Verificación de la hipótesis	44
4.3.1. Hipótesis nula (H_0)	44
4.3.2. Hipótesis alternativa (H_1)	44

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	45
5.2. Recomendaciones	45

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos Informativos	47
6.1.1. Título	47
6.1.2. Instituciones ejecutoras	47
6.1.3. Beneficiarios	47
6.1.4. Ubicación	47
6.1.5. Tiempo estimado para la ejecución	47
6.1.6. Equipos técnico responsable	47
6.2. Antecedentes de la propuesta	47
6.3. Justificación	48
6.4. Objetivos	48
6.4.1. General	48
6.4.2. Específicos	48
6.5. Análisis de factibilidad	49
6.6. Fundamentación	49
6.7. Metodología – Modelo operativo	49
6.7.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales	49
6.7.2. Aislamiento selectivo de actinomicetes	50
6.7.3. Pruebas fisiológicas de crecimiento	52
6.7.4. Determinación de la actividad antimicrobiana	53
6.8 Administración	53
6.9. Previsión de la evaluación	54

C. MATERIAL DE REFERENCIA

Bibliografía	56
Anexos	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados y fechas de antibióticos	12
Tabla 2. Tabla de frecuencia de las cuatro posibles combinaciones de las dos variables binarias	13
Tabla 3. Coeficientes de similitud	14
Tabla 4. Categorías Fundamentales	21
Tabla 5. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen.	24
Tabla 6: Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas.	25
Tabla 7. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función del pH del medio.	26
Tabla 8. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.	27
Tabla 9. Tratamientos y combinación de los factores en estudio	29
Tabla 10. Esquema del análisis de varianza.	30
Tabla 11. Esquema del análisis de varianza.	30
Tabla 12. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes.	31
Tabla 13. Administración	54
Tabla 14. Previsión de la evaluación	54

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. DATOS EXPERIMENTALES

- Tabla A1. Origen de muestras de suelo – Arena Antártida 2010.
- Tabla A2. Origen de muestras de suelo – Suelo Antártida 2010.
- Tabla A3. Origen de muestras de suelo – Arena Antártida 2011.
- Tabla A4. Origen de muestras de suelo – Suelo Antártida 2011.
- Tabla A5. Origen de muestras de suelo – Arena Antártida 2012.
- Tabla A6. Origen de muestras de suelo – Suelo Antártida 2012.
- Tabla A7. Origen de muestras de suelo – Suelo Chimborazo (Altura 1).
- Tabla A8. Origen de muestras de suelo – Suelo Chimborazo (Altura 2).
- Tabla A9. Características físico-químicas de las muestras medioambientales.
- Tabla A10. Número de colonias de actinomicetes obtenidos de los platos de aislamiento selectivo.
- Tabla A11. Número de ufc/gramo de suelo seco.
- Tabla A12. Codificación de cultivos de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo.
- Tabla A13. Caracterización microscópica de actinomicetes aislados.
- Tabla A14. Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura.
- Tabla A15. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de acuerdo al origen de las muestras.
- Tabla A16. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de acuerdo al medio de cultivo de aislamiento.
- Tabla A17. Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.
- Tabla A18. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo de acuerdo al origen de las muestras.
- Tabla A19. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo de acuerdo al medio de aislamiento.

Tabla A20. Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

Tabla A21. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo de acuerdo al origen de las muestras.

Tabla A22. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo de acuerdo al medio de aislamiento.

Tabla A23. Grupos – especies basados en el 90% de similitud a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes.

Tabla A24. Diámetros de inhibición en mm frente a microorganismos de control.

ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

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

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

Tabla B4. Análisis de varianza para la diversidad bacteriana.

Tabla B5. Separación de medias para la diversidad microbiana del factor A.

Tabla B6. Separación de medias para la diversidad de la interacción AxB.

Tabla B7. Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de los actinomicetes aislados en el presente estudio.

Tabla B8. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis*.

Tabla B9. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis*

Tabla B10. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium*

Tabla B11. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium*

Tabla B12. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Alternaria*

Tabla B13. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Alternaria*

Tabla B14. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Phoma*

Tabla B15. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Phoma*

Tabla B16. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram +

Tabla B17. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria G+.

Tabla B18. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram -

Tabla B19. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria G-.

ANEXO C. GRÁFICOS

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

Figura C2. Número de actinomicetes aislados en cada medio de cultivo según el origen de la muestra.

Figura C3. Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación

Figura C4. Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.

Figura C5. Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

Figura C6. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de los actinomicetes aislados en el estudio.

ANEXO D. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Medios de cultivo

Soluciones Buffer

ANEXO E. TABLA DE COLORES

Tabla de Colores ACRILEX®

British Standard Specification for Colours for Identification Coding and Special Purposes

ANEXO F. FOTOGRAFÍAS

Aislamiento selectivo de muestras de suelo en AAC.

Aislamiento selectivo de muestras de arena en AAC.

Aislamiento selectivo de muestras de páramo en AAC.

Aislamiento selectivo de muestras de suelo en AAV.
Aislamiento selectivo de muestras de arena en AAV.
Aislamiento selectivo de muestras de páramo en AAV.
Actinomicetes aislados.
Caracterización microscópica.
Capacidad antagónica.

RESUMEN

Durante la determinación de la diversidad biológica y metabólica de actinomicetes aislados de suelo y arena de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo, tomando en cuenta como factores de estudio al origen de la muestra y al medio de cultivo de aislamiento, se logró obtener treinta y siete cultivos puros. Del total de colonias aisladas, veinte se obtuvieron del suelo y cuatro de arena de playa de la Antártida. Las restantes fueron colectadas del páramo del Chimborazo. Los resultados obtenidos luego de las pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas mostraron que treinta y seis cultivos presentan características psicrótrofas y una mesófila. La taxonomía numérica de datos fenotípicos y pruebas fisiológicas de crecimiento permitió obtener, luego de la construcción de un dendrograma al 90% de similitud, 23 grupos-especie. Se observó una gran diversidad metabólica ya que un 97% de cultivos presentaron capacidad antagónica frente a por lo menos un microorganismo en la evaluación final de producción de compuestos bioactivos. Estos resultados demuestran una amplia biodiversidad de actinomicetes provenientes de muestras de ecosistemas glaciares, los mismos que posiblemente podrían permitir la producción de antibióticos con utilidad en el campo biotecnológico.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Tema de investigación

Diversidad biológica y metabólica de actinomicetes aislados de suelo y arena de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo.

1.2. Planteamiento del problema

1.2.1. Contextualización

Macro

La Antártida es un lugar privilegiado para investigar la biogeografía microbiana y dilucidar el papel de los procesos históricos y condiciones ambientales contemporáneas que han intervenido en la diversidad microbiana. El aislamiento extremo con respecto al resto del mundo, la influencia del océano y las corrientes atmosféricas, son fuentes que han provocado la existencia de eventos únicos para el desarrollo de ciertos organismos vivos. Por otra parte, los especímenes que habitan este continente necesitan sobrevivir en condiciones ambientales extremas, tales como temperaturas bajas y extremadamente fluctuantes, las condiciones de luz, las altas cargas de rayos UV y baja humedad (Wilmotte *et al.*, 2012).

El Continente Antártico es una de las áreas más idóneas para la búsqueda de organismos adaptados a bajas temperaturas. Quienes habitan en dichas áreas presentan adaptaciones a sus sistemas enzimáticos y estructurales. A nivel genómico representan un gran potencial biotecnológico, por lo que pueden ser objeto de importantes programas de prospección biológica (ATCM, 2006).

Durante los últimos 25 años, el interés en la microflora glacial se ha incrementado junto con el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos, especialmente antibióticos y enzimas. Debido a condiciones ambientales extremas, la Antártida puede ser utilizada como un modelo de investigación en cuanto a resultados de los cambios entre los periodos glaciales y pos-glaciales y sus efectos en los organismos (Nedialkova & Naidenova, 2004).

Meso

Se han realizado expediciones científicas a ecosistemas glaciares como el de la Antártida, demostrando que la búsqueda de actinomicetes que presenten actividad antagónica a microorganismos control han sido positivas hasta en un 60% del total de cepas aisladas, y un 10% de éstas han sabido presentar actividad inhibitoria de amplio espectro (Nedialkova & Naidenova, 2004).

Los actinomicetes son uno de los grupos más extensamente distribuidos de bacterias Gram positivas, principalmente aeróbicas y filamentosas. Son conocidas por su versatilidad metabólica por la que sobreviven bajo condiciones ambientales extremas (Pan *et al.*, 2013). En años recientes, investigadores han mostrado gran interés en actinomicetes termofílicos debido a su potencial económico en procesos biológicos útiles como biodegradación y tratamiento de aguas, además de la producción de antibióticos y enzimas (Gousterova *et al.*, 2014). Actinomicetes pertenecientes al género *Streptomyces* son específicamente prolíficos y pueden producir una gran cantidad de metabolitos secundarios biológicamente activos, su importancia radica específicamente en la producción de antibióticos, donde un 80% de los productos elaborados provienen de éstos (Pandey *et al.*, 2004).

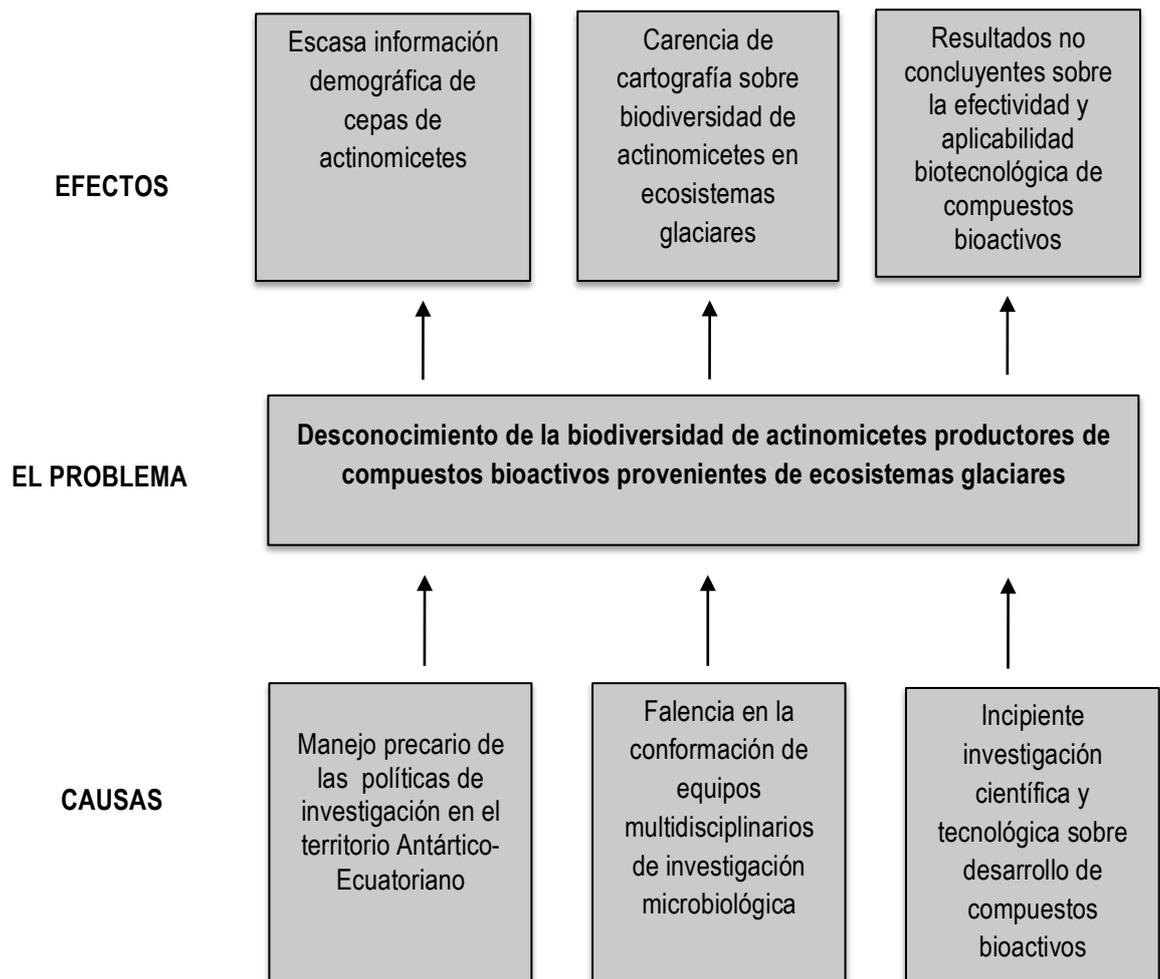
La diversidad biológica de actinomicetes fue demostrada por Garzón (2013), donde se aislaron 11 colonias en cultivo puro provenientes de muestras suelo, arena y sedimento de ecosistemas glaciares de la Antártida y fueron separados en 5 grupos especie. En base a estos resultados, se cree que existe una población endémica de actinomicetes no estudiada por la ciencia, además que ésta es una fuente metabólica útil para el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas.

Micro

La era de los antibióticos provenientes de microorganismos empezó con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1929. En 1940 la producción de ésta fue industrializada y su éxito condujo al descubrimiento de nuevos antibióticos (Rausch, 2012). Considerando el uso práctico, hoy más de 140 productos microbianos y un número similar de derivados son aplicados en medicina humana, en su mayoría en quimioterapia, y medicina veterinaria. Además, de 15 a 20 compuestos son usados en agricultura principalmente pesticidas, agentes protectores de plantas y aditivos alimenticios. En su mayoría, estos compuestos (excepto la penicilina fúngica, cefalosporina y algunos péptidos bacterianos) son producidos por actinomicetes (Moncheva *et al.*, 2000).

Cortez (1998) obtuvo veinte y nueve cultivos de actinomicetes provenientes de muestras de la rizósfera del páramo del Chimborazo que presentaron actividad antagonica. Trece cultivos presentaron actividad antifúngica, veinte y tres tuvieron propiedades bactericidas y siete fueron considerados de amplio espectro. Además, diez cultivos presentaron un radio de inhibición de crecimiento de los organismos de prueba mayor a los que generan antibióticos estándar como Nystatin y Ampicilina, siendo considerados como potenciales agentes de biocontrol.

1.2.2. Análisis Crítico



1.2.3. Prognosis

Ha existido una marginación histórica de la investigación científica en el Continente Antártico debido al desconocimiento sobre las potenciales aplicaciones de la biodiversidad de esta región en campos tales como la industria, medicina, agricultura, entre otros; lo que ha provocado un

desconocimiento de la distribución demográfica microbiana, una carencia cartográfica sobre la biodiversidad de los mismos en los ecosistemas glaciares y resultados no concluyentes sobre la efectividad y aplicabilidad biotecnológica de compuestos bioactivos generados por actinomicetes.

La ejecución de esta investigación pretende cambiar el enfoque sobre la importancia del estudio, protección y conservación de la región glacial como zona estratégica para la economía pública. Esto es posible porque la determinación de la efectividad y aplicabilidad de los compuestos bioactivos va a permitir una reducción del uso de pesticidas, fungicidas y bactericidas inespecíficos, además de la prescripción de antibióticos específicos en el ámbito agrícola, veterinario y médico, y de modo importante, el cumplimiento de normativa internacional sobre exportación de productos con sello verde.

1.2.4. Formulación del problema

¿Es posible determinar la diversidad biológica y metabólica de actinomicetes aislados de suelo y arena de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo?

1.2.5. Preguntas directrices

- ¿Cómo se cuantifica la población de actinomicetes en muestras medioambientales de la Antártida y de páramos ecuatorianos?
- ¿Cómo se determina la diversidad bacteriana y su distribución espacial en muestras de suelo y arena de glaciares de la Antártida y de suelo de páramos del Ecuador?
- ¿Qué métodos se utilizan para la identificación de actinomicetes productores de compuestos bioactivos?

1.3. Justificación

En el ámbito de las políticas públicas, considerando que la Normativa Constitucional determina la conservación y el uso regulado de los recursos genéticos para fines de investigación y desarrollo del bioconocimiento, y que el Estado ha adquirido el compromiso de fomentar la ciencia y la

tecnología, la presente investigación apunta hacia el cumplimiento de estos propósitos que son obligatorios para el fomento de las actividades productivas y de protección social.

En el ámbito de la investigación científica, el estudio de la distribución y biodiversidad de los actinomicetes tiene como finalidad la sistematización del conocimiento microbiológico y biotecnológico, cuya objetivo es la aplicabilidad de los compuestos bioactivos en la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevas formas de cobertura en el campo agrícola, médico y veterinario.

En el ámbito académico esta investigación guarda conformidad con los requerimientos y reglamentaciones que la Universidad Técnica de Ambato exige para garantizar la consistencia del proceso pedagógico que es la esencia final de su filosofía.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

- Determinar la diversidad biológica y metabólica de actinomicetes aislados de suelo y arena de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo.

1.4.2. Específicos

- Cuantificar la población de actinomicetes en muestras de suelo, sedimento y arena de ecosistemas glaciares.
- Determinar la diversidad y distribución espacial de los actinomicetes aislados a partir de las muestras provenientes de ecosistemas glaciares.
- Identificar actinomicetes productores de compuestos bioactivos para su uso potencial en biotecnología.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

2.1.1. Ecosistemas Glaciares

Los glaciares se han creído como ambientes inhóspitos y abióticos debido a condiciones extremas tales como baja temperatura, alta radiación UV y la falta de nutrientes. Sin embargo, recientes investigaciones han demostrado que existen organismos que sobreviven en estos ecosistemas: cianobacterias y microorganismos fotosintéticos como algas de nieve crecen en la superficie de los glaciares y sostienen a estructuras heterótrofas como insectos, gusanos de hielo, rotíferos y tardígrados, además de hongos y bacterias. Estos organismos son tolerantes al frío y han adaptado su metabolismo a estas condiciones (Takeuchi, 2014).

Ecosistema Antártico

El recientemente designado Océano Austral, envuelve el continente Antártico y es el cuarto con mayor extensión en el planeta. El anillo de agua que envuelve la Antártida se encuentra entre los 60° S de latitud y 360° S de longitud. Su línea costera mide aproximadamente 17968 km y su área 20'327000 km². Su temperatura se encuentra entre los -2 a 10 °C y la diferencia entre el hielo y el océano a menudo resultan en intensas tormentas. La capa de hielo que cubre aproximadamente el 98% de la Antártida se formó hace 25 millones de años y posee alrededor del 75% del agua de la Tierra, una cantidad que podría elevar el nivel del mar en aproximadamente 61 m si se derritiera completamente (MBCS, 2014).

El hielo marino antártico cubre una vasta área del Océano Austral y es uno de los entornos más dinámicos del planeta. La zona del hielo marino estacional sobre la que cada año existen avances y retrocesos de éste al mar es cercana al 30% ó, aproximadamente 14 millones de km² del Océano Austral. Éste es un factor clave en las interacciones océano-atmósfera, la circulación oceánica global, y a través del hielo-albedo, el cual es un mecanismo de retroalimentación en una parte integral del sistema climático de la Tierra (ACECRC, 2014).

Investigaciones en la Antártida

Durante las dos últimas décadas ha existido un gran aumento en la investigación sobre los microorganismos adaptados al frío, generalmente conocidos como psicrófilos, impulsados por la conciencia de que ellos y sus enzimas tienen un gran potencial para explotación biotecnológica. Como consecuencia, muchos más laboratorios están cultivando microorganismos a bajas temperaturas (Russell, 2006).

El Ecuador ha dado un paso importante en el tratamiento de la ciencia y los asuntos antárticos al jerarquizar en un nivel más cercano al de toma de decisiones políticas al antiguo Programa Antártico Ecuatoriano (PROANTEC), creado en 1968, y dependiente del Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador, pues desde 2004 se dispone del Instituto Antártico Ecuatoriano (INAE) con el objetivo de mantener la protección geopolítica del país y la participación permanente en las actividades de investigación científica en el contexto del Sistema del Tratado Antártico (INAE, 2006).

Ecosistemas de Páramos Andinos

Entre el límite superior de altura de los bosques andinos (3000 - 3500 m) y el límite inferior de las nieves (4800 - 5000 m), toma lugar, en los Andes septentrionales y ecuatoriales, un medio particular: el páramo (Podwojeski & Poulénard, 2011).

El páramo es un ecosistema neotropical ubicado entre el límite del bosque cerrado y las nieves perpetuas; se localiza a lo largo de las cordilleras o en picos aislados. Se extiende entre 11° N y 8° S de latitud, desde Costa Rica hasta el Perú; su distribución es continua sobre las cumbres de los Andes desde Venezuela hasta el norte de Perú, aunque Panamá y Costa Rica también tienen montañas que albergan verdadera vegetación de páramo. La vegetación de alta montaña continúa hacia el sur, pero allí es mucho más seca y estacional, y se denomina puna (León-Yáñez, 2011). Estos prados de altura dominados por gramíneas formadoras de penachos, se enfrentan a un clima rudo: el promedio de las temperaturas anuales es bajo, hay una alta humedad a pesar de las precipitaciones moderadas y una débil evaporación. En tal entorno climático y altitudinal se desarrolla un tipo de vegetación muy particular que presenta un alto grado de endemismo. En Ecuador los páramos cubren una superficie de 12560 km² que representa un 5% del territorio nacional (Podwojeski & Poulénard, 2011).

2.1.2. Microorganismos psicrófilos

Los microorganismos psicrófilos tienen la capacidad de crecer en un rango de temperatura de 0 a 20 °C y están restringidos a hábitats permanentemente fríos. Esta capacidad de crecer a bajas temperaturas puede estar correlacionada con una característica de temperatura inferior a la de los mesófilos, una proporción creciente de ácidos grasos insaturados en la fase lipídica de la membrana celular -lo que hace que sea más fluido- y una conformación proteica funcional a baja temperatura. La temperatura máxima relativamente baja de crecimiento de estos microorganismos a menudo se considera que es debido a la termolabilidad de uno o más componentes celulares esenciales, en particular de las enzimas, mientras que algunas de las actividades degradativas son mejoradas, lo que resulta en un agotamiento de energía de la célula, una fuga de sustancias intracelulares o lisis completa. Microorganismos psicrófilos son conocidos por sus actividades de degradación en los alimentos, algunos son patógenos o toxigénicos para el hombre, animales o plantas. Sin embargo, en los ecosistemas microbianos naturales, éstos microorganismos pueden jugar un papel importante en la biodegradación de la materia orgánica durante las estaciones frías (Gounot, 1986).

2.1.3. Actinomicetes

Los actinomicetes son un grupo heterogéneo de bacterias filamentosas, Gram positivas, producen micelio ramificado, el cual puede ser de dos tipos: aéreo y de sustrato. Sus esporas son esféricas con un tamaño entre 0,7 – 1,3 µm de diámetro (Taha *et al.*, 2007). Son conocidos por su capacidad de producir antibióticos. Entre éstos, los del género *Streptomyces*, son los más dominantes, mientras que los denominados no-*Streptomyces*, son denominados actinomicetes raros, comprendiendo aproximadamente 100 géneros (Sivakumar, s/f).

Streptomyces son bacterias Gram positivas con un alto contenido de G+C en su ADN, poseen un genoma lineal y relativamente grande (8-10 Mb). Son saprófitas del suelo y son objeto de estudio gracias a su producción de metabolitos secundarios con actividad antibiótica y por el interés de su ciclo de vida. El metabolismo secundario por lo general ocurre en la fase de crecimiento tardío. La naturaleza temporal del metabolismo secundario es genética pero la expresión puede ser influenciada en gran medida por las manipulaciones ambientales. Por lo tanto, el metabolismo secundario es a menudo provocado por el agotamiento de un nutriente, adición de un inductor y/o por una disminución en la tasa de crecimiento, o por diferentes señales

ambientales producidas por otros organismos en el suelo. Estos eventos generan señales que causan una cascada de eventos reguladores resultantes en la diferenciación morfológica y producción de metabolitos secundarios. La formación de los antibióticos también está regulada por nutrientes (nitrógeno, fósforo y fuente de carbono), metales y la tasa de crecimiento (Sharon, 2010).

Cuando una espora de *Streptomyces* encuentra nutrientes y condiciones favorables, germina y uno o dos tubos germinativos emergen y crecen para formar hifas. Estos tubos germinales crecen por extensión de la punta y por ramificación para formar un micelio vegetativo que a menudo encuentran su camino profundamente en el sustrato circundante. En respuesta al agotamiento de los nutrientes y de otras señales, se inicia tanto la producción de metabolitos secundarios así como la diferenciación morfológica. Las hifas aéreas rompen la tensión superficial, escapando el entorno acuoso del micelio vegetativo y crecen en el aire. El hifas aéreas se dividirán por una forma de desarrollo controlado de la división celular en largas cadenas de compartimentos de preespora, que luego desarrollarán paredes gruesas de esporas, además, sintetizan un pigmento de esporas grisáceas y adquieren las otras características de esporas maduras. En comparación con las endosporas formados por especies de *Bacillus*, las esporas de *Streptomyces* son mucho menos resistentes a las condiciones adversas, aunque pueden sobrevivir por largos períodos de tiempo en un estado desecado. Por tanto, las esporas de *Streptomyces*, en gran medida inactivas, están bien adaptados para la dispersión del microorganismo en el medio ambiente (Flärdh & Buttner, 2009).

Ecología de Actinomicetes

La diversidad microbiana es una potencial mina de oro para la industria biotecnológica, debido a que ofrece un sinnúmero de metabolitos secundarios para sondear enzimas, antibióticos, antioxidantes, citotóxicos y otras sustancias útiles. Los actinomicetes crecen en una gran diversidad de hábitats, ya sean naturales o artificiales (Adegboye, 2012). La diversidad de actinomicetes es de impacto excepcional en varias áreas de la industria farmacéutica, médica y agrícola, particularmente en la producción de antibióticos (Blodgett *et al.*, 2008). Los actinomicetes son ubicuos y se han aislado de diversos lugares: suelo, agua dulce, marinos, de aguas termales, zonas de extracción, y ambientes extremos. El número y la variedad de actinomicetes presentes en cualquier muestra de suelo están influidos significativamente por la

ubicación geográfica, temperatura, tipo de suelo, pH, contenido de materia orgánica, actividades agrícolas, aireación, disponibilidad de nutrientes, contenido de humedad y vegetación del suelo (Adegboye, 2012).

Actinomicetes en Ecosistemas Glaciares

En investigaciones previas, las expediciones a ecosistemas glaciares como la Antártida han demostrado que el trabajo en la búsqueda de actinomicetes que presenten actividad antagónica a microorganismos control han sido positivas entre un 40-60% del total de cepas aisladas, y un 10% de éstas han sabido presentar una actividad un actividad inhibitoria de amplio espectro, siendo útiles para futuros proyectos en la búsqueda y desarrollo de nuevas sustancias para propósitos agrícolas y farmacéuticos (Nedialkova & Naidenova, 2004).

En investigaciones recientes se ha demostrado una amplia diversidad de actinomicetes en ecosistemas glaciares. Cortez (1998) utilizó la rizósfera de plantas de las estribaciones del Chimborazo entre 3500 y 5000 m de altura, obteniendo 141 colonias de actinomicetes: 69 a partir de la rizósfera de *Stipa ichu* y 72 de *Culcitium rufescens*.

Garzón (2013) utilizó muestras de suelo, arena y sedimentos de ecosistemas glaciares de la isla Greenwich y Dee en la Antártida, obteniendo 11 cultivos de actinomicetes. Luego de pruebas fenotípicas y fisiológicas de crecimiento fueron separados en 5 grupos especie

2.1.4. Metabolitos secundarios en Actinomicetes

Los actinomicetes están comúnmente asociados a la producción de antibióticos y otros metabolitos. De hecho, entre el 70-80% de los metabolitos secundarios comercialmente disponibles, han sido aislados y caracterizados de especies de actinomicetes (Kumari *et al.*, 2013). Estos metabolitos secundarios representan una fuente importante de compuestos biológicamente activos como antibióticos, antiparasitarios, agroquímicos, enzimas, inmunodepresores y agentes anticancerígenos. Sin embargo, durante la última década, la búsqueda de antibióticos en actinomicetes y otros organismos se he vuelto menos popular debido al descenso en el hallazgo de nuevas cepas (Baltz, 2008).

Un modelo matemático diseñado para estimar el número de agentes antimicrobianos no descubiertos por el género *Streptomyces* predice que la disminución de la búsqueda de estos

agentes se debe a la disminución de los esfuerzos en la detección de más microorganismos y no debido a un menor número de agentes antimicrobianos descubiertos y, por tanto, la búsqueda de microorganismos y nuevos antibióticos ha ganado importancia (Kumari *et al.*, 2013).

2.1.5. Aislamiento selectivo de Ecosistemas Glaciares

Pandey *et al.* (2004) realizaron investigaciones microbiológicas en la Zona del Nepal entre 5000 a 5300 m de altura donde los actinomicetes del suelo fueron sido aislados por técnica de vertido placa en agar de almidón-caseína y agar de glicerol-arginina después de diluciones seriadas en agua de llave estéril. Se seleccionaron y aislaron colonias secas de actinomicetes, las mismas que se conservaron en soluciones de glicerol y almacenados a -20 °C. Los actinomicetes de los cuales se determinó su actividad antimicrobiana fueron reactivados en agar almidón-caseína.

Moncheva *et al.* (2000) determinaron características de actinomicetes en suelos de la Antártida, para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de las cepas, se utilizaron medios selectivos: agar AV con vitaminas y agar almidón-caseína-nitrato. Las cepas activas se cultivaron en un agitador a 25 °C y 240 rpm durante 120 h.

2.1.6. Antibióticos

A pesar del éxito del descubrimiento de los antibióticos, y los avances en el proceso de su producción, las enfermedades infecciosas siguen siendo la segunda causa de muerte en el mundo, y las infecciones bacterianas causan aproximadamente 17 millones de decesos al año, lo que afecta principalmente a niños y ancianos. La historia de antibióticos derivados de *Streptomyces* comenzó con el descubrimiento de la estreptomina en 1942, y, dos años después, los científicos intensificaron la búsqueda de compuestos bioactivo dentro del género. Hoy en día, el 80% de los antibióticos se obtienen de género *Streptomyces* (Procópio *et al.*, 2012).

Tabla 1. Resultados y fechas de antibióticos

Antibiótico	Año de aplicación	Cepa de síntesis
Platensimicina	2006	<i>Streptomyces platensis</i>
Daptomicina	2003	<i>Streptomyces roseosporus</i>
Linezolid	2000	Synthetic
Mupirocina	1995	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Ribostamicina	1970	<i>Streptomyces ribosidificus</i>
Fosfomicina	1969	<i>Streptomyces fradiae</i>
Trimetoprima	1968	Synthetic
Gentamicina	1963	<i>Micromonospora purpurea</i>
Ácido fusídico	1963	<i>Fusidium coccineum</i>
Ácido nalidíxico	1962	Synthetic
Tinidazol	1959	Synthetic
Kanamicina	1957	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
Rifamicina	1957	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>
Noviobiocin	1956	<i>Streptomyces niveus</i>
Vancomicina	1956	<i>Streptomyces orientalis</i>
Cicloserine	1955	<i>Streptomyces garyphalus</i>
Lincomicina	1952	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Eritromicina	1952	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
Virginiamicina	1952	<i>Streptomyces pristinaeaspiralis</i> <i>Streptomyces virginiae</i>
Isoniazida	1951	Synthetic
Viomicina	1951	<i>Streptomyces vinaceus</i> <i>Streptomyces capreolus</i>
Nystatin	1950	<i>Streptomyces noursei</i>
Tertraciclina	1950	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Neomicina	1949	<i>Streptomyces fradiae</i>
Cloramfenicol	1949	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Polimixina	1949	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
Nitrofurantoin	1947	Synthetic
Bacitracina	1945	<i>Bacillus licheniformis</i>
Cefalosporina	1945	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Estreptomicina	1944	<i>Streptomyces griseus</i>
Penicilina	1941	<i>Penicillium chrysogenum</i>

Fuente: Procópio et al., 2012

2.1.7. Taxonomía numérica

La taxonomía numérica o análisis cluster es el nombre dado a varios procedimientos en el que un conjunto de individuos o unidades (denominados como OTUs: "Unidades Operacionales Taxonómicas"), se dividen en dos o más grupos o subgrupos sobre la base de un conjunto de atributos que comparten. Las técnicas de análisis de conglomerados se pueden aplicar fácilmente en campos biológicos: ecología, tratamiento de datos biogeográficos cuantitativos,

reconocimiento de varias formas clínicas de una enfermedad, separación de grupos raciales distintivos, entre otros (Dragomirescu & Postelnicu, 1994).

Una gran variedad de datos pueden ser expresados por variables binarias, las cuales expresan un estatus binario de la muestra, por ejemplo: presencia/ausencia, sí/no, verdadero/falso. En taxonomía, se denota la presencia o ausencia de un carácter taxonómico específico (Consonni & Todeschini, 2012).

De esta manera, la más simple, y probablemente la más común, es aquella en la que puede ocurrir en dos etapas, designando 1 ó 0 (presencia/ausencia), ó 1 y 0, y poder simplemente etiquetar dos formas alternativas de un carácter. Si se considera cualquiera de los dos OTUs, y los datos, asumiendo que todos ellos son de naturaleza binaria, pueden ser resumidos en una tabla de 2x2 (Dunn & Everitt, 1982).

Tabla 2. Tabla de frecuencia de las cuatro posibles combinaciones de las dos variables binarias

		OTU _i		
		1	0	
OTU _j	1	a	b	a+b
	0	c	d	c+d
		a+c	b+d	p= a+b+c+d

Fuente: Consonni & Todeschini, 2012

Hay dos grupos básicos de coeficientes de similitud: medidas simétricas de similitud y medidas asimétricas de similitud. La primera utiliza tanto “a” como “d”, lo que significa que el estado de doble cero (d) para los dos objetos se trata exactamente de la misma manera que cualquier otro par de valores. Estas medidas deben ser utilizadas cuando el estado de doble cero es una base válida para la comparación de dos objetos; por el contrario, se pueden usar medidas asimétricas

de similitud, en el cual se omite el estado de doble cero en la evaluación (Consonni & Todeschini, 2012).

Tabla 3. Coeficientes de similitud

Símbolo	Coeficiente	Nombre
<i>Ja</i>	$S_{Ja} = \frac{a}{a+b+c}$	Jaccard (1912)
<i>SM</i>	$S_{SM} = \frac{a+d}{p}$	Sokal – Michner (1958), Simple similitud

Fuente: Consonni & Todeschini, 2012

2.2. Fundamentación filosófica

La presente investigación se fundamenta en los conceptos clásicos del método científico que se ha aplicado de modo convencional para la producción de conocimiento en la naturaleza. El método científico de investigación se basa en dos modos de conocimiento: empírico e instrumental. El primero se refiere al conocimiento basado en la experiencia pura, y el segundo en el obtención de datos referidos a sistemas convencionales de cuantificación.

Históricamente el método científico es un procedimiento que ha caracterizado a la ciencia natural desde el siglo XVII, el mismo consiste en la observación sistemática, medición precisa, experimentación suficiente, y la formulación, análisis y modificación de hipótesis.

El método científico está sustentado por dos pilares fundamentales: El primero es la reproducibilidad de los fenómenos, o sea la capacidad de replicabilidad de un determinado experimento, en cualquier lugar y bajo cualquier circunstancia. El segundo pilar es la refutabilidad, o sea que toda proposición científica puede ser denegada (argumento denominado falsacionismo), lo que implica que se pueden diseñar experimentos, que en el caso de dar resultados distintos a los predichos, negarían la hipótesis previa.

La ciencia usa métodos definitorios, clasificatorios, estadísticos, probabilísticos y otros. El método científico se refiere a un conjunto de tácticas empleadas para construir el conocimiento que lleva a sistematizar las distintas ramas del saber humano.

2.3. Fundamentación legal

Según el Plan Nacional del Buen Vivir 2014-2017, existen varios objetivos a cumplirse dentro de los cuales se tiene en cuenta el desarrollo biotecnológico, la conservación de la biodiversidad y la promoción de la investigación:

Objetivo 7. Garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental territorial y global.

7.2. Conocer, valorar, conservar y manejar sustentablemente el patrimonio natural y su biodiversidad terrestre, acuática continental, marina y costera, con el acceso justo y equitativo a sus beneficios

Políticas y lineamientos estratégicos:

a. Fortalecer el Sistema Nacional de Áreas Protegidas, y otras formas de conservación basadas en la gestión integral y participativa, y la seguridad territorial de los paisajes terrestres, acuáticos y marinos, para que contribuyan al mantenimiento de su estructura, funciones, ciclos naturales y evolutivos, asegurando el flujo y la provisión de servicios ambientales.

b. Fortalecer los instrumentos de conservación y manejo in situ y ex situ de la vida silvestre, basados en principios de sostenibilidad, soberanía, responsabilidad intergeneracional y distribución equitativa de sus beneficios.

e. Promover la conservación y el uso regulado de los recursos genéticos para fines de investigación y desarrollo del bioconocimiento, considerando los conocimientos tradicionales y saberes ancestrales asociados, y garantizando su acceso.

f. Fortalecer la aplicación de la normativa para la conservación, recuperación y protección de los recursos genéticos de la agrobiodiversidad y especies silvestres emparentadas, a fin de reducir la erosión genética y garantizar la soberanía alimentaria.

g. Reconocer, respetar y promover los conocimientos y saberes ancestrales, las innovaciones y las prácticas tradicionales sustentables de las comunidades, pueblos y nacionalidades, para fortalecer la conservación y el uso sustentable de la biodiversidad, con su participación plena y efectiva.

Objetivo 11. Asegurar la soberanía y eficiencia de los sectores estratégicos para la transformación industrial y tecnológica

11.4. Gestionar el recurso hídrico, en el marco constitucional del manejo sustentable y participativo de las cuencas hidrográficas y del espacio marino

k. Promover la inserción estratégica del Ecuador en el océano Pacífico y la Antártida.

11.5. Impulsar la industria química, farmacéutica y alimentaria, a través del uso soberano, estratégico y sustentable de la biodiversidad

a. Generar un marco normativo que apoye, incentive y regule el acceso y el aprovechamiento sostenible de los recursos biológicos y la conservación de la diversidad biológica.

En cuanto a la Legislación ecuatoriana en relación a la biotecnología se tendrá en cuenta la conservación de la biodiversidad y la biotecnología humana.

Se entiende por biotecnología la aplicación de la biología con fines humanos empleando la potencialidad de los seres vivos y su eventual modificación selectiva y programada para la obtención de bienes y servicios mediante la utilización de microorganismos para la producción de alimentos y bebidas o de nuevas disciplinas como la ingeniería genética.

Art. 80.- El Estado fomentará la ciencia y la tecnología, especialmente en todos los niveles educativos, dirigidas a mejorar la productividad, la competitividad, el manejo sustentable de los recursos naturales, y a satisfacer las necesidades básicas de la población.

Garantizará la libertad de las actividades científicas y tecnológicas y la protección legal de sus resultados, así como el conocimiento ancestral colectivo.

La investigación científica y tecnológica se llevará a cabo en las universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos y tecnológicos y centros de investigación científica, en coordinación con los sectores productivos cuando sea pertinente, y con el organismo público que establezca la ley, la que regulará también el estatuto del investigador científico.

Art. 385.- El sistema nacional de ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales, en el marco del respeto al ambiente, la naturaleza, la vida, las culturas y la soberanía, tendrá como finalidad:

1. Generar, adaptar y difundir conocimientos científicos y tecnológicos.

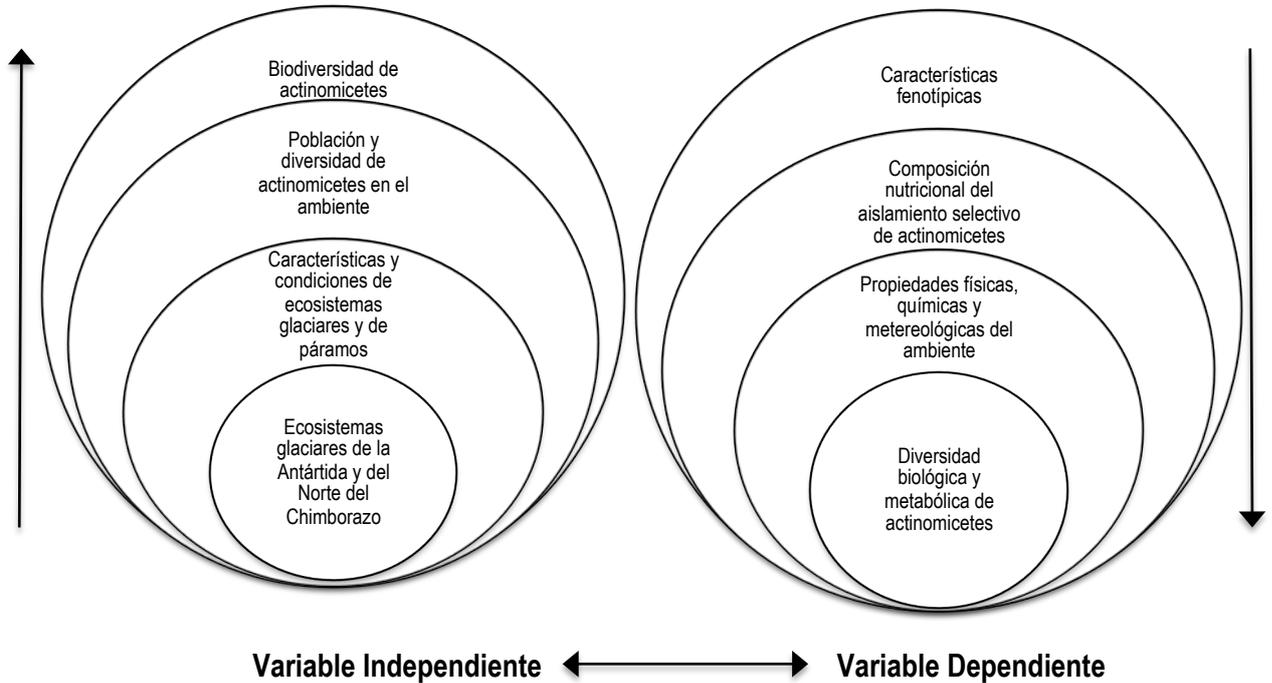
2. Desarrollar tecnologías e innovaciones que impulsen la producción nacional, eleven la eficiencia y productividad, mejoren la calidad de vida y contribuyan a la realización del buen vivir.

Art. 387.- Será responsabilidad del Estado:

1. Facilitar e impulsar la incorporación a la sociedad del conocimiento para alcanzar los objetivos del régimen de desarrollo.
2. Asegurar la difusión y el acceso a los conocimientos científicos y tecnológicos, el usufructo de sus descubrimientos y hallazgos en el marco de lo establecido en la Constitución y la Ley.
3. Garantizar la libertad de creación e investigación en el marco del respeto a la ética, la naturaleza, el ambiente, y el rescate de los conocimientos ancestrales.

En el Tratado Antártico se resumen en los siguientes puntos importantes: Que la Antártida sea utilizada solamente para fines pacíficos, de manera que no se acepta el establecimiento de bases o fortificaciones militares; la realización de maniobras militares o los ensayos de toda clase de armas, pero se acepta el empleo de personal militar para investigaciones científicas o bien para cualquier otro fin pacífico y, que en la Antártida se mantenga la libertad de investigaciones científicas y la cooperación entre los países activos y aquellos que tengan interés en este continente. Se establece además que el intercambio de personal e información es una obligación de todas las naciones.

2.4. Categorías fundamentales



2.5. Hipótesis

2.5.1. Hipótesis nula

- Los actinomicetos recolectados de muestras de suelo de ecosistemas glaciares de la Antártida y norte del Chimborazo no poseen diversidad biológica y metabólica.

2.5.2. Hipótesis alternativa

- Los actinomicetos recolectados de muestras de suelo de ecosistemas glaciares de la Antártida y norte del Chimborazo poseen diversidad biológica y metabólica.

2.6. Señalamiento de variables de la hipótesis

- Número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de muestra (ufc/g).
- Diversidad de colonias en los medios de cultivo.

- Aislamiento y purificación de actinomicetes procedentes de muestras de ecosistemas glaciares de la Antártida.
- Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos.
- Pruebas de crecimiento a diferente temperatura, pH y salinidad.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Enfoque

La presente investigación tiene un enfoque cualitativo y cuantitativo.

3.2. Modalidad básica de la investigación

Experimental.

3.3. Nivel o tipo de investigación

Básica exploratoria.

3.4. Población y muestra

Las muestras de suelo fueron recolectadas durante el verano antártico 2010, 2011, 2012 en la XIV, XV, XVI expediciones ecuatorianas a la Antártida respectivamente y corresponden a muestras compuestas de suelo y arena de playa de la isla Greenwich y Dee; además las muestras de suelo del Ecuador fueron recolectadas en zonas cercanas al primer refugio del Volcán Chimborazo separándolas en dos grupos a <4500 m.s.n.m. y >4500 m.s.n.m.

3.5. Operacionalización de variables

(Ver página siguiente).

3.6. Plan de recolección de información

3.6.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales

Determinación del pH y Conductividad de las muestras

Para determinar el pH y conductividad eléctrica se pesó 20 gramos de cada muestra, se colocó cada una en un vaso de precipitación de 100 ml, se añadió 50 ml de agua destilada, y se homogenizaron las muestras durante 5 minutos. Las muestras se dejaron en reposo por una hora. Una vez transcurrido ese tiempo, se tomaron las lecturas correspondientes de las muestras con la ayuda de un pH-metro y un conductímetro.

Tabla 4. Categorías Fundamentales

HIPÓTESIS	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	INDICES	INSTRUMENTOS
Los actinomicetes recolectados de muestras de suelo de ecosistemas glaciares de la Antártida y norte del Chimborazo poseen diversidad biológica y metabólica.	Independiente	Características fenotípicas como producto de la expresión visible de los genes de cada individuo.	Características macroscópicas	Coloración y morfología de las colonias. Micelio y esporas. Evaluación por código binario.	Tablas de colores Microsoft Excel.
	Dependiente	Diversidad de actinomicetes	Características microscópicas Población Bacteriana Grupos especie identificados en los dendrogramas respectivos de acuerdo al porcentaje de similitud	Tipo de morfología de la cadena de esporas. Tabla de morfología de las cadenas Número de UFC/g Similitud mayor al 80% indican miembros de un mismo grupo-especie	Microscopio Calculadora Software estadístico NTSys. Microsoft Excel.

Determinación del porcentaje de humedad de las muestras

Para determinar el porcentaje de humedad se pesaron 8 cápsulas de porcelana y se colocaron en éstas 5 gramos de cada tipo de suelo, finalmente se registró el peso total (Peso 1).

Las cápsulas de porcelana con las muestras se colocaron en una estufa a 105 °C por 24 horas. Cuando las muestras se enfriaron, se pesaron nuevamente (Peso 2). El porcentaje de humedad fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{Peso}_1 - \text{Peso}_2}{\text{Peso}_2} \times 100$$

El porcentaje de humedad involucra únicamente los pesos de agua y suelo de las muestras, por lo que el peso de la cápsula de porcelana fue restado.

Determinación del porcentaje de materia orgánica

Para la determinación del porcentaje de materia orgánica se pesaron 8 cápsulas de porcelana vacías y secas, en cada una se colocaron 5 gramos de suelo de cada muestra, se colocaron en una estufa a 105 °C por 24 horas. Cuando las muestras se enfriaron se pesó nuevamente (Peso 1). Las cápsulas de porcelana con las muestras procedentes de la estufa se colocaron en una mufla a 400 °C por 3 horas. Cuando las muestras se enfriaron se obtuvo el peso final (Peso 2). El porcentaje de materia orgánica se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{M.O} = \frac{\text{Peso}_1 - \text{Peso}_2}{\text{Peso}_2} \times 100$$

Para calcular porcentaje de materia orgánica únicamente se registraron los pesos de agua y suelo de las muestras, por lo que el peso de la cápsula de porcelana fue restado.

3.6.2. Aislamiento selectivo de actinomicetes psicrótrofos

Determinación de la población y diversidad de actinomicetes

De cada una de las muestras se prepararon diluciones sucesivas utilizando el método de difusión en placa.

Para preparar la dilución 1/10 se pesó 10 gramos de suelo y se colocó en una botella que contenía 90 ml de agua de llave estéril esta suspensión se agitó por 1 hora. A partir de esta dilución se prepararon las diluciones 1/10² y 1/10³. Se colocaron 100 microlitros (100 µl) de las diluciones 1/10, 1/10² y 1/10³ en cajas Petri con Agar AV con Vitaminas (AAV) y Agar Almidón Caseína (AAC), cada uno suplementado con nystatin, a una concentración de 75 µg/ml, y ajustando su pH a 7,0. Se extendió esta alícuota por la superficie de cada caja con un asa de Digralsky. Este procedimiento se realizó por duplicado y para cada tipo de suelo. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 20 °C durante 3 semanas. Transcurrido el periodo de tiempo se contó el número de colonias de actinomicetes presentes en cada caja. El número de ufc/gramo de suelo se calculó para aquellas diluciones en las que el número de colonias se encontró en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

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

Donde:

- N** Número de colonias
- FD** Dilución en la cual se contó N (Ej: Conteo realizado en la dilución 1/10³, FD = 1x10³)
- Vt** Volumen de la dilución 1/10, en mililitros
- Vi** Volumen inoculado, en mililitros
- S** Cantidad de suelo utilizada para preparar la dilución 1/10

3.6.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento de actinomicetes

Las cajas Petri que presentaron crecimiento visible y diversidad de colonias se utilizaron para el aislamiento y purificación de las cepas. Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó una porción de una colonia para inocularla mediante estría simple en platos monopetri que contenían Agar AV con Vitaminas (AAV) y Agar Almidón Caseína (AAC). Los platos fueron incubados nuevamente a 20 °C. Los cultivos puros fueron replicados en estría compuesta e incubados por dos semanas. Aquellos que después del período de incubación presentaron características de cultivo puro fueron etiquetados y almacenados en tubos plásticos que contenían 1 mililitro de glicerol al 20% (w/v) y almacenados a -10 °C para su preservación.

3.6.4. Caracterización macroscópica

Los cultivos puros obtenidos se sembraron en dos medios de cultivo diferentes: Agar GYM y Agar Avena, se agruparon de acuerdo a la coloración del micelio aéreo, micelio de sustrato, esporas, pigmento difusible y la morfología de las colonias, los que se determinaron usando dos tablas estándar de colores: ACRILEX® y British Standard Specification for colours for identification coding and special purposes. Las características generales de las colonias fueron descritas de acuerdo a la Tabla 5. Aquellas cepas que presentaron características macroscópicas similares fueron ubicadas en un mismo grupo.

Tabla 5. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen.

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

Fuente: Garzón, 2013

3.6.5. Caracterización microscópica

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

Tabla 6: Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas.

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

Fuente: Philips, 1994

3.6.6. Pruebas fisiológicas de crecimiento

Identificación de actinomicetes psicrótrofos

Se inocularon 5 µl de suspensiones de esporas sobre la superficie de cada medio de cultivo y fueron incubados a 4, 20 y 28 °C. Se evaluó el crecimiento de los actinomicetes mediante código binario asignando 1 si presentaron crecimiento visible, en caso contrario; en ausencia de crecimiento, 0. Un actinomicete fue considerado como psicrófilo si creció solamente a 4 y 20 °C. Aquellos que crecieron en las tres temperaturas fueron clasificados como psicrótrofos, mientras que fueron mesófilos si crecen a 20 y 28°C, en cuyo caso también se determinó su crecimiento a 37 °C.

Rango de crecimiento en función del pH

Se inoculó 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de cada medio de cultivo, ajustado a los pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5 mediante sistema de buffers. Las cajas fueron incubadas durante una semana de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento, determinada anteriormente. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluó el crecimiento de los actinomicetes mediante código binario. A la presencia de crecimiento se le asignó 1 y en ausencia de crecimiento, 0.

Tabla 7. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función del pH del medio.

pH del Medio					Clasificación
4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	
+	+	-	-	-	Acidófilo
+	+	+	-	-	Neutrotolerante
+	+	+	+	-	Neutrotolerante
-	+	+	+	-	Neutrófilo
-	-	+	+	-	Neutrófilo
-	-	+	-	-	Neutrófilo
+	+	+	+	+	Álcalitolerante
-	+	+	+	+	Álcalitolerante
-	-	+	+	+	Álcalitolerante
-	-	-	+	+	Alcalófilo

Fuente: Garzón, 2013

Rango de crecimiento en Función de la salinidad

Se inoculó 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de cada medio de cultivo, que contenía 1, 10 y 15% de NaCl (w/v). Las cajas fueron incubadas durante una semana de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento, determinada anteriormente. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluó el crecimiento de los actinomicetes mediante código binario. A la presencia de crecimiento se le asignó 1 y en ausencia de crecimiento, 0. La clasificación de los actinomicetes en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo fue establecido a partir la Tabla 8.

Tabla 8. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

NaCl (%)			Clasificación
1	10	15	
+	-	-	Halófilo débil
+	+	-	Halófilo
+	+	+	Halófilo extremo

3.7. Determinación de la actividad antimicrobiana.

3.7.1. Preparación de los platos con los microorganismos modelo.

Cultivos de los hongos fitopatógenos *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Phoma* fueron inoculados en agar papa dextrosa (PDA), y dos bacterias, una Gram positiva y la otra Gram negativa, fueron inoculadas en agar nutritivo (AN). Los hongos fueron incubados a 28°C durante 4 días. Una vez obtenido crecimiento visible se prepararon los platos siguiendo la técnica detallada por Vinuesa (2010).

En la primera etapa se prepararon suspensiones con las estructuras reproductivas de los hongos y bacterias transfiriendo esporas (hongos) o células (bacterias) a un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina estéril. Con la ayuda de un hemocitómetro, en el caso de hongos, y una placa para conteo de bacterias (Petroff – Hausser chamber), se determinó la concentración inicial de

cada uno de los microorganismos. Finalmente se calculó el volumen de inóculo necesario para obtener concentraciones finales de 1×10^5 células/ml para las bacterias, y 1×10^3 esporas/ml para los hongos fitopatógenos.

3.7.2. Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica.

Utilizando un sacabocados de 6 mm de diámetro, se extrajeron bloques cilíndricos del micelio de cada cultivo puro de actinomicetes. Se depositaron 4 bloques pertenecientes a cuatro actinomicetes diferentes sobre la superficie de los platos de cultivo con los microorganismos modelo, situando la parte del micelio del actinomicete en contacto con el medio para permitir una mejor difusión de los posibles metabolitos producidos. Además se prepararon platos en los que se colocaron círculos de papel con nystatin (75 μ g/ml) y rifampicina (3.33 μ g/ml), como control experimental para los ensayos de hongos y bacterias respectivamente. Los platos preparados fueron incubados a 20 °C por 5 días, y los perfiles de actividad biológica se determinaron midiendo los diámetros, tanto polar como ecuatorial, de las zonas de inhibición, en milímetros, de aquellos actinomicetes que mostraron actividad antimicrobiana.

3.8. Plan de procesamiento y análisis de la información

3.8.1. Diseño experimental

Diversidad Biológica

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

Factor A: Tipo de muestras

a₁: Muestra compuesta de suelo de la Antártida – Año 2010

a₁: Muestra compuesta de suelo de la Antártida – Año 2011

a₂: Muestra compuesta de suelo de la Antártida – Año 2012

a₃: Muestra compuesta de arena de playa de la Antártida – Año 2010

a₄: Muestra compuesta de arena de playa de la Antártida – Año 2011

a₅: Muestra compuesta de arena de playa de la Antártida – Año 2012

a₆: Muestra de suelo del Chimborazo < 4500 m.s.n.m.

a₇: Muestra de suelo del Chimborazo > 4500 m.s.n.m.

Factor B: Medio de cultivo

b₀: Agar Almidón Caseína (AAC)

b₁: Agar AV con Vitaminas (AAV)

Tabla 9. Tratamientos y combinación de los factores en estudio

Tratamientos	A: Tipo de Muestra	B: Medio de cultivo
a ₀ b ₀	Muestra Suelo 2010	Agar Almidón Caseína (AAC)
a ₀ b ₁	Muestra Suelo 2010	Agar AV con Vitaminas (AAV)
a ₁ b ₀	Muestra Suelo 2011	Agar Almidón Caseína (AAC)
a ₁ b ₁	Muestra Suelo 2011	Agar AV con Vitaminas (AAV)
a ₂ b ₀	Muestra Suelo 2012	Agar Almidón Caseína (AAC)
a ₂ b ₁	Muestra Suelo 2012	Agar AV con Vitaminas (AAV)
a ₃ b ₀	Muestra Arena 2010	Agar Almidón Caseína (AAC)
a ₃ b ₁	Muestra Arena 2010	Agar AV con Vitaminas (AAV)
a ₄ b ₀	Muestra Arena 2011	Agar Almidón Caseína (AAC)
a ₄ b ₁	Muestra Arena 2011	Agar AV con Vitaminas (AAV)
a ₅ b ₀	Muestra Arena 2012	Agar Almidón Caseína (AAC)
a ₅ b ₁	Muestra Arena 2012	Agar AV con Vitaminas (AAV)
a ₆ b ₀	Muestra Chimborazo < 4500 msnm	Agar Almidón Caseína (AAC)
a ₆ b ₁	Muestra Chimborazo < 4500 msnm	Agar AV con Vitaminas (AAV)
a ₇ b ₀	Muestra Chimborazo > 4500 msnm	Agar Almidón Caseína (AAC)
a ₇ b ₁	Muestra Chimborazo > 4500 msnm	Agar AV con Vitaminas (AAV)

Se utilizaron 6 muestras compuestas formadas a partir de suelo y arena de playa procedentes del continente Antártico y dos muestras de suelo del Chimborazo. A partir de ellas se prepararon diluciones que fueron inoculadas sobre cajas Petri que contuvieron dos medios de cultivo en estudio, Agar AV con Vitaminas (AAV) y Agar Almidón Caseína (AAC). Las cajas fueron

incubadas a 20°C. El esquema del análisis de varianza se muestra en la Tabla 10. En caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos se separaron las medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

Tabla 10. Esquema del análisis de varianza.

Fuente de Variación	Grados de libertad
Factor A	(a - 1)
Factor B	(b - 1)
AB	(a-1) (b-1)
Error	(ab)-1
Total	(ab*r)-1

Diversidad metabólica

Se estudió un factor, usando un diseño completamente aleatorizado con dos repeticiones comparando los tratamientos con un patrón (Nystatin y Rifampicina). El único factor de estudio fue la capacidad antagónica de los actinomicetes aislados, determinada para cada uno de los microorganismos modelo usados en la presente investigación. Solamente aquellos que presentaron actividad antimicrobiana fueron considerados en el análisis final, y cada uno fue considerado como un tratamiento. El esquema del análisis de varianza se muestra en la Tabla 11. En caso de encontrarse diferencias, las medias de los tratamientos fueron separadas en niveles mediante la prueba de Dunnett al 95% de significancia.

Tabla 11. Esquema del análisis de varianza.

Fuente de Variación	Grados de libertad
Tratamientos	k-1
Error	k(n-1)
Total	(k*n)-1

Además, a los actinomicetes se los clasificó de acuerdo al tipo de actividad antagónica. Aquellos considerados como bactericidas presentaron inhibición solamente a las bacterias Gram+ y Gram-. Los actinomicetes con actividad fungicida afectaron solamente a *Botrytis*, *Fusarium*,

Alternaria y *Phoma*. Finalmente, los que inhibieron el crecimiento tanto de bacterias como de hongos se los considero de amplio espectro.

3.7.3. 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 proceso en el software estadístico NTSys, usando el coeficiente de simple similitud (S_{SM}). Finalmente los porcentajes fueron utilizados para construir un dendrograma mediante el uso del algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) del mismo programa. Una vez obtenido éste gráfico, se identificó los grupos especie basados en una similitud mayor al 90%. Aquellas que compartan este valor de similitud se identificaron como miembros de un mismo grupo-especie.

Tabla 12. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes

#	Prueba	Descripción	Código
1	Forma	Circular	Cir
2		Irregular	Irr
3		Filamentosa	Fil
4		Rizoide	Riz
5	Elevación	Plana	Pla
6		Convexa	Con
7		Umbonada	Umb
8	Margen	Entero	Ent
9		Ondulado	Ond
10		Filamentoso	Flm
11		Rizado	Rzd
12	Micelio Sustrato	Light Brown	Lbr
13		Manilla	Man

Tabla 12. Continuación...

14	Micelio Sustrato	Amarillo Oro	Aor	
15		Primrose	Prm	
16		Amarillo Canario	Acn	
17		Pale Cream	Pcr	
18		Middle Brown	Mbr	
19		Current Red	Crd	
20		Amarillo Limón	Ali	
21		Biscuit	Bis	
22		Light Stone	Lst	
23		Light Buff	Lbf	
24		Light Straw	Lsw	
25		Deep Cream	Dcr	
26		Salmon Pink	Spk	
27		Very Dark Drab	Vdd	
28		Service Brown	Sbr	
29		Micelio Sustrato	Verde Glacial	Vgl
30			Beige	Bei
31			Golden Brown	Gbr
32			Rosa Té	Rte
33			Capuccino	Cap
34			Amarillo Cadmio	Acd
35			Venetian Red	Vrd
36			Incoloro	Inc
37		Micelio Aéreo	Camouflage Beige	Cbg
38			Marfil	Mar
39			Vellum	Vel

Tabla 12. Continuación....

40	Micelio Aéreo	Service Brown	Sbr	
41		Manilla	Man	
42		Very Dark Drab	Vdd	
43		Pale Cream	Pcr	
44		Blanco	Bla	
45		Light Straw	Lsw	
46		Pale Roundel Red	Prr	
47		Sky	Sky	
48		Biscuit	Bis	
49		Lavanda	Lav	
50		Lila	Lil	
51		Capuccino	Cap	
52		Esporas	Camouflage Beige	Cbg
53			Marfil	Mar
54	Vellum		Vel	
55	Amarillo Limón		Ali	
56	Light Straw		Lsw	
57	Blanco		Bla	
58	Lavanda		Lav	
59	Biscuit		Bis	
60	No Esporas		Nes	
61	Pigmento Difusible		Amarillo Canario	Acn
62		Amarillo Oro	Aor	
63		Pale Cream	Pcr	
64		Service Brown	Sbr	
65		Rosa Té	Rte	

Tabla 12. Continuación...

66	Pigmento Difusible	Light Brown	Lbr
67		Light Stone	Lst
68		Amarillo Limón	Ali
69		Light Buff	Lbf
70		Deep Cream	Dcr
71		Biscuit	Bis
72		Verde Pistache	Vpi
73		Salmón	Sal
74		Salmon Pink	Spk
75		Incoloro	Inc
76	Rango de crecimiento en función de la Temperatura	4 °C	4 °C
77		28 °C	28 °C
78		37 °C	37 °C
79	Rango de crecimiento en función del pH	4.5	4.5
80		5.5	5.5
81		6.5	6.5
82		7.5	7.5
83		8.5	8.5
84	Rango de crecimiento en función de la Salinidad	1%	1%
85		10%	10%
86		15%	15%
87	Forma de la Cadena de Esporas	R	Recta
88		F	Flexous
89		S	Espiral
90		M	Esporas Simples

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de Resultados

4.1.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales

En la Tabla A9 (Anexo A), se refieren los valores de pH, conductividad eléctrica (μS), humedad (%) y materia orgánica (%) de cada una de las muestras de suelo y arena de la Antártida, y de suelo de páramo del norte del Chimborazo utilizadas en la investigación.

4.1.2. Aislamiento selectivo de actinomicetes

Determinación de la población y diversidad bacteriana

Los resultados del conteo del número de colonias de cada muestra de suelo y arena con los diferentes medios de cultivos se muestran en la Tabla A10 (Anexo A).

La Tabla A11 (Anexo A) muestra el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco. El análisis estadístico de la varianza respecto a este parámetro se presenta en la Tabla B1 (Anexo B), en el cual se encuentra que existe diferencia significativa en el Factor A (Origen de la Muestra) y en la interacción AB (Origen de la Muestra + Medio de Cultivo). La separación de medias para el Factor A se muestra en la Tabla B2 (Anexo B), donde el valor más bajo de ufc/g de suelo seco se obtuvo en la muestra compuesta de arena de la Antártida del año 2011 en al que no existió crecimiento (a_4), mientras que la muestra de suelo de la Antártida del año 2010 obtuvo el valor mayor (a_1 ; $7,20\text{E}+03$).

En la Tabla B3 (Anexo B) se muestra la interacción AB (Origen de la Muestra + Medio de Cultivo), aquí, la separación de medias ubicó a los tratamientos a_5b_0 (Muestra Arena 2012 + AAC), a_2b_0 (Muestra Suelo 2012 + AAC), a_4b_0 (Muestra Arena 2011 + AAC) y a_4b_1 (Muestra Arena 2011 + AAV) en el nivel más bajo en los que no existieron colonias visibles, a diferencia del tratamiento a_0b_0 (Muestra Suelo 2010 + AAC), donde se obtuvo la población más alta con $1,26\text{E}+04$ ufc/g suelo seco.

En cuanto a la diversidad, la Tabla B4 (Anexo B) muestra el análisis de varianza respectivo donde el Factor A (Origen de la Muestra) y la interacción AB (Origen de Muestra + Medio de Cultivo) manifiestan diferencias altamente significativas. En la Tabla B5 (Anexo B) se separa las medias para la diversidad de actinomicetes del Factor A, en donde la muestra compuesta de

arena del año 2011 fue la que mostró el valor más bajo ($a_4: 0$), a diferencia de la muestra de suelo de la Antártida del año 2010 que registró el valor más alto ($a_0=8$).

En la tabla B6 (Anexo B) se presenta la separación de medias para la diversidad de la interacción AB (Origen de Muestra + Medio de Cultivo), donde los tratamientos a_5b_0 (Muestra Arena 2012 + AAC), a_2b_0 (Muestra Suelo 2012 + AAC), a_4b_0 (Muestra Arena 2011 + AAC) y a_4b_1 (Muestra Arena 2011 + AAV) mostraron el nivel más bajo con cero colonias, valor altamente contrastable con los tratamientos a_2b_1 (Muestra Suelo 2012 + AAV) y a_0b_0 (Muestra Suelo 2010 + AAC) que obtuvieron 14 colonias en cada uno.

4.1.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento de actinomicetes

Treinta y siete cultivos de actinomicetes fueron obtenidos y purificados a partir de los ensayos de aislamiento selectivo.

En cuanto al origen de la muestra, en el suelo de la Antártida se obtuvieron quince actinomicetes del año 2010, cuatro del 2011 y uno del 2012. Aquellas que provinieron de arena fueron tres del año 2010, ninguna del 2011 y una del 2012. En las muestras de suelo de páramo del Chimborazo, 9 colonias fueron aisladas a una altura menor de los 4500 msnm y cuatro a más de 4500 msnm.

Cabe mencionar que en cuanto al medio de cultivo utilizado para el aislamiento selectivo, se obtuvieron 24 colonias en Agar Almidón Caseína (AAC) y 13 en Agar AV con Vitaminas (AAV).

La Tabla A12 (Anexo A) indica la codificación, muestra de origen, medio de aislamiento, réplica y dilución de cada uno de los 37 actinomicetes obtenidos en la presente investigación.

En la Figura C2 (Anexo C) se muestra la distribución del número de actinomicetes aislados en función del medio de cultivo utilizado.

4.1.4. Caracterización microscópica de los cultivos de actinomicetes

En la Tabla A13 (Anexo A) se muestra la caracterización microscópica de los actinomicetes aislados, encontrándose 21 cultivos que presentan cadenas de esporas rectas, 5 con esporas simples, 2 con espirales abiertas y 9 con forma sinuosa o "flexuous".

4.1.5. Pruebas fisiológicas de crecimiento

Rango de crecimiento en función de la temperatura

La clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura se muestra en la Tabla A14 (Anexo A). De los 37 cultivos aislados, 36 se clasificaron como psicrótrofos y uno como mesófilo (Figura C3; Anexo C).

En cuanto al medio de cultivo de aislamiento, en Agar Almidón Caseína (AAC) se obtuvieron 24 colonias psicrótrofas, mientras en Agar AV con Vitaminas fueron 12 psicrótrofas y una mesófila (Tabla A16; Anexo A).

La única colonia que presentó características mesófilas provino de la muestra de suelo del norte del Chimborazo a una altura menor a 4500 msnm y fue aislada en AAV (Tabla A15; Anexo A).

Rango de crecimiento en función del pH

La clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo se muestra en la Tabla A17 (Anexo A). Del total de actinomicetes aislados, 17 presentaron características neutrófilas, 18 se clasificaron como neutrotolerantes y dos como alcalitolerantes (Figura C4; Anexo C).

En relación al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo de acuerdo al medio de aislamiento, en Agar Almidón Caseína se obtuvieron 13 neutrófilos, 11 neutrotolerantes y en Agar AV con Vitaminas, cuatro se clasificaron como neutrófilos, 7 como neutrotolerantes y dos alcalitolerantes (Tabla A19; Anexo A).

Las dos colonias que crecieron en todo el rango de pH que se analizaron provinieron de muestras de suelo de páramo del norte del Chimborazo a <4500 msnm y de arena de la Antártida del año 2010 (Tabla A18; Anexo A).

Rango de crecimiento en función de la salinidad

La clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo se muestra en la Tabla A20 (Anexo A). Del total de actinomicetes aislados, 35 se los clasificó como halófilos débiles, uno como halófilo y uno como halófilo extremo (Figura C4; Anexo C).

En cuanto al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo de acuerdo al medio de aislamiento, en Agar Almidón Caseína se obtuvieron 24 halófilos débiles

y en Agar AV con Vitaminas: 24 halófilos débiles, un halófilo y un halófilo extremo (Tabla A22; Anexo A).

En la muestra de suelo de la Antártida del año 2012 se obtuvo una colonia con características halófilas, mientras que en la muestra de suelo de páramo del norte del Chimborazo a <4500 msnm se logró aislar una colonia que se la clasificó como halófila extrema (Tabla A21; Anexo A).

4.1.6. Taxonomía numérica de datos fenotípicos

A partir de las pruebas fenotípicas aplicadas a cada actinomicete aislado en el presente estudio (Tabla B7; Anexo B), se construyó un dendrograma con una corte de similitud del 90% (Figura C6; Anexo C).

Se identificaron 23 grupos especie, de los cuales 6 incluyeron a más de un espécimen y los restantes 17 fueron individuales. Los grupos 1 y 3 fueron los más grandes con cinco y siete representantes cada uno. La Tabla A23 (Anexo A) indica los grupos especie de actinomicetes con sus respectivos miembros.

4.1.7. Capacidad Antagónica

En la Tabla A24 (Anexo A) se muestran los diámetros de inhibición de cada uno de los actinomicetes aislados en el presente estudio frente a cada uno de los microorganismos de control.

De manera general, un 97% del total de actinomicetes aislados presentó actividad antimicrobiana dentro de los 5 días de evaluación frente a al menos un microorganismo de control.

Frente a *Botrytis*, a los 3 días de actividad se obtuvo 33 cepas con halos visibles de inhibición y cuatro no presentaron ningún tipo de actividad, sin embargo, a los 5 días de crecimiento, tan sólo 5 cepas mantuvieron diámetros constantes de inhibición, un 38% disminuyó de manera parcial la efectividad del metabolito secundario secretado y un 40% perdió total capacidad antagónica.

Con *Fusarium*, en la primera evaluación a los 3 días, solo cuatro colonias de actinomicetes presentaron actividad inhibitoria, a los 5 días, tan sólo una colonia mantuvo efectividad en el antibiótico producido. Cabe recalcar que dichas cepas solo crearon hidrólisis parcial en el micelio aéreo del microorganismo patógeno de control.

En cuanto a *Alternaria* de las 35 cepas que presentaron capacidad antagónica a los 3 días, un 60% disminuyó la viabilidad del antibiótico producido a los 5 días, un 20% perdió total efectividad y un 6% aumentó el halo de inhibición.

Frente a *Phoma*, 35 platos presentaron actividad inhibitoria frente a este patógeno a los 3 días de evaluación. Sin embargo, a los 5 días un 45% disminuyó la efectividad del antibiótico secretado, un 52% mantuvo los niveles de actividad antimicrobiana y el restante 3% aumentó la longitud de los diámetros de inhibición.

La capacidad bactericida de los actinomicetes aislados mostró resultados más constantes en contraste a los arrojados por la actividad fungicida luego de la evaluación de los 5 días. En cuanto a bacterias Gram⁺ el 66% de las cepas aisladas mostró halos visibles de inhibición, y tan sólo un 20% de éste disminuyó la efectividad del metabolito secretado, el resto de actinomicetes mantuvo o aumentó dichas zonas de inhibición.

4.2. Interpretación de datos

4.2.1. Población y diversidad de actinomicetes

En cuanto al Factor A (Origen de la muestra) el valor más alto de unidades formadoras de colonias (ufc) se presentó en la muestra compuesta de suelo de la Antártida del año 2010, de esta manera se puede afirmar que las condiciones de almacenamiento de las muestras, además del tiempo en estado criogénico de las mismas no afectaron de manera evidente en la cantidad de actinomicetes aislados en el estudio. Por otro lado, los valores más bajos de ufc/gramo de suelo seco se obtuvieron en las muestras de arena de los tres años en los cuales se realizaron las XIV, XV y XVI Expediciones Ecuatorianas a la Antártida, asumiéndose que por efecto de la marea en las costas de las Islas Greenwich y Dee, además de los altos índices de salinidad y corrientes marítimas de las mismas, la población en dicha área se vea significativamente disminuida a diferencia de las muestras de suelo.

A pesar de estar estadísticamente en el mismo rango en cuanto a unidades formadoras de colonias (ufc) junto a las muestras de arena de la Antártida (Tabla B2; Anexo B), la muestra de suelo de páramo del Chimborazo (>4500 msnm) posee diferencias medioambientales significativas en cuanto a las otras de su mismo nivel: presión atmosférica, índices de salinidad, % de materia orgánica y humedad. Sin embargo, los mecanismos de adaptabilidad de microorganismos a estas alturas deben conjugarse con la temperatura ambiental además de la

disponibilidad de oxígeno en el mismo, asumiéndose tales razones para poseer niveles bajos de diversidad.

Estadísticamente, el medio de cultivo utilizado para el aislamiento selectivo (Factor B) no ejerció diferencia significativa tanto en la población como en la diversidad de colonias aisladas, sin embargo, confirmando el efecto del origen de la muestra en el resultado experimental, la interacción de ambos factores generaron valores opuestos en ciertos casos, tal fue el efecto en la muestra de suelo de 2012 donde al utilizar AAC no se obtuvo ninguna colonia, resultado opuesto al usar AAV donde el valor de diversidad fue de 14. Las muestras de arena estuvieron entre los rangos más bajos de diversidad mientras que las muestras del Chimborazo (< 4500 msnm) junto con las de suelo antártico de los años 2010 y 2012 estuvieron en los niveles más altos.

4.2.2. Caracterización fenotípica

En el momento de utilizar dos medios distintos para la caracterización macroscópica (GYM y Avena) se visualizó la capacidad de adaptabilidad, modificación fenotípica de los actinomicetes aislados -seguramente en respuesta a factores nutricionales, pH o salinidad- y la variación en cuanto a morfología, coloración de las colonias, junto a la secreción de pigmento difusible al medio.

El efecto fue mucho más notorio con la cepa JV-041 donde al utilizar Agar GYM no existió esporulación; mientras que al usar Agar Avena el metabolismo del microorganismo varió, muy probablemente por disponibilidad nutricional del medio, y se produjeron esporas visibles.

Rango de crecimiento en función de la temperatura

Aunque el principal objetivo del presente trabajo fue el de aislar actinomicetes con características psicrótrofas, ninguno de los microorganismos obtenidos tuvo esa capacidad. Tan solo un 25% de colonias creció a 4°C, además solo una fue capaz de hacerlo a 37°C. En base a este análisis se concluye que el 97% actinomicetes posee características psicrótrofas en base al rango térmico de crecimiento (desde 4 a 28 °C) mientras que el restante 3% se lo considera mesófilo por presentar crecimiento hasta los 37 °C.

La única colonia con características mesófilas proviene de la muestra de suelo de la Antártida del año 2011, es de vital importancia tener en cuenta y profundizar la búsqueda de los

mecanismos a través de los cuáles esta cepa posee esta adaptación para soportar el estrés térmico para su crecimiento.

A pesar del origen gélido de las muestras es necesario determinar las razones por las cuales un 75% de la población de actinomicetes aislados no presentó crecimiento a 4°C y si su estructura metabólica se mantiene inactiva a tal temperatura esperando una variación positiva de la misma para dar paso a su reproducción.

Rango de crecimiento en función del pH

En cuanto a la clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio, un 45% presentaron características neutrófilas y un porcentaje ligeramente superior a éste se lo consideró como neutrotolerante. Tan solo dos colonias con características alcalitolerantes fueron registradas del total de actinomicetes aislados.

Según Solans & Vobis (2003) el pH de crecimiento de actinomicetes se encuentra entre 5 y 9, aunque el óptimo se encuentra cerca al neutro, cabe recalcar que el 100% de colonias aisladas creció a un pH de 6.5; un 40% a 7.5 y un 5% hasta 8.5; de esta manera se infiere que la mayoría de cultivos obtenidos tiene tendencia a desarrollarse en pH ligeramente ácido.

Rango de crecimiento en función de la salinidad

Los resultados casi nulos en cuanto a resistencia osmótica en los actinomicetes aislados en el estudio (95% del total únicamente tienen propiedades halófilas débiles) tiene proporcionalidad directa con las escasas cepas aisladas de arena de playa de la Antártida. Sin embargo, es importante resaltar la presencia de una colonia con características halófilas extremas que proviene de suelo de páramo del Chimborazo (<4500 msnm), la cual muy probablemente, junto con la modificación metabólica y estructural a nivel celular para adaptarse a las condiciones medioambientales del entorno, creó un sistema de regulación osmótica que le permite soportar tales niveles de NaCl en el medio de cultivo.

4.2.3. Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Tomando como base el análisis de datos fenotípicos y pruebas fisiológicas de crecimiento, se obtuvo 23 grupos especie -con un corte de similitud al 90%- de 37 cepas aisladas de la Antártida y el Chimborazo. El dendrograma obtenido se basa en la comparación de 90 características,

disminuyendo así errores de percepción en cuanto a coloración de las colonias o caracterización macroscópica de las mismas.

Cabe recalcar que tan sólo 6 grupos especie poseen dos miembros o más, y de éstos, el primer y tercer grupo son los que más entes tienen con 5 y 7 en cada caso. Los 17 restantes se los considera como individuales.

Sin embargo, dentro del segundo grupo existen dos cepas –JV-013 y JV-019– del Suelo de la Antártida y del Chimborazo, respectivamente, que comparten características fenotípicas en un 96,5% a pesar de tener orígenes totalmente diferentes. Es recomendable en este caso realizar un secuenciamiento genético o pruebas de biología molecular para determinar hasta que punto son similares dichas colonias aisladas.

Estas técnicas son útiles en el momento de decidir con qué microorganismos trabajar en pruebas de alcance biotecnológico a nivel piloto para poder así evitar el uso de cepas “repetidas” y aprovechar de manera eficiente recursos económicos y naturales en estos procesos.

4.2.4. Capacidad Antagónica

A pesar de que el 97% de las cepas aisladas mostraron capacidad inhibitoria a microorganismos de control en alguna de las etapas de evaluación, tan solo un 35% del total logró mantener o aumentar los halos existentes de inhibición luego de los 3 días de haber realizado la siembra.

Según Procópio *et al.* (2012), debido al historial de producción mundial de antibióticos y el desarrollo de los mismos, los compuestos bioactivos aislados del género *Streptomyces* abarcan el 80% de los fármacos de éste tipo que se encuentran el mercado, por tal motivo se ha intensificado el desarrollo y búsqueda de nuevas cepas que tengan dicha capacidad de secreción de estos metabolitos secundarios. Razón por la cual es necesaria una caracterización molecular de las colonias de actinomicetes que han demostrado esta capacidad antagónica frente a microorganismos fitopatógenos y de control para ubicarlos dentro de este género o si estamos frente a nuevos organismos.

Además, es necesario identificar y aislar el compuesto bioactivo responsable de crear inhibición, de esta manera al sintetizar dicha molécula y al combinarlas con otras que posean similares propiedades, muy probablemente la eficiencia bactericida o fungicida va a aumentar.

4.2.4. Discusión general del trabajo

El presente trabajo buscó determinar la diversidad tanto biológica como metabólica de actinomicetes presentes en ecosistemas glaciares, para esto, la metodología utilizada permitió alcanzar correctamente dichas metas. El estudio de dos factores sumamente importantes como el origen de la muestra y el medio de cultivo para el aislamiento selectivo arrojó resultados importantes en cuanto a posibles nuevas cepas de actinomicetes y la utilización de éstos como herramientas biotecnológicas.

Se logró aislar 37 colonias de actinomicetes en cultivo puro. De los cuales el 54% se obtuvo del suelo de la Antártida, un 11% de arena de playa y el restante 35% del páramo del Chimborazo. La diferencia de diversidad en cuanto al origen de la muestra se demostró estadísticamente y muy probablemente condiciones medioambientales externas como presión, disponibilidad de oxígeno; además de factores climatológicos o corrientes marítimas incidieron de manera significativa en estos resultados.

A pesar de que se esperaba obtener en su mayoría colonias de actinomicetes psicrófilas, ninguna de éstas presentó esta característica y el 100% de cultivos presentó crecimiento hasta 28 °C y una mostró capacidad de reproducción hasta 37 °C. Esto motiva a la búsqueda de las razones por la cuales organismos cuyo origen presenta condiciones térmicas extremadamente bajas logran resistir un estrés térmico relativamente elevado.

La sección pertinente a caracterización macro y microscópica junto con pruebas fisiológicas de crecimiento permitió construir un dendrograma con un corte de similitud al 90%, el mismo que clasificó a las cepas en 23 grupos especie. De esta manera, en comparación con el trabajo investigativo de Garzón (2013), el aumento de la diversidad biológica es considerable, tomando en cuenta que en aquel trabajo se obtuvieron tan solo 11 cultivos de actinomicetes clasificados en 5 grupos especie.

Es importante mencionar que dos colonias, cuyo origen es totalmente distinto (suelo de la Antártida y suelo de páramo del Chimborazo), presentaron características fenotípicas y fisiológicas similares en un 95%. Es recomendable realizar una caracterización molecular de dichas cepas para confirmar los resultados preliminares obtenidos en el dendrograma (Figura C5; Anexo C).

Nedialkova & Naidenova (2004) afirman que la actividad antagónica a microorganismos de control en cepas aisladas de la Antártida fueron positivas entre un 40 – 60%, mientras que en la presente investigación este porcentaje fue considerablemente superior (97%). El alto porcentaje

de capacidad antimicrobiana comprende una amplia gama de productos metabólicos útiles para su potencial uso en el campo biotecnológico.

Los resultados obtenidos dentro de este análisis son pruebas fehacientes de la diversidad metabólica que presentaron las cepas de actinomicetes aisladas de la Antártida y del Chimborazo y de la capacidad de producción de compuestos bioactivos eficientes.

Actualmente la resistencia a antibióticos es un problema real en la sociedad actual, el uso excesivo de éstos básicamente nos ha llevado, en un abrir y cerrar de ojos, a desperdiciar la oportunidad de combatir enfermedades de manera eficiente (tuberculosis, malaria e incluso plagas en el campo agrícola), por tal motivo, es necesario empezar a considerar a los antibióticos como recursos naturales y empezar a hacer un mejor uso de ellos. Investigaciones en ecosistemas poco explotados permitirán obtener un espectro más amplio en cuanto a diversidad de compuestos bioactivos que puedan mejorar dicha eficiencia y de esta manera prolongar la carrera que llevamos contra microorganismos patógenos.

4.3. Verificación de la hipótesis

4.3.1. Hipótesis nula (H_0)

- Los actinomicetes recolectados de muestras de suelo de ecosistemas glaciares de la Antártida y norte del Chimborazo no poseen diversidad biológica y metabólica.

4.3.2. Hipótesis alternativa (H_1)

- Los actinomicetes recolectados de muestras de suelo de ecosistemas glaciares de la Antártida y norte del Chimborazo poseen diversidad biológica y metabólica.

Después del análisis de los resultados obtenidos en cuanto a la población y diversidad de los cultivos de actinomicetes aislados, características macro y microscópicas, pruebas fisiológicas de crecimiento, similitud fenotípica y pruebas de antagonismo microbiano, se acepta la hipótesis alternativa (H_1) afirmando que en las muestras de suelo y arena de la Antártida, así como en las del norte del Chimborazo existe diversidad biológica y metabólica de actinomicetes.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se aislaron 37 cepas de actinomicetes en cultivo puro de las muestras medioambientales de suelo y arena de la Antártida y del norte del Chimborazo.
- La distribución espacial de los cultivos obtenidos presentó 20 colonias de suelo y 4 de arena, ambas provenientes de la Antártida; además 13 fueron de muestras recolectadas del páramo del Chimborazo.
- Microscópicamente, un 57% presentó cadenas de esporas rectas, un 25% de forma sinusoidal, un 5% en espiral y un 13% como esporas simples.
- Del total de actinomicetes aislados ninguno presentó características psicrófilas. El 97% de cultivos mostró un comportamiento psicrótrofo y una colonia tuvo la capacidad de crecer hasta 37 °C.
- Taxonómicamente, los 37 actinomicetes aislados fueron ubicados en 23 grupos especie basados en una similitud del 90%. Seis de éstos incluyeron a más de un espécimen y los restantes 17 fueron individuales. Los grupos 1 y 3 fueron los más grandes con cinco y siete representantes cada uno.
- Se obtuvo dentro de un mismo grupo-especie dos cepas –JV-013 y JV-019– del Suelo de la Antártida y del Chimborazo, respectivamente, que comparten características fenotípicas en un 96,5% a pesar de tener orígenes totalmente diferentes.
- La capacidad antagónica de las colonias aisladas fue positiva en un 97% en alguna de las etapas de evaluación en al menos un microorganismo de control. Sin embargo, tan solo un 35% del total logró mantener o aumentar los halos de inhibición luego de los 3 días de la primera evaluación

5.2. Recomendaciones

- Caracterizar molecularmente las cepas aisladas de actinomicetes en el estudio para corroborar los resultados obtenidos en las pruebas de taxonomía numérica.

- Promover la investigación en ecosistemas glaciares del Ecuador para conocer la biodiversidad de actinomicetes como herramientas de uso potencial en el área biotecnológica.
- Ampliar las pruebas de capacidad antagónica de los actinomicetes aislados con diferentes microorganismos patógenos y de control para ampliar el rango de utilidad de dichos productos metabólicos.

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos informativos

6.1.1. Título

Determinación de la diversidad biológica y metabólica de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares.

6.1.2. Instituciones ejecutoras

Universidad Técnica de Ambato

6.1.3. Beneficiarios

Investigadores y estudiantes universitarios del Ecuador. Empresas públicas o privadas, centros e instituciones de investigaciones microbiológicas que se encuentren relacionadas a la obtención de nuevos productos con aplicación biotecnológica.

6.1.4. Ubicación

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

Av. Los Chasquis y Río Payamino. Ciudadela Huachi Chico. Ambato-Ecuador.

6.1.5. Tiempo estimado para la Ejecución

Seis meses

6.1.6. Equipos técnico responsable

Investigadores, docentes y estudiantes que se encuentren trabajando en la determinación de la diversidad biológica y metabólica de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares.

6.2. Antecedente de la propuesta

El uso extenso y excesivo de los antibióticos en los últimos 20 años ha generado un nuevo rompecabezas para los sistemas de salud y laboratorios de investigación: la resistencia bacteriana a estos fármacos. El sector agrícola y médico ya han empezado a mostrar los

primeros síntomas de este problema a nivel mundial: tratamientos ineficaces, demora en los tiempos de recuperación de pacientes, aumento de plagas y pandemias. Si bien es imposible ganar esta batalla inminente, existen tecnologías y métodos para prolongar o atrasar este proceso.

Una de las soluciones a este obstáculo se basa en la investigación “Diversidad biológica y metabólica de actinomicetes aislados de suelo y arena de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo”, donde se demostró que en ambientes que se creían inhóspitos, existe una amplia variedad de microorganismos con alto potencial biotecnológico, especialmente aquellos que presentan adaptaciones especiales a sus sistemas metabólicos y enzimáticos, los mismos que pueden ser útiles para el descubrimiento de nuevos antibióticos.

6.3. Justificación

El trabajo investigativo “Diversidad biológica y metabólica de actinomicetes aislados de suelo y arena de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo” evidenció una amplia variedad de microorganismos presentes en estos ambientes, los mismos que sustentan la validez de la metodología utilizada para el aislamiento y determinación de la capacidad antagonista de éstos. Esta técnica puede ser aplicada a zonas del planeta que tienen un mínimo porcentaje de exploración tales como el Océano Ártico, la Meseta Central Siberiana o el Desierto de Gobi. A partir de los resultados que se obtengan se podrá obtener microorganismos que aporten significativamente en la búsqueda de nuevos compuestos antibióticos en esta época donde la resistencia bacteriana y fúngica es un problema que necesita resultados urgentes.

6.4. Objetivos

6.4.1. General

-Estructurar un protocolo de aislamiento de actinomicetes para la determinación de su capacidad antagonista provenientes de ecosistemas glaciares.

6.4.2. Específicos

- Aislar selectivamente actinomicetes de diversas muestras de suelo provenientes de ambientes glaciares.

- Obtener actinomicetes productores de compuestos bioactivos para su uso potencial en biotecnología.

6.5. Análisis de factibilidad

Los resultados obtenidos en la investigación “Diversidad biológica y metabólica de actinomicetes aislados de suelo y arena de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo” aseguran la viabilidad de esta propuesta en virtud de que la metodología utilizada es aplicable en muestras provenientes de diferentes niveles/zonas gélidas del planeta. La variedad de microclimas y condiciones medioambientales específicas de cada muestra aseguran una amplia gama de nuevos antibióticos aplicables al sector biotecnológico.

6.6. Fundamentación

La investigación “Diversidad biológica y metabólica de actinomicetes aislados de suelo y arena de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo”, es la base científica para la formulación de la siguiente propuesta.

6.7. Metodología – Modelo Operativo

6.7.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales

Determinación del pH y Conductividad de las muestras

Para determinar el pH y conductividad eléctrica se pesará 20 gramos de cada muestra, se colocará cada una en un vaso de precipitación de 100 ml, se añadirá 50 ml de agua destilada, y se homogenizarán las muestras durante 5 minutos. Las muestras se dejarán en reposo por una hora. Una vez transcurrido ese tiempo, se tomarán las lecturas correspondientes de las muestras, con la ayuda de un pH-metro y un conductímetro.

Determinación del porcentaje de humedad de las muestras

Para determinar el porcentaje de humedad se pesarán previamente cápsulas de porcelana y se colocarán en éstas 5 gramos de cada tipo de suelo, finalmente se registrará el peso total (Peso 1).

Las cápsulas de porcelana con las muestras se colocarán en una estufa a 105° C por 24 horas. Cuando las muestras se hayan enfriado se pesará nuevamente (Peso 2). El porcentaje de humedad será determinado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{Peso}_1 - \text{Peso}_2}{\text{Peso}_2} \times 100$$

El porcentaje de humedad involucra únicamente los pesos de agua y suelo de las muestras, por lo que el peso de la cápsula de porcelana deberá ser restado.

Determinación del porcentaje de materia orgánica

Para la determinación del porcentaje de materia orgánica se pesarán cápsulas de porcelana vacías y secas, en cada una se colocará 5 gramos de suelo de cada muestra, se colocarán en una estufa a 105°C por 24 horas. Cuando las muestras se hayan enfriado se pesarán nuevamente (Peso 1). Las cápsulas de porcelana con las muestras procedentes de la estufa se colocarán en una mufla, a 400°C por 3 horas. Cuando las muestras se han enfriado se obtendrá el peso final (Peso 2). El porcentaje de materia orgánica será determinado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{M.O} = \frac{\text{Peso}_1 - \text{Peso}_2}{\text{Peso}_2} \times 100$$

Para calcular porcentaje de materia orgánica únicamente se registrarán los pesos de agua y suelo de las muestras, por lo que el peso de la cápsula de porcelana deberá ser restado.

6.7.2. Aislamiento selectivo de actinomicetes

Determinación de la población y diversidad de actinomicetes

De cada una de las muestras se prepararán diluciones sucesivas utilizando el método de difusión en placa. Para preparar la dilución 1/10 se pesará 10 gramos de suelo y se colocará en una botella que contenga 90 ml de agua de llave estéril, esta suspensión se agitará por 1 hora. A partir de esta dilución se prepararán las diluciones 1/10² y 1/10³. Se colocarán 100 microlitros (100 µl) de las diluciones 1/10² y 1/10³ en cajas Petri con Agar AV con Vitaminas (AAV) y Agar

Almidón Caseína (AAC), cada uno suplementado con nystatin, a una concentración de 75 ug/ml, y ajustando su pH a 7,0. Se extenderá esta alícuota por la superficie de cada caja con un asa de Digralsky. Este procedimiento se realizará por duplicado y para cada tipo de suelo. Las cajas inoculadas serán incubadas a 20°C durante 2 semanas. Transcurrido el periodo se contará el número de colonias de actinomicetes presentes en cada caja. El número de ufc/gramo de suelo se calculará para aquellas diluciones en las que el número de colonias se encuentre en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g de suelo} = \frac{N \times \text{FD} \times V_t}{V_i \times S}$$

Donde:

- N** Número de colonias
- FD** Dilución en la cual se contó N (Eg: Conteo realizado en la dilución 1/10³, FD = 1x10³)
- V_t** Volumen de la dilución 1/10, en mililitros
- V_i** Volumen inoculado, en mililitros
- S** Cantidad de suelo utilizada para preparar la dilución 1/10

Aislamiento, purificación y almacenamiento de actinomicetes

Las cajas Petri que presenten crecimiento visible y diversidad de colonias se utilizarán para el aislamiento y purificación de las cepas. Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomará una porción de una colonia para inocularla mediante estría simple en platos tetrapetri que contengan Agar AV con Vitaminas (AAV) y Agar Almidón Caseína (AAC). Los platos serán incubados a nuevamente a 20°C. Los cultivos puros serán replicados en estría compuesta e incubados por una semana. Aquellos que después del período de incubación presenten características de cultivo puro serán etiquetados y almacenados en tubos plásticos que contengan 1 mililitro de glicerol al 20% (w/v) y almacenados a -10°C para su preservación.

Caracterización macroscópica

Los cultivos puros obtenidos se sembrarán en dos medios de cultivo diferentes: Agar GYM y Agar Avena, se agruparán de acuerdo a la coloración del micelio aéreo, micelio de sustrato,

esporas, pigmento difusible y la morfología de las colonias, los que se determinarán usando tablas estándar de colores. Además se analizará la forma, elevación y margen de las colonias.

Caracterización microscópica

Para determinar la morfología de las cadenas de esporas en los cultivos que presenten micelio aéreo se colocará un cubreobjetos estéril sobre el cultivo con la ayuda de una pinza estéril. Luego el cubreobjetos con el micelio adherido se colocará en un portaobjetos de manera que el micelio quede en contacto con el portaobjetos. Se determinará el tipo de estructura usando un microscopio con el lente de inmersión 100X.

6.7.3. Pruebas fisiológicas de crecimiento

Identificación de actinomicetes psicrótrofos

Se inocularán 5 µl de suspensiones de esporas sobre la superficie de cada medio de cultivo y serán incubados a 4°C, 20°C y 28°C. Se evaluará el crecimiento de los actinomicetes mediante código binario asignando 1 si presenta crecimiento visible, en caso contrario; en ausencia de crecimiento, 0. Un actinomicete será considerado como psicrófilo si crece solamente a 4 y 20°C. Aquellos que crezcan en las tres temperaturas serán clasificados como psicrótrofos, mientras que serán mesófilos si crecen a 20°C y 28°C, en cuyo caso también se determinará su crecimiento a 37°C.

Rango de crecimiento en Función del pH

Se inocularán 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de cada medio de cultivo, ajustado a los pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5 mediante sistema de buffers. Las cajas serán incubadas durante una semana a 20 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluará el crecimiento de los actinomicetes mediante código binario. A la presencia de crecimiento se le asignará 1 y en ausencia de crecimiento, 0.

Rango de crecimiento en Función de la salinidad

Se inocularán 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de cada medio de cultivo, que contenga 1, 10 y 15% de NaCl (w/v). Las cajas se incubarán durante una semana a 20 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluará el crecimiento de los actinomicetes mediante código binario. A la presencia de crecimiento se le asignará 1 y en ausencia de crecimiento, 0.

6.7.4. Determinación de la actividad antimicrobiana.

Preparación de los platos con los microorganismos modelo.

Cultivos de los hongos fitopatógenos *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Phoma* serán inoculados en agar papa dextrosa (PDA), y dos bacterias, una Gram positiva y la otra Gram negativa, serán inoculadas en agar nutritivo (AN). Los hongos se incubarán a 28°C durante 4 días.

En la primera etapa se prepararán suspensiones con las estructuras reproductivas de los hongos y bacterias transfiriendo esporas (hongos) o células (bacterias) a un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina estéril. Con la ayuda de un hemocitómetro, en el caso de hongos, y una placa para conteo de bacterias (Petroff – Hausser chamber), se determinará la concentración inicial de cada uno de los microorganismos. Finalmente se calculará el volumen de inóculo necesario para obtener concentraciones finales de 1×10^5 células/ml para las bacterias, y 1×10^3 esporas/ml para los hongos fitopatógenos.

Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica.

Utilizando un sacabocados de 6mm de diámetro, se extraerán bloques cilíndricos del micelio de cada cultivo puro de actinomicetes. Se depositarán 4 bloques pertenecientes a cuatro actinomicetes diferentes sobre la superficie de los platos de cultivo con los microorganismos modelo, situando la parte del micelio del actinomicete en contacto con el medio para permitir una mejor difusión de los posibles metabolitos producidos. Además se prepararán platos en los que se colocarán círculos de papel con nystatin (75 µg/ml) y rifampicina (3.33 µg/ml), como control experimental para los ensayos de hongos y bacterias respectivamente. Los platos preparados serán incubados a 20 °C por 7 días, y los perfiles de actividad biológica se determinarán midiendo los diámetros, tanto polar como ecuatorial, de las zonas de inhibición, en milímetros, de aquellos actinomicetes que mostraron actividad antimicrobiana.

6.8. Administración

(ver página siguiente).

Tabla 13. Administración

INDICADORES A MEJORAR	SITUACIÓN ACTUAL	RESULTADOS ESPERADOS	ACTIVIDADES	RESPONSABLES
Metodologías selectivas para la determinación de la capacidad antagónica de los actinomicetes	Limitado conocimiento de la actividad antimicrobiana de los actinomicetes. Desconocimiento del campo de aplicación de los compuestos bioactivos aislados de actinomicetes	Identificación de nuevos compuestos bioactivos provenientes de actinomicetes Identificación de nuevos campos de intervención biotecnológicos de los antibióticos producidos por actinomicetes.	Instalación de experimentos para determinar la capacidad antagónica de los microorganismos aislados <i>in vitro</i> e <i>in situ</i> .	Docentes Investigadores Estudiantes

6.9. Previsión de la evaluación

Tabla 14. Previsión de la evaluación

PREGUNTAS BÁSICAS	EXPLICACIÓN
¿Quiénes solicitan evaluar?	Docente Investigador
¿Por qué evaluar?	Genera información acerca de los mecanismos de adaptación y funcionalidad de microorganismos presentes en ambientes glaciares.
¿Para qué evaluar?	Para determinar la diversidad biológica y metabólica de actinomicetes existente en diferentes ecosistemas glaciares.
¿Qué evaluar?	Datos obtenidos a partir de las pruebas de taxonomía numérica. Actividad antimicrobiana.

Tabla 14. Continuación...

¿Quién evalúa?	Docente
¿Cuándo evaluar?	Al finalizar las pruebas de taxonomía numérica. Al obtener radios visibles de inhibición microbiana.
¿Cómo evaluar?	Realizando una matriz de código binario. Comparando los radios de inhibición con los patrones específicos para cada microorganismo
¿Con qué evaluar?	Programa NTSYS e Infostat (análisis estadístico)

BIBLIOGRAFÍA

1. **ADEGBOYE, M. 2012.** Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *African Journal of Agricultural Research*. 7 (15), 2255-2261 pp.
2. **ANTARCTIC CLIMATE & ECOSYSTEMS COOPERATIVE RESEARCH CENTRE (ACECRC). 2014.** Antarctic Sea Ice and IGS. Australia.
3. **ANTARCTIC TREATY CONSULTATIVE MEETING (ACTM). 2006.** Argentine Activities Of Bioprospecting And Biorremediation In Antarctica.
4. **BALTZ, R. 2008.** Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology*, 8, 557-563 pp.
5. **BLODGETT, J.; DONG-CHAN, O.; CAO, S.; CURRIE, C.; KOLTER, R.; CLARDY, J. 2008.** Common biosynthetic origins for polycyclic tetramate macrolactams from phylogenetically diverse bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 107 (26): 11692-11697 pp.
6. **CONSONNI, V.; TODESCHINI, R. 2012.** New Similarity Coefficients for Binary Data. Milano Chemometrics and QSAR Research Group. University of Milano-Biocca, Italy.
7. **CORTEZ, C. 1998.** Aislamiento, caracterización morfológica y evaluación preliminar de la actividad antagónica de actinomycetes de la rizósfera de *Culcitium rufescens* (oreja de conejo) y *Stipa ichu* (paja) en suelos del Chimborazo. Riobamba – Ecuador. 22, 25-34 pp.
8. **DRAGOMIRESCU, L.; POSTELNICU, T. 1994.** Specific Numerical Taxonomy Methods In Biological Classification. *Statistical tools in human biology*. 31-35 pp.
9. **DUNN, G.; EVERITT, B. 1982.** An Introduction to Mathematical Taxonomy. *Cambridge Studies in Mathematical Biology*, 26-40 pp.
10. **FLÄRDH, K.; BUTTNER, M. 2009.** *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews: Microbiology*, 7, 36-49 pp.

11. **GARZÓN, D. 2013.** Determinación de la Biodiversidad Microbiana en Ecosistemas Glaciares de la Antártida. Ambato – Ecuador. 18-26, 39, 99 pp.
12. **GOUNOT, M. 1986.** Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia*, 42, 1192-1197 pp.
13. **GOUSTEROVA, A.; PASKALEVA, D.; VASILEVA-TONKOVA, E. 2014.** Characterization of Culturable Thermophilic Actinobacteria from Livingston, Antarctica. *International Research Journal of Biological Sciences*, 3, 30-36 pp.
14. **LEÓN-YÁNEZ, S. 2011.** La Flora de los Páramos Ecuatorianos. *Páramo: Paisaje estudiado, habitado, manejado e institucionalizado*. 25-39 pp.
15. **INSTITUTO ANTÁRTICO ECUATORIANO (INAE). 2006.** Ecuador jerarquiza la ciencia y los asuntos antárticos. *Ecuador Antártico*, 1, 18-19 pp.
16. **KUMARI, M.; MYAGMARJAV, B.; PRASAD, B.; CHOUDHARY, M. 2013.** Identification and Characterization of Antibiotic - Producing Actinomycetes Isolates. *American Journal Microbiology*, 4, 24-31 pp.
17. **MARINEBIO CONSERVATION SOCIETY (MBCS). 2014.** The Arctic and Antarctic. MarineBio.org.
18. **MONCHEVA, P.; TISHKOV, S.; DIMITROVA, N.; CHIPEVA, V.; ANTONOVA-NIKOLOVA, S.; BOGATZVESKA, N. 2000.** Characteristics of Soil Actinomycetes from Antarctica. *Journal of Culture Collections*, 3, 3-14 pp.
19. **NEDIALKOVA, D.; NAIDENOVA, M. 2004.** Screening the Antimicrobial Activity of Actinomycetes strain isolates from Antarctica. *Journal of Culture Collections*, 24, 29-35 pp.
20. **PAN, S.; TAN, G.; CONVEY, P.; PEARCE, D.; TAN, I. 2013.** Diversity and bioactivity of actinomycetes from Signy Island terrestrial soils, maritime Antarctic. *Advances in Polar Science*, 24, 208-212 pp.

21. **PANDEY, B.; GHIMIRE, P.; AGRAWAL, V. 2004.** Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal. Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal.
22. **PHILIPS, L. 1994.** Manual de Actinomycetes. 150 pp.
23. **PODWOJEWSKI, P.; POULENARD, J. 2011.** Los Suelos de los Páramos de Ecuador. *Páramo: Paisaje estudiado, habitado, manejado e institucionalizado*. 63-80 pp.
24. **PROCÓPIO, R.; DA SILVA, I.; MARTINS, M.; DE AZEVEDO, J.; DE ARAUJO, J. 2012.** Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 466-471 pp.
25. **RAUSCH, S. 2012.** Investigation of the antibacterial activity and the biosynthesis gene cluster of the peptide antibiotic feglymycin. Technischen Universität Berlin, Deutschland.
26. **RUSSELL, N. 2006.** Antarctic micro-organisms: coming in from the cold. *Culture*, 27, 1-4 pp.
27. **SECRETARÍA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO (SENPLADES). 2013.** Plan Nacional del Buen Vivir 2013-2017. 221-242 pp, 327-333 pp.
28. **SHARON, G. 2010.** Secondary metabolite production by *Streptomyces* *in situ* and *in vivo*. Dept. of Molecular Microbiology and Biotechnology, Tel Aviv University, Israel.
29. **SIVAKUMAR, K. s/f.** Actinomycetes. Centre of Advanced Study in Marine Biology. Annamalai University, India.
30. **SOLANS, M. & VOBIS, G. 2003.** Actinomycetes saprofiticos asociados a la rizósfera y rizoplano de *Discaria trinervis*. *Ecología Austral*, 13, 97-107 pp.
31. **TAHA, M.; DREW, G.; TAMER, A.; ALDRED, D.; LONGHURST, P.; POLLARD, S. 2007.** Enumerating actinomycetes in compost bioaerosols at source – use of soil compost agar to address plate ‘masking’. *Atmospheric Environment*, 41, 4759-4765 pp.
32. **TAKEUCHI, N. 2014.** Glacial Ecosystems. School of Science, Chiba University. Japan.

- 33. VINUEZA, A. 2010.** Determinación de la relación entre las características fenotípicas y genotípicas de actinomicetes como mecanismo de dereplicación de microorganismos útiles en biotecnología. Ambato - Ecuador. 46 - 51 pp.
- 34. WILMOTTE, A.; VYVERMAN, W.; WILLEMS, A.; VERLEYEN, E.; PEETERS, K.; OBBELS, D.; SOUFFREAU, P.; DE CARVALHO, D. 2012.** Antarctic Microbial Biodiversity: The Importance of Geographical and Ecological Factors. Belgian Science Policy.

ANEXO A

DATOS EXPERIMENTALES

TABLA A1. Origen de muestras de suelo – Arena Antártida 2010

Código	Lugar de Recolección	Fecha de Recolección
ANT004	Sedimentos de Arena – Glaciar Quito EPVN	10 – Enero – 2010
ANT005	Punta Ambato – Algas	11 – Febrero – 2010
ANT011	Barrientos – Arena	09 – Enero – 2010
ANT012	Barrientos – Arena de Arena 05	12 – Enero – 2010
ANT015	Arena Río Culebra – Algas	14 – Febrero – 2010

TABLA A2. Origen de muestras de suelo – Suelo Antártida 2010

Código	Lugar de Recolección	Fecha de Recolección
ANT001	Cerca PEVIMA – Suelo Puyango – Líquenes verdes	09 – Enero – 2010
ANT002	Cerro Puyango	09 – Enero – 2010
ANT007	Meseta Punta Ambato 03	10 – Febrero – 2010
ANT010	Barriente 03 – Cubierta vegetal de musgos	10 – Enero – 2010
ANT016	Cerro Puyango - Musgo	10 – Enero – 2010

TABLA A3. Origen de muestras de suelo – Arena Antártida 2011

Código	Lugar de Recolección	Fecha de Recolección
M5 (136-137)	Arena de Arena – Barrientos	09 – Febrero – 2011
M7 (139-140)	Arena de Arena – Barrientos	09 – Febrero – 2011
M8 (141)	Arena de Arena – Sector Elefantes Marinos Parte de Atrás – Barrientos	09 – Febrero – 2011
M9 (142)	Arena de Arena – Marea Baja – Barrientos	09 – Febrero – 2011
M16 (154)	Arena de Arena – Punta Ambato	09 – Febrero – 2011

TABLA A4. Origen de muestras de suelo – Suelo Antártida 2011

Código	Lugar de Recolección	Fecha de Recolección
M1 (102-103)	Suelo Bajo Musgos	29 – Enero – 2011
M6 (138)	Suelo Bajo Musgos – Barrientos	09 – Febrero – 2011
M12 (146)	Musgo – Suelo Pedregoso – Torres	11 – Febrero – 2011
M13 (147)	Suelo Bajo Cubierta de Líquenes – Torres	11 – Febrero – 2011
M22 (193)	Líquenes Roca – Base Puyango	20 – Febrero – 2011
M23 (194)	Líquenes Suelo Pedregoso - Puyango	20 – Febrero – 2011

TABLA A5. Origen de muestras de suelo – Arena Antártida 2012

Código	Lugar de Recolección	Fecha de Recolección
509	Arena de Arena – Punta Ambato	27 – Febrero – 2012
510	Arena asociada a algas – Barrientos	23 – Febrero – 2012
512	Arena de Arena – Algas – Barrientos	23 – Febrero – 2012
518 (47)	Arena de Dee	24 – Febrero – 2012
520 (105)	Arena de Arena – Roberts	24 – Febrero – 2012

TABLA A6. Origen de muestras de suelo – Suelo Antártida 2012

Código	Lugar de Recolección	Fecha de Recolección
514 (119)	Suelo bajo musgos – Barrientos	23 – Febrero – 2012
515 (109)	Suelo pasto – Torres	24 – Febrero – 2012
519 (106)	Suelo rico en materia orgánica debajo de musgo – Pedregoso – Roberts	24 – Febrero – 2012
522 (111)	Suelo bajo líquenes - Torres	24 – Febrero – 2012
523 (118)	Suelo de líquenes – Punta Ambato	27 – Febrero – 2012
525	Muestra 2 asociada a planta vascular – Cima Puyango	03 – Marzo – 2012
526	Muestra 1 asociada a líquenes – Cima Puyango	03 – Marzo – 2012

TABLA A7. Origen de muestras de suelo – Suelo Chimborazo (Altura 1)

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

TABLA A8. Origen de muestras de suelo – Suelo Chimborazo (Altura 2)

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

TABLA A9. Características físico-químicas de las muestras medioambientales

Muestra	pH	Conductividad (μS)	% Humedad	% Materia Orgánica
Arena Antártida 2010	7,43	2185	4,946	3,004
Suelo Antártida 2010	8,63	185	3,485	6,884
Arena Antártida 2011	8,03	2204	10,383	3,441
Suelo Antártida 2011	7,27	204	3,703	3,678
Arena Antártida 2012	8,01	2064	5,652	7,445
Suelo Antártida 2012	7,25	192	4,419	5,423
Chimborazo A1	8,59	562	56,080	13,683
Chimborazo A2	8,32	451	47,380	8,889

TABLA A10. Número de colonias de actinomicetes obtenidos de los platos del aislamiento selectivo.

Muestra	Medio	Réplica	Dilución	N
Suelo 2010	AAC	1	1/10	18
Suelo 2010	AAC	2	1/10	10

TABLA A10. Continuación...

Suelo 2010	AAV	1	1/10	3
Suelo 2010	AAV	2	1/10	1
Suelo 2010	AAC	1	1/100	0
Suelo 2010	AAC	2	1/100	2
Suelo 2010	AAV	1	1/100	0
Suelo 2010	AAV	2	1/100	0
Suelo 2010	AAC	1	1/1000	0
Suelo 2010	AAC	2	1/1000	0
Suelo 2010	AAV	1	1/1000	0
Suelo 2010	AAV	2	1/1000	0
Suelo 2011	AAC	1	1/10	0
Suelo 2011	AAC	2	1/10	2
Suelo 2011	AAV	1	1/10	3
Suelo 2011	AAV	2	1/10	5
Suelo 2011	AAC	1	1/100	0
Suelo 2011	AAC	2	1/100	0
Suelo 2011	AAV	1	1/100	1
Suelo 2011	AAV	2	1/100	1
Suelo 2011	AAC	1	1/1000	0
Suelo 2011	AAC	2	1/1000	0
Suelo 2011	AAV	1	1/1000	0
Suelo 2011	AAV	2	1/1000	0
Suelo 2012	AAC	1	1/10	0
Suelo 2012	AAC	2	1/10	0
Suelo 2012	AAV	1	1/10	14
Suelo 2012	AAV	2	1/10	13
Suelo 2012	AAC	1	1/100	0
Suelo 2012	AAC	2	1/100	0
Suelo 2012	AAV	1	1/100	2
Suelo 2012	AAV	2	1/100	4

TABLA A10. Continuación...

Suelo 2012	AAC	1	1/1000	0
Suelo 2012	AAC	2	1/1000	0
Suelo 2012	AAV	1	1/1000	0
Suelo 2012	AAV	2	1/1000	0
Arena 2010	AAC	1	1/10	0
Arena 2010	AAC	2	1/10	2
Arena 2010	AAV	1	1/10	1
Arena 2010	AAV	2	1/10	1
Arena 2010	AAC	1	1/100	0
Arena 2010	AAC	2	1/100	0
Arena 2010	AAV	1	1/100	0
Arena 2010	AAV	2	1/100	0
Arena 2010	AAC	1	1/1000	0
Arena 2010	AAC	2	1/1000	0
Arena 2010	AAV	1	1/1000	0
Arena 2010	AAV	2	1/1000	0
Arena 2011	AAC	1	1/10	0
Arena 2011	AAC	2	1/10	0
Arena 2011	AAV	1	1/10	0
Arena 2011	AAV	2	1/10	0
Arena 2011	AAC	1	1/100	0
Arena 2011	AAC	2	1/100	0
Arena 2011	AAV	1	1/100	0
Arena 2011	AAV	2	1/100	0
Arena 2011	AAC	1	1/1000	0
Arena 2011	AAC	2	1/1000	0
Arena 2011	AAV	1	1/1000	0
Arena 2011	AAV	2	1/1000	0
Arena 2012	AAC	1	1/10	0
Arena 2012	AAC	2	1/10	0

TABLA A10. Continuación...

Arena 2012	AAV	1	1/10	1
Arena 2012	AAV	2	1/10	1
Arena 2012	AAC	1	1/100	0
Arena 2012	AAC	2	1/100	0
Arena 2012	AAV	1	1/100	0
Arena 2012	AAV	2	1/100	0
Arena 2012	AAC	1	1/1000	0
Arena 2012	AAC	2	1/1000	0
Arena 2012	AAV	1	1/1000	0
Arena 2012	AAV	2	1/1000	0
Chimborazo A1	AAC	1	1/10	7
Chimborazo A1	AAC	2	1/10	5
Chimborazo A1	AAV	1	1/10	6
Chimborazo A1	AAV	2	1/10	8
Chimborazo A1	AAC	1	1/100	3
Chimborazo A1	AAC	2	1/100	2
Chimborazo A1	AAV	1	1/100	3
Chimborazo A1	AAV	2	1/100	2
Chimborazo A1	AAC	1	1/1000	0
Chimborazo A1	AAC	2	1/1000	0
Chimborazo A1	AAV	1	1/1000	0
Chimborazo A1	AAV	2	1/1000	0
Chimborazo A2	AAC	1	1/10	2
Chimborazo A2	AAC	2	1/10	3
Chimborazo A2	AAV	1	1/10	2
Chimborazo A2	AAV	2	1/10	1
Chimborazo A2	AAC	1	1/100	1
Chimborazo A2	AAC	2	1/100	2
Chimborazo A2	AAV	1	1/100	0
Chimborazo A2	AAV	2	1/100	0

TABLA A10. Continuación...

Chimborazo A2	AAC	1	1/1000	0
Chimborazo A2	AAC	2	1/1000	0
Chimborazo A2	AAV	1	1/1000	0
Chimborazo A2	AAV	2	1/1000	0

TABLA A11. Número de ufc/gramo de suelo seco

Muestra	Medio	Réplica	Dilución	UFC/g suelo seco
Suelo 2010	AAC	1	1/10	1,62E+04
Suelo 2010	AAC	2	1/10	9,00E+03
Suelo 2010	AAV	1	1/10	2,70E+03
Suelo 2010	AAV	2	1/10	9,00E+02
Suelo 2011	AAC	1	1/10	0,00E+00
Suelo 2011	AAC	2	1/10	1,80E+03
Suelo 2011	AAV	1	1/10	2,70E+03
Suelo 2011	AAV	2	1/10	4,50E+03
Suelo 2012	AAC	1	1/10	0,00E+00
Suelo 2012	AAC	2	1/10	0,00E+00
Suelo 2012	AAV	1	1/10	1,26E+04
Suelo 2012	AAV	2	1/10	1,17E+04
Arena 2010	AAC	1	1/10	0,00E+00
Arena 2010	AAC	2	1/10	1,80E+03
Arena 2010	AAV	1	1/10	9,00E+02
Arena 2010	AAV	2	1/10	9,00E+02
Arena 2011	AAC	1	1/10	0,00E+00
Arena 2011	AAC	2	1/10	0,00E+00
Arena 2011	AAV	1	1/10	0,00E+00
Arena 2011	AAV	2	1/10	0,00E+00
Arena 2012	AAC	1	1/10	0,00E+00
Arena 2012	AAC	2	1/10	0,00E+00
Arena 2012	AAV	1	1/10	9,00E+02

TABLA A11. Continuación...

Arena 2012	AAV	2	1/10	9,00E+02
Chimborazo A1	AAC	1	1/10	6,30E+03
Chimborazo A1	AAC	2	1/10	4,50E+03
Chimborazo A1	AAV	1	1/10	5,40E+03
Chimborazo A1	AAV	2	1/10	7,20E+03
Chimborazo A2	AAC	1	1/10	1,80E+03
Chimborazo A2	AAC	2	1/10	2,70E+03
Chimborazo A2	AAV	1	1/10	1,80E+03
Chimborazo A2	AAV	2	1/10	9,00E+02

TABLA A12. Codificación de cultivos de actinomicetes aislados de ecosistemas glaciares de la Antártida y del norte del Chimborazo.

Código	Muestra	Medio	Réplica	Dilución
JV – 001	Suelo 2010	AAC	R1	1/10
JV – 002	Suelo 2010	AAC	R1	1/10
JV – 003	Suelo 2010	AAC	R1	1/10
JV – 004	Suelo 2010	AAC	R1	1/10
JV – 005	Suelo 2010	AAC	R2	1/10
JV – 007	Suelo 2010	AAC	R2	1/10
JV – 008	Suelo 2010	AAC	R2	1/10
JV – 009	Suelo 2010	AAC	R2	1/10
JV – 010	Suelo 2010	AAC	R2	1/100
JV – 011	Suelo 2010	AAC	R2	1/100
JV – 012	Suelo 2010	AAC	R2	1/100
JV – 013	Suelo 2010	AAC	R2	1/100
JV – 014	Suelo 2011	AAC	R2	1/100
JV – 015	Suelo 2011	AAC	R2	1/100
JV – 017	Arena 2010	AAC	R2	1/10
JV – 018	Arena 2010	AAC	R2	1/10
JV – 019	Chimborazo A1	AAC	R1	1/10

TABLA A12. Continuación...

JV – 021	Chimborazo A1	AAC	R2	1/10
JV – 022	Chimborazo A1	AAC	R2	1/10
JV – 025	Chimborazo A1	AAC	R2	1/100
JV – 026	Chimborazo A1	AAC	R2	1/100
JV – 027	Chimborazo A2	AAC	R2	1/10
JV – 028	Chimborazo A2	AAC	R1	1/100
JV – 029	Chimborazo A2	AAC	R2	1/100
JV – 031	Suelo 2010	AAV	R1	1/100
JV – 033	Suelo 2010	AAV	R1	1/100
JV – 034	Suelo 2010	AAV	R1	1/100
JV – 035	Suelo 2011	AAV	R1	1/10
JV – 036	Suelo 2011	AAV	R1	1/100
JV – 037	Suelo 2012	AAV	R1	1/100
JV – 038	Arena 2010	AAV	R2	1/10
JV – 039	Arena 2012	AAV	R2	1/100
JV – 041	Chimborazo A1	AAV	R1	1/10
JV – 042	Chimborazo A1	AAV	R2	1/10
JV – 043	Chimborazo A1	AAV	R1	1/100
JV – 045	Chimborazo A1	AAV	R2	1/100
JV – 047	Chimborazo A2	AAV	R2	1/10

TABLA A13. Caracterización microscópica de actinomicetes aislados

Código	Forma de la Cadena
JV – 001	Recta
JV – 002	Recta
JV – 003	Flexous
JV – 004	Flexous
JV – 005	Flexous

TABLA A13. Continuación...

JV – 007	Flexous
JV – 008	Recta
JV – 009	Recta
JV – 010	Recta
JV – 011	Recta
JV – 012	Flexous
JV – 013	Recta
JV – 014	Recta
JV – 015	Espiral Abierta
JV – 017	Flexous
JV – 018	Espiral Abierta
JV – 019	Recta
JV – 021	Recta
JV – 022	Flexous
JV – 025	Flexous
JV – 026	Recta
JV – 027	Recta
JV – 028	Recta
JV – 029	Recta
JV – 031	Flexous
JV – 033	Esporas Simples
JV – 034	Recta
JV – 035	Recta
JV – 036	Recta
JV – 037	Esporas Simples
JV – 038	Esporas Simples
JV – 039	Recta
JV – 041	Recta
JV – 042	Esporas Simples
JV – 043	Recta
JV – 045	Esporas Simples
JV – 047	Recta

TABLA A14. Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura

Código	Temperatura (°C)			Clasificación
	4	28	37	
JV – 001	1	1	0	Psicrótrofo
JV – 002	1	1	0	Psicrótrofo
JV – 003	1	1	0	Psicrótrofo
JV – 004	1	1	0	Psicrótrofo
JV – 005	1	1	0	Psicrótrofo
JV – 007	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 008	1	1	0	Psicrótrofo
JV – 009	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 010	1	1	0	Psicrótrofo
JV – 011	1	1	0	Psicrótrofo
JV – 012	1	1	0	Psicrótrofo
JV – 013	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 014	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 015	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 017	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 018	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 019	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 021	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 022	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 025	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 026	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 027	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 028	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 029	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 031	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 033	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 034	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 035	0	1	1	Mesófilo
JV – 036	0	1	0	Psicrótrofo

TABLA A14. Continuación...

JV – 037	1	1	0	Psicrótrofo
JV – 038	1	1	0	Psicrótrofo
JV – 039	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 041	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 042	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 043	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 045	0	1	0	Psicrótrofo
JV – 047	0	1	0	Psicrótrofo

Tabla A15. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de acuerdo al origen de las muestras.

	Origen de la Muestra							
	S ₁₀	S ₁₁	S ₁₂	A ₁₀	A ₁₁	A ₁₂	C _{A1}	C _{A2}
Mesófilos	0	0	0	0	0	0	1	0
Psicrótrofos	15	4	1	3	0	1	8	4

Tabla A16. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de acuerdo al medio de cultivo de aislamiento.

	Medio de Cultivo de Aislamiento	
	AAC	AAV
Mesófilos	0	1
Psicrótrofos	24	12

Tabla A17. Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.

Código	pH					Clasificación
	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	
JV – 001	0	1	1	0	0	Neutrófilo

TABLA A17. Continuación...

JV – 002	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 003	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 004	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 005	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV – 007	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 008	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 009	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 010	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 011	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 012	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JV – 013	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JV – 014	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JV – 015	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JV – 017	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JV – 018	0	1	1	1	0	Neutrófilo
JV – 019	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JV – 021	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JV – 022	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JV – 025	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 026	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JV – 027	1	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 028	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 029	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV – 031	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV – 033	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JV – 034	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV – 035	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV – 036	1	1	1	0	0	Neutrotolerante
JV – 037	1	1	1	1	0	Neutrotolerante
JV – 038	1	1	1	1	1	Álcalitolerante
JV – 039	1	1	1	1	0	Neutrotolerante

TABLA A17. Continuación...

JV – 041	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 042	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 043	1	1	1	1	1	Álcalitolerante
JV – 045	0	1	1	0	0	Neutrófilo
JV – 047	0	1	1	1	0	Neutrófilo

Tabla A18. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo de acuerdo al origen de las muestras.

	Origen de la Muestra							
	S ₁₀	S ₁₁	S ₁₂	A ₁₀	A ₁₁	A ₁₂	C _{A1}	C _{A2}
Neutrófilo	9	0	0	1	0	0	4	3
Neutrotolerante	6	4	1	1	0	1	4	1
Alcalinotolerante	0	0	0	1	0	0	1	0

Tabla A19. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo de acuerdo al medio de aislamiento.

	Medio de Cultivo de Aislamiento	
	AAC	AAV
Neutrófilo	13	4
Neutrotolerante	11	7
Álcalitolerante	0	2

Tabla A20. Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

Código	NaCl (%)			Clasificación
	1	10	15	
JV – 001	1	0	0	Halófilo débil
JV – 002	1	0	0	Halófilo débil
JV – 003	1	0	0	Halófilo débil
JV – 004	1	0	0	Halófilo débil

TABLA A20. Continuación...

JV – 005	1	0	0	Halófilo débil
JV – 007	1	0	0	Halófilo débil
JV – 008	1	0	0	Halófilo débil
JV – 009	1	0	0	Halófilo débil
JV – 010	1	0	0	Halófilo débil
JV – 011	1	0	0	Halófilo débil
JV – 012	1	0	0	Halófilo débil
JV – 013	1	0	0	Halófilo débil
JV – 014	1	0	0	Halófilo débil
JV – 015	1	0	0	Halófilo débil
JV – 017	1	0	0	Halófilo débil
JV – 018	1	0	0	Halófilo débil
JV – 019	1	0	0	Halófilo débil
JV – 021	1	0	0	Halófilo débil
JV – 022	1	0	0	Halófilo débil
JV – 025	1	0	0	Halófilo débil
JV – 026	1	0	0	Halófilo débil
JV – 027	1	0	0	Halófilo débil
JV – 028	1	0	0	Halófilo débil
JV – 029	1	0	0	Halófilo débil
JV – 031	1	0	0	Halófilo débil
JV – 033	1	0	0	Halófilo débil
JV – 034	1	0	0	Halófilo débil
JV – 035	1	0	0	Halófilo débil
JV – 036	1	0	0	Halófilo débil
JV – 037	1	1	0	Halófilo
JV – 038	1	0	0	Halófilo débil
JV – 039	1	0	0	Halófilo débil
JV – 041	1	0	0	Halófilo débil
JV – 042	1	0	0	Halófilo débil
JV – 043	1	1	1	Halófilo extremo

TABLA A20. Continuación...

JV – 045	1	0	0	Halófilo débil
JV – 047	1	0	0	Halófilo débil

Tabla A21. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo de acuerdo al origen de las muestras.

	Origen de la Muestra							
	S ₁₀	S ₁₁	S ₁₂	A ₁₀	A ₁₁	A ₁₂	C _{A1}	C _{A2}
Halófilo débil	15	4	0	3	0	1	8	4
Halófilo	0	0	1	0	0	0	0	0
Halófilo extremo	0	0	0	0	0	0	1	0

Tabla A22. Clasificación de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo de acuerdo al medio de aislamiento.

	Medio de Cultivo de Aislamiento	
	AAC	AAV
Halófilo débil	24	11
Halófilo	0	1
Halófilo extremo	0	1

Tabla A23. Grupos – especies basados en el 90% de similitud a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes.

Grupos Especie	Miembros del grupo
1	JV-001, JV-002, JV-003, JV-005, JV-007
2	JV-004
3	JV-008, JV-010, JV-011, JV-012, JV-013, JV-019, JV-036
4	JV-009
5	JV-021
6	JV-034, JV-035

TABLA A23. Continuación...

7	JV-014, JV-031
8	JV-028, JV-029
9	JV-033
10	JV-027
11	JV-026
12	JV-015
13	JV-017, JV-018
14	JV-022
15	JV-041
16	JV-025
17	JV-042
18	JV-045
19	JV-039
20	JV-047
21	JV-043
22	JV-037
23	JV-038

Tabla A24. Diámetros de inhibición en mm frente a microorganismos de control

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Probabilidad
Réplicas	1	6,33E+05	6,33E+05	0,26	0,6162
A: Origen de la Muestra	7	2,28E+08	3,26E+07	13,51	<0,0001
B: Medio de Cultivo	1	3,06E+06	3,06E+06	1,27	0,2778
AB	7	2,71E+08	3,87E+07	16,03	<0,0001
Error	15	3,62E+07	2,41E+06	-	-
Total	31	5,39E+08	-	-	-

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

Origen de la Muestra	UFC/g suelo seco	Rango
Muestra compuesta de arena – Año 2011	0,00E+00	A
Muestra compuesta de arena – Año 2012	4,50E+02	A
Muestra compuesta de arena – Año 2010	9,00E+02	A
Muestra compuesta de páramo del Chimborazo – > 4500 m.s.n.m.	1,80E+03	A
Muestra compuesta de suelo – Año 2011	2,25E+03	A B
Muestra compuesta de páramo del Chimborazo – < 4500 m.s.n.m.	5,85E+03	B C
Muestra compuesta de suelo – Año 2012	6,08E+03	B C
Muestra compuesta de suelo – Año 2010	7,20E+03	C

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

Tratamientos Interacción AxB	Descripción	UFC/g suelo seco	Rango
a ₅ b ₀	Muestra Arena 2012 + AAC	0,00E+00	A
a ₂ b ₀	Muestra Suelo 2012 + AAC	0,00E+00	A
a ₄ b ₀	Muestra Arena 2011 + AAC	0,00E+00	A
a ₄ b ₁	Muestra Arena 2011 + AAV	0,00E+00	A
a ₅ b ₁	Muestra Arena 2012 + AAV	9,00E+02	A B
a ₃ b ₁	Muestra Arena 2010 + AAV	9,00E+02	A B
a ₃ b ₀	Muestra Arena 2010 + AAC	9,00E+02	A B

Tabla B3. Continuación...

a ₁ b ₀	Muestra Suelo 2011 + AAC	9,00E+02	A B
a ₇ b ₁	Muestra Chimborazo > 4500 msnm + AAV	1,35E+03	A B
a ₀ b ₁	Muestra Suelo 2010 + AAV	1,80E+03	A B
a ₇ b ₀	Muestra Chimborazo > 4500 msnm + AAC	2,25E+03	A B
a ₁ b ₁	Muestra Suelo 2011 + AAV	3,60E+03	A B
a ₆ b ₀	Muestra Chimborazo < 4500 msnm + AAC	5,40E+03	A B
a ₆ b ₁	Muestra Chimborazo < 4500 msnm + AAV	6,30E+03	B C
a ₂ b ₁	Muestra Suelo 2012 + AAV	1,22E+04	C D
a ₀ b ₀	Muestra Suelo 2010 + AAC	1,26E+04	D

Tabla B4. Análisis de varianza para la diversidad bacteriana.

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Probabilidad
Réplicas	1	1,13	1,13	0,39	0,5399
A: Origen de la Muestra	7	284,00	40,57	14,19	<0,0001
B: Medio de Cultivo	1	3,12	3,12	1,09	0,3123
AB	7	332,38	47,48	16,61	<0,0001
Error	23	42,88	2,86	-	-
Total	31	663,50	-	-	-

Tabla B5. Separación de medias para la diversidad microbiana del factor A.

Origen de la Muestra	Diversidad	Rango
Muestra compuesta de arena – Año 2011	0	A
Muestra compuesta de arena – Año 2012	1	A
Muestra compuesta de arena – Año 2010	1	A
Muestra compuesta de páramo del Chimborazo – > 4500 m.s.n.m.	2	A
Muestra compuesta de suelo – Año 2011	2	A
Muestra compuesta de páramo del Chimborazo – < 4500 m.s.n.m.	7	B
Muestra compuesta de suelo – Año 2012	7	B
Muestra compuesta de suelo – Año 2010	8	B

Tabla B6. Separación de medias para la diversidad de la interacción AxB.

Tratamientos Interacción AxB	Descripción	Diversidad	Rango
a ₅ b ₀	Muestra Arena 2012 + AAC	0	A
a ₂ b ₀	Muestra Suelo 2012 + AAC	0	A
a ₄ b ₀	Muestra Arena 2011 + AAC	0	A
a ₄ b ₁	Muestra Arena 2011 + AAV	0	A
a ₅ b ₁	Muestra Arena 2012 + AAV	1	A B
a ₃ b ₁	Muestra Arena 2010 + AAV	1	A B
a ₃ b ₀	Muestra Arena 2010 + AAC	1	A B
a ₁ b ₀	Muestra Suelo 2011 + AAC	1	A B
a ₇ b ₁	Muestra Chimborazo > 4500 msnm + AAV	2	A B
a ₀ b ₁	Muestra Suelo 2010 + AAV	2	A B
a ₇ b ₀	Muestra Chimborazo > 4500 msnm + AAC	3	A B
a ₁ b ₁	Muestra Suelo 2011 + AAV	4	A B
a ₆ b ₀	Muestra Chimborazo < 4500 msnm + AAC	6	A B
a ₆ b ₁	Muestra Chimborazo < 4500 msnm + AAV	7	B C
a ₂ b ₁	Muestra Suelo 2012 + AAV	14	C D
a ₀ b ₀	Muestra Suelo 2010 + AAC	14	D

Tabla B7. Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de los actinomicetes aislados en el presente estudio.

Tabla B8. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis*

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Probabilidad
Tratamientos	33	1628,94	49,362	129,100	<0,0001
Error	34	13,00	0,382	-	-
Total	67	1641,94	-	-	-

Tabla B9. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Botrytis*

Tratamiento	ID Actino	Diámetro (mm)	Rango
T6	JV – 007 *S *C	20	A
T5	JV – 005 *S *C	17	B
T3	JV – 003 *S *C	15	C
T4	JV – 004 *S *C	15	C
T8	JV – 009 *S *C	15	C
T9	JV – 010 *S *C	15	C
T15	JV – 017 *A *C	15	C
T16	JV – 018 *A *C	15	C
T20	JV – 025 *X *C	15	C
T35	JV – 043 *X *V	15	C
T1	JV – 001 *S *C	14,5	D
T2	JV – 002 *S *C	14	E
T12	JV – 013 *S *C	14	E
T7	JV – 008 *S *C	13	F
T10	JV – 011 *S *C	11	G
T11	JV – 012 *S *C	11	G
T17	JV – 019 *X *C	11	G
T18	JV – 021 *X *C	11	G
T34	JV – 042 *X *V	11	G
T36	JV – 045 *X *V	11	G
T25	JV – 031 *S *V	10	H
T27	JV – 034 *S *V	10	H
T32	JV – 039 *A *V	10	H

TABLA B9. Continuación...

T33	JV – 041 *X*V	10	H
T14	JV – 015 *S*C	9	I
T22	JV – 027 *X*C	8,5	J
T23	JV – 028 *X*C	7	K
T29	JV – 029 *X*C	7	K
T37	JV – 047 *X*V	7	K
T13	JV – 014 *S*C	5	L
T21	JV – 026 *X*C	5	L
T26	JV – 033 *S*V	5	L
T28	JV – 035 *S*V	5	L

*S: Muestra de Suelo; *A: Muestra de Arena; * X: Muestra de Páramo; *V: AAV; *C: AAC

Tabla B10. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium*

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Probabilidad
Tratamientos	5	10,75	2,15	8,60	0,010
Error	6	1,5	0,25	-	-
Total	11	12,25	-	-	-

Tabla B11. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Fusarium*

Tratamiento	ID Actino	Diámetro (mm)	Rango
T36	JV – 045 *X*V	9,5	A
T14	JV – 015 *S*C	8,5	B
T28	JV – 035 *S*V	7,5	C
T33	JV – 041 *X*V	7	D
T32	JV – 039 *A*V	7	D

*S: Muestra de Suelo; *A: Muestra de Arena; * X: Muestra de Páramo; *V: AAV; *C: AAC

Tabla B12. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Alternaria*

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Probabilidad
Tratamientos	35	330,11	9,432	9,701	<0,0001
Error	36	35,00	0,972	-	-
Total	71	365,11	-	-	-

Tabla B13. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Alternaria*

Tratamiento	ID Actino	Diámetro (mm)	Rango
T34	JV – 042 *X*V	13,5	A
T35	JV – 043 *X*V	13	B
T16	JV – 018 *A*C	12,5	C
T6	JV – 007 *S*C	12,5	C
T27	JV – 034 *S*V	12	D
T21	JV – 026 *X*C	12	D
T17	JV – 019 *X*C	12	D
T11	JV – 012 *S*C	12	D
T36	JV – 045 *X*V	11,5	E
T22	JV – 027 *X*C	11,5	E
T14	JV – 015 *S*C	11,5	E
T5	JV – 005 *S*C	11,5	E
T29	JV – 036 *S*V	11	F
T20	JV – 025 *X*C	11	F
T18	JV – 021 *X*C	11	F
T12	JV – 013 *S*C	11	F
T8	JV – 009 *S*C	11	F
T4	JV – 004 *S*C	11	F
T1	JV – 001 *S*C	11	F
T24	JV – 029 *X*C	10,5	G
T19	JV – 022 *X*C	10,5	G
T9	JV – 010 *S*C	10,5	G

TABLA B13. Continuación...

T7	JV - 008 *S *C	10,5	G
T31	JV - 038 *A *V	10	H
T28	JV - 035 *S *V	10	H
T13	JV - 014 *S *C	10	H
T3	JV - 003 *S *C	10	H
T26	JV - 033 *S *V	9,5	I
T2	JV - 002 *S *C	9,5	I
T33	JV - 041 *X *V	9	J
T25	JV - 031 *S *V	9	J
T15	JV - 017 *A *C	8,5	K
T10	JV - 011 *S *C	8	L
T37	JV - 047 *X *V	7	M
T23	JV - 028 *X *C	7	M

*S: Muestra de Suelo; *A: Muestra de Arena; * X: Muestra de Páramo; *V: AAV; *C: AAC

Tabla B14. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en *Phoma*

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Probabilidad
Tratamientos	35	782,153	22,347	14,761	<0,0001
Error	36	54,500	1,514	-	-
Total	71	836,653	-	-	-

Tabla B15. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en *Phoma*

Tratamiento	ID Actino	Diámetro (mm)	Rango
T16	JV - 018 *A *C	15	A
T20	JV - 025 *X *C	14	B
T35	JV - 043 *X *V	14	B
T6	JV - 007 *S *C	13,5	C
T8	JV - 009 *S *C	13,5	C
T7	JV - 008 *S *C	13	D
T15	JV - 017 *A *C	13	D

TABLA B15. Continuación...

T9	JV – 010 *S *C	12,5	E
T11	JV – 012 *S *C	12,5	E
T21	JV – 026 *X *C	12,5	E
T28	JV – 035 *S *V	12,5	E
T1	JV – 001 *S *C	12	F
T3	JV – 003 *S *C	12	F
T17	JV – 019 *X *C	12	F
T18	JV – 021 *X *C	12	F
T34	JV – 042 *X *V	12	F
T4	JV – 004 *S *C	11,5	G
T13	JV – 014 *S *C	11,5	G
T19	JV – 022 *X *C	11,5	G
T22	JV – 027 *X *C	11,5	G
T23	JV – 028 *X *C	11,5	G
T27	JV – 034 *S *V	11	H
T29	JV – 036 *S *V	11	H
T36	JV – 045 *X *V	11	H
T37	JV – 047 *X *V	11	H
T5	JV – 005 *S *C	10,5	I
T33	JV – 041 *X *V	10,5	I
T12	JV – 013 *S *C	110	J
T24	JV – 029 *X *C	10	J
T25	JV – 031 *S *V	10	J
T32	JV – 039 *A *V	10	J
T2	JV – 002 *S *C	9,5	K
T14	JV – 015 *S *C	9,5	K
T26	JV – 033 *S *V	9,5	K
T10	JV – 011 *S *C	8	L

*S: Muestra de Suelo; *A: Muestra de Arena; * X: Muestra de Páramo; *V: AAV; *C: AAC

Tabla B16. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram +

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Probabilidad
Tratamientos	24	235,08	9,795	3,739	0,001
Error	25	65,50	2,620	-	-
Total	49	300,58	-	-	-

Tabla B17. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria G+

Tratamiento	ID Actino	Diámetro (mm)	Rango
T32	JV – 039 *A *V	21	A
T1	JV – 001 *S *C	21	A
T21	JV – 026 *X *C	20,5	B
T6	JV – 007 *S *C	20,5	B
T33	JV – 041 *X *V	20	C
T10	JV – 011 *S *C	20	C
T22	JV – 027 *X *C	19,5	D
T8	JV – 007 *S *C	19,5	D
T2	JV – 002 *S *C	19,5	D
T14	JV – 015 *S *C	19	E
T9	JV – 010 *S *C	19	E
T7	JV – 008 *S *C	19	E
T3	JV – 003 *S *C	19	E
T29	JV – 036 *S *V	18,5	F
T25	JV – 031 *S *V	18,5	F
T24	JV – 028 *X *C	18,5	F
T11	JV – 012 *S *C	18,5	F
T5	JV – 005 *S *C	18,5	F
T4	JV – 004 *S *C	18,5	F
T27	JV – 034 *S *V	18	G
T17	JV – 019 *X *C	17,5	H
T13	JV – 014 *S *C	15,5	I
T34	JV – 042 *X *V	13,5	J
T12	JV – 013 *S *C	13	K

*S: Muestra de Suelo; *A: Muestra de Arena; *X: Muestra de Páramo; *V: AAV; *C: AAC

Tabla B18. Análisis de varianza del diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram -

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Probabilidad
Tratamientos	23	796,67	34,638	23,092	0,0001
Error	24	36,00	1,5	-	-
Total	47	832,67	-	-	-

Tabla B19. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria G-

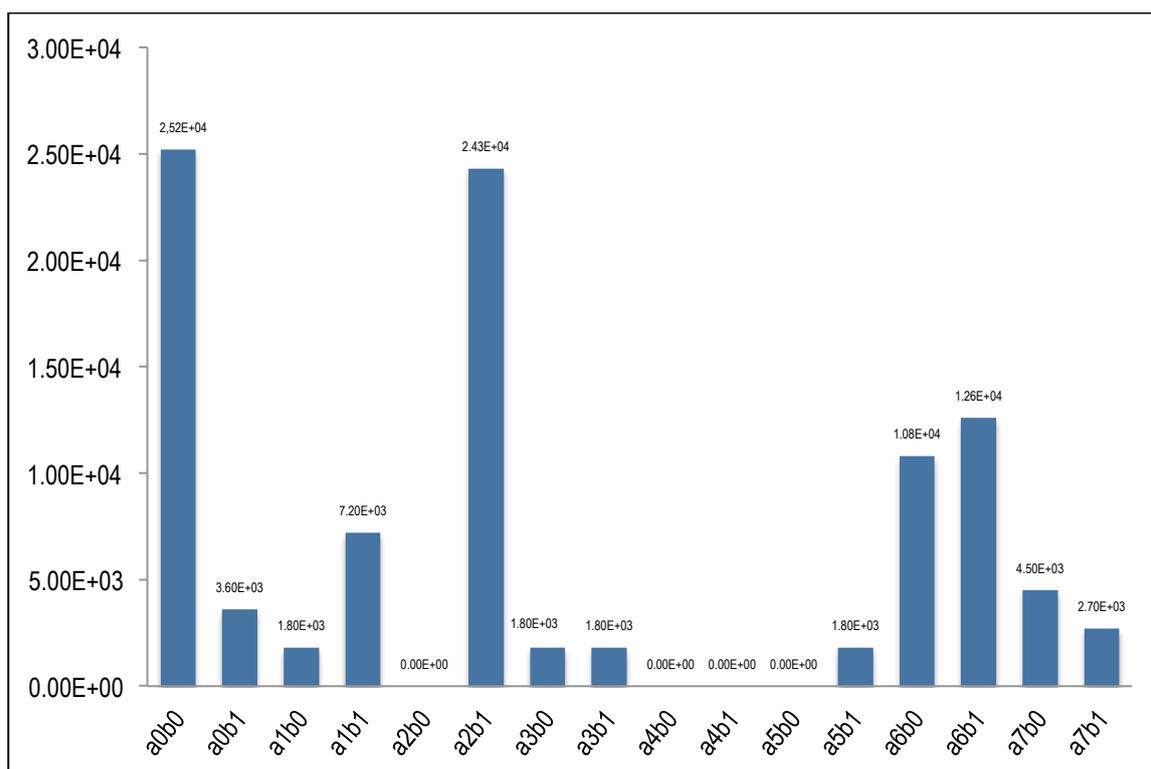
Tratamiento	ID Actino	Diámetro (mm)	Rango
T27	JV – 034 *S*V	23	A
T3	JV – 003 *S*C	20,5	B
T13	JV – 014 *S*C	17,5	C
T1	JV – 001 *S*C	17	D
T5	JV – 005 *S*C	15,5	E
T7	JV – 008 *S*C	15,5	E
T2	JV – 002 *S*C	15	F
T4	JV – 004 *S*C	15	F
T11	JV – 012 *S*C	15	F
T34	JV – 042 *X*V	15	F
T8	JV – 009 *S*C	13,5	G
T6	JV – 007 *S*C	13	H
T12	JV – 013 *S*C	13	H
T14	JV – 015 *S*C	13	H
T21	JV – 026 *X*C	11,5	I
T25	JV – 020 *X*C	11	J
T32	JV – 039 *A*V	11	J
T33	JV – 041 *X*V	11	J
T22	JV – 027 *X*C	10,5	K
T19	JV – 022 *X*C	8,5	L
T24	JV – 029 *X*C	7,5	M
T28	JV – 035 *S*V	7,5	M
T29	JV – 036 *S*V	7,5	M

*S: Muestra de Suelo; *A: Muestra de Arena; * X: Muestra de Páramo; *V: AAV; *C: AAC

ANEXO C

GRÁFICOS

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



Tratamientos	Descripción
a ₀ b ₀	Muestra Suelo 2010 + AAC
a ₀ b ₁	Muestra Suelo 2010 + AAV
a ₁ b ₀	Muestra Suelo 2011 + AAC
a ₁ b ₁	Muestra Suelo 2011 + AAV
a ₂ b ₀	Muestra Suelo 2012 + AAC
a ₂ b ₁	Muestra Suelo 2012 + AAV
a ₃ b ₀	Muestra Arena 2010 + AAC
a ₃ b ₁	Muestra Arena 2010 + AAV
a ₄ b ₀	Muestra Arena 2011 + AAC
a ₄ b ₁	Muestra Arena 2011 + AAV
a ₅ b ₀	Muestra Arena 2012 + AAC
a ₅ b ₁	Muestra Arena 2012 + AAV
a ₆ b ₀	Muestra Chimborazo < 4500 msnm + AAC
a ₆ b ₁	Muestra Chimborazo < 4500 msnm + AAV
a ₇ b ₀	Muestra Chimborazo > 4500 msnm + AAC
a ₇ b ₁	Muestra Chimborazo > 4500 msnm + AAV

Figura C2. Número de actinomicetes aislados en cada medio de cultivo según el origen de la muestra.

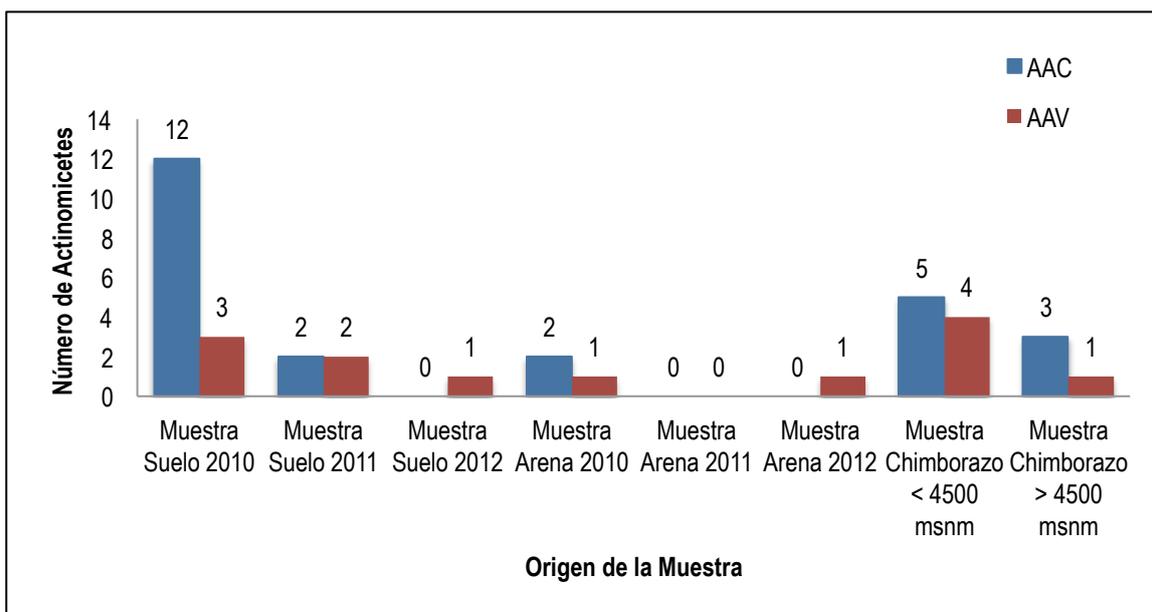


Figura C3. Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.

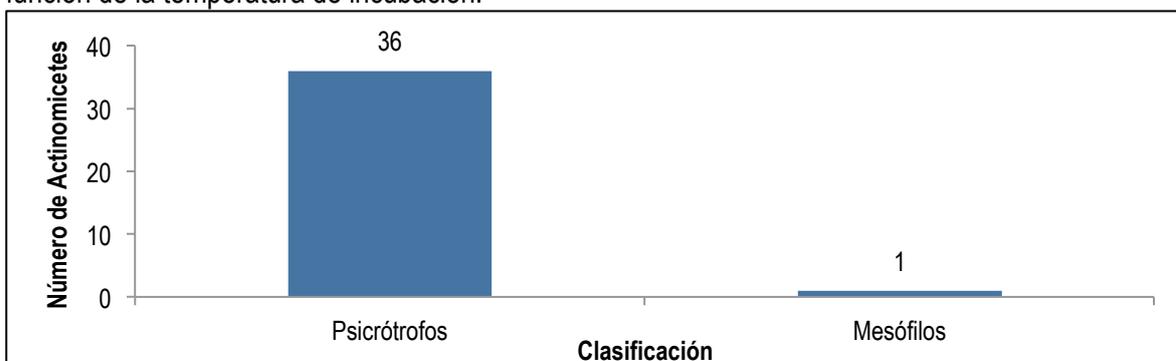


Figura C4. Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.

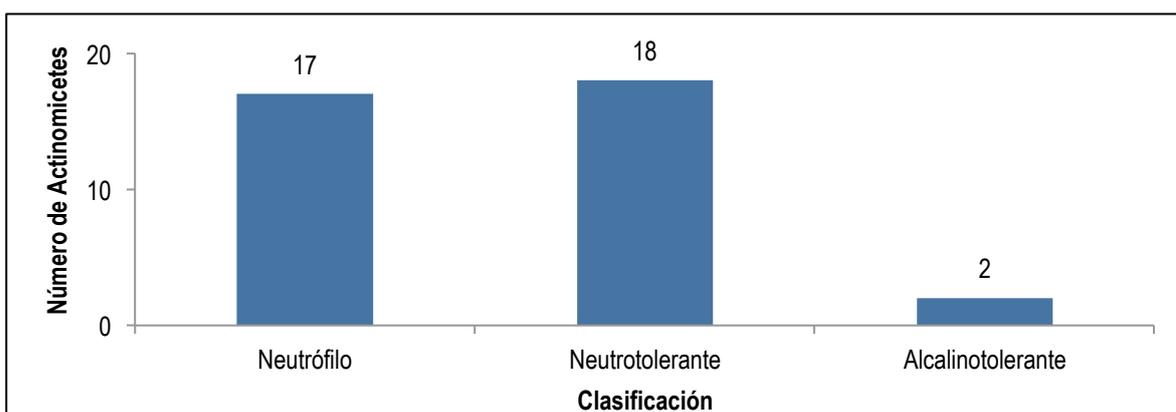


Figura C5. Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

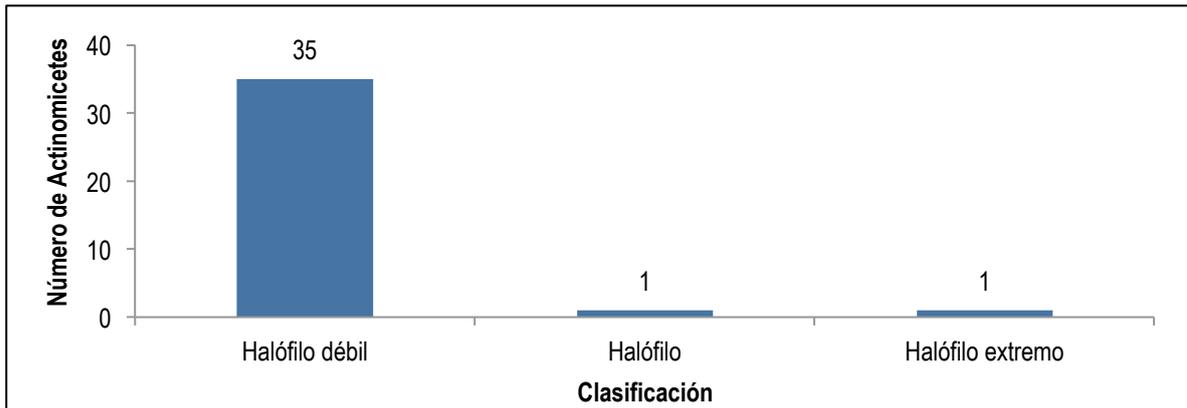
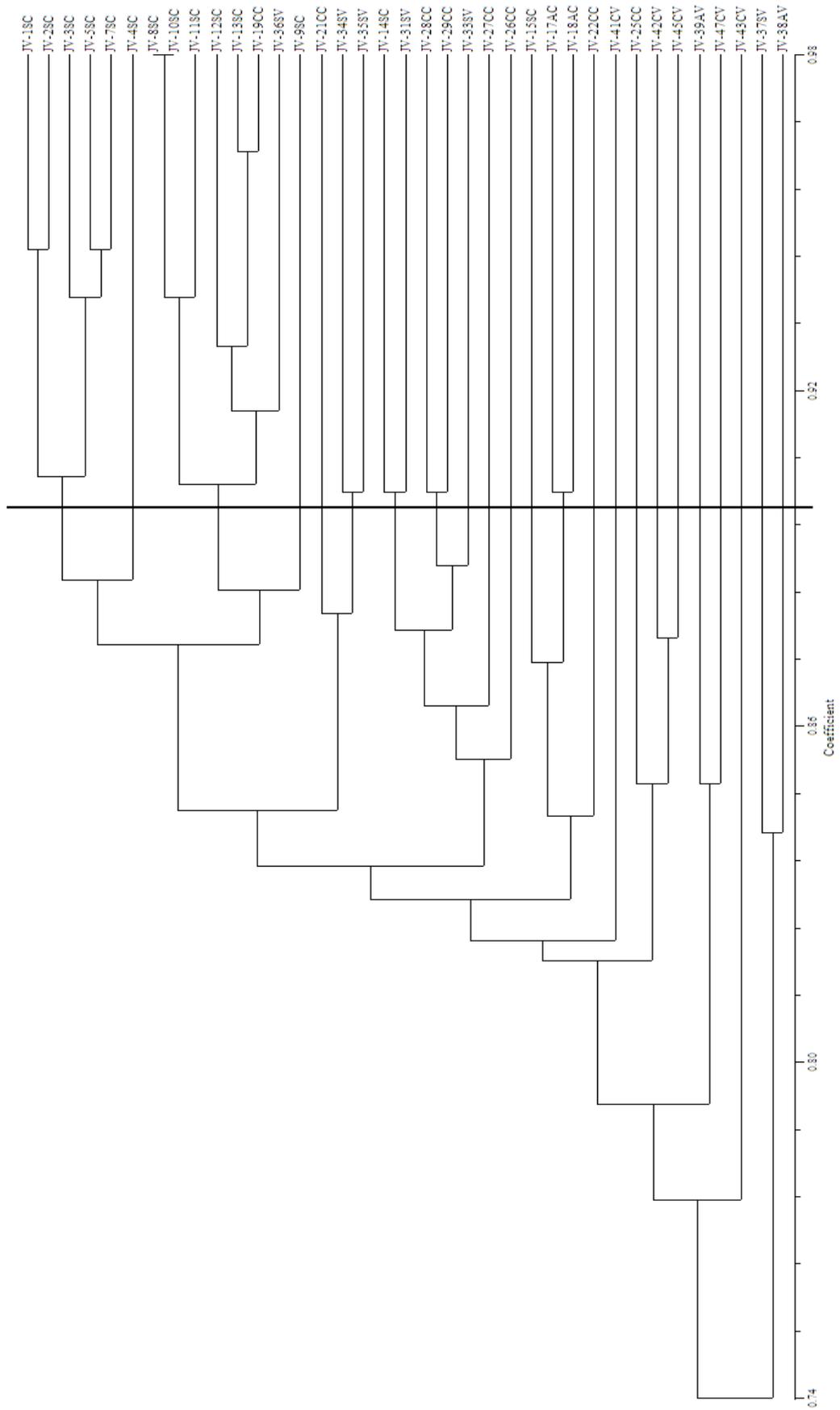


Figura C6. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de los actinomicetes aislados en el estudio.



ANEXO D

MEDIOS DE CULTIVO Y

SOLUCIONES

MEDIOS DE CULTIVO

Agar AV con Vitaminas (AAV)

L-Arginina	0,30 g
Glucosa	1,00 g
Glicerol	1,00 g
K ₂ HPO ₄	0,30 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.20 g
NaCl	0,30 g
Solución de Vitaminas	10,00 ml
Solución de sales traza	10,00 ml
Agar	15,00 g
Agua destilada	1000,00 ml
pH	6,5

Solución de Vitaminas

Ácido p-aminobenzoico	5,00 mg
Pantotenato cálcico	5,00 mg
Inositol	5,00 mg
Niacina	5,00 mg
Piridoxina • HCl	5,00 mg
Riboflavina	5,00 mg
Tiamina • HCl	5,00 mg
Biotina	2,50 mg
Agua destilada	100,00 ml
pH	6,4

Solución de sales traza

CuSO₄ • 5H₂O	1,00 mg/ml
Fe₂(SO₄)₃	1,00 mg/ml
MgSO₄ • 7H₂O	1,00 mg/ml
ZnSO₄ • 7H₂O	1,00 mg/ml

Agar Almidón Caseína (AAC)

Almidón soluble	10,00 g
K₂HPO₄	2,00 g
KNO₃	2,00 g
NaCl	2,00 g
Caseína	0,30 g
MgSO₄ • 7H₂O	0,05 g
CaCO₃	0,02 g
FeSO₄ • 7H₂O	0,01 g
Agar	15,00 g
Agua destilada	1000,00 ml

Agar GYM

Glucosa	4,00 g
Extracto de levadura	10,00 g
Extracto de malta	10,00 g
CaCO₃	2,00 g
Agar	15,00 g
Agua destilada	1000,00 ml

Agar Avena

Avena	20,00 g
Agar	15,00 g
Agua destilada	1000,00 ml

Agar Nutritivo (AN)

Agar Nutritivo	23,00 g
Agua destilada	1000,00 ml

Agar Papa Dextrosa (PDA)

PDA	39,00 g
Agua destilada	1000,00 ml

SOLUCIONES BUFFER

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)

Volumen final: 100 ml

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

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)

Volumen final: 100 ml

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

ANEXO E

TABLAS DE COLORES

Tabla de Colores ACRILEX® utilizada para la Caracterización Macroscópica

Mates - Ref.: 04140, 04125 y 04106															
															
															
															
															
															
															
															
															
Metálicos - Ref.: 04340															
															
															
Fluorescentes - Ref.: 04040															
															
															
Glitter - Ref.: 05040 y 05025															
															
															
															

ACRILEX®

British Standard Specification for Colours for Identification Coding and Special Purposes



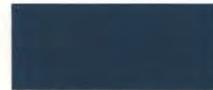
172 Pale roundel blue



112 Arctic blue



101 Sky blue



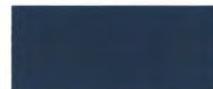
103 Peacock blue



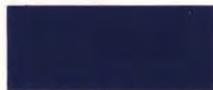
104 Azure blue



109 Middle blue



113 Deep Saxe blue



110 Roundel blue



105 Oxford blue



106 Royal blue



216 Eau-de-Nil



210 Sky



217 Sea green



280 Verdigris green



283 Aircraft grey green



267 Deep chrome green



225 Light Brunswick green



285M NATO green



220 Olive green



241 (641) Dark green



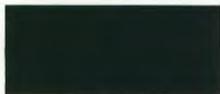
298 Olive drab



226 Middle Brunswick green



223 Middle bronze green



227 Deep Brunswick green



224 Deep bronze green



310 Primrose



367 Manilla



365 Vellum



353 Deep cream



369 Biscuit



352 Pale cream



384 Light straw



389 Camouflage beige



388 Beige



358 Light buff



361 Light stone



320 (410) Light brown



337 (437) Very dark drab



499 Service brown



447 Salmon pink



797 Light violet



454 Pale roundel red



414 Golden brown



411 Middle brown



445 Venetian red



542 Ruby



436M Dark camouflage brown



412 Dark brown



541 Maroon



796 Dark violet



108 Aircraft blue



166 French blue



175 Light French blue



107 Strong blue



228 Emerald green



262 Bold green



221 Brilliant green



218 Grass green



309 Canary yellow



363 Bold yellow



355 Lemon



356 Golden yellow



568 (368) Apricot



557 Light orange



592 International orange



593 Rail red



537 Signal red



564 Bold red



539 Currant red

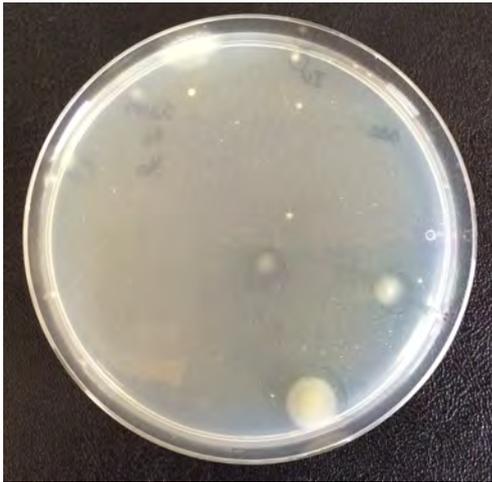


538 Cherry

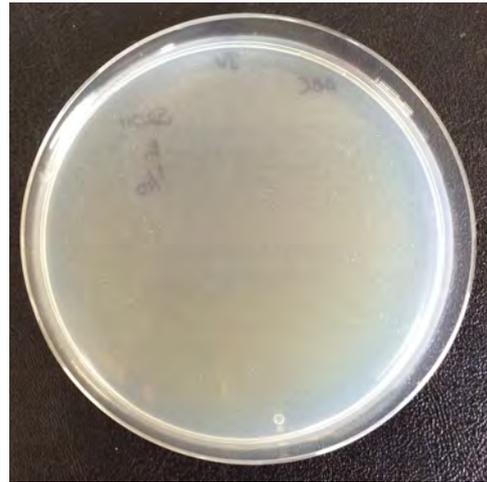
ANEXO F

FOTOGRAFÍAS

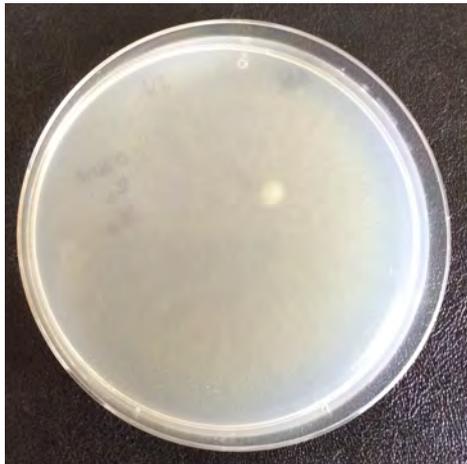
Aislamiento selectivo de muestras de suelo en AAC



Suelo 2010, Dilución 1/10 Repetición 2



Suelo 2011, Dilución 1/10 Repetición 1



Suelo 2012 , Dilución 1/10 Repetición 2

Aislamiento selectivo de muestras de arena en AAC



Arena 2010 , Dilución 1/10 Repetición 1



Arena 2011 , Dilución 1/10 Repetición 1

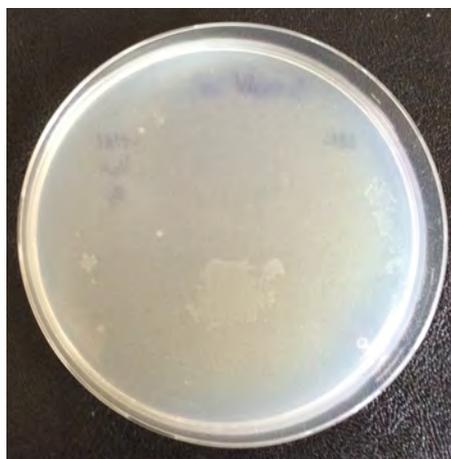


Arena 2012 , Dilución 1/10 Repetición 1

Aislamiento selectivo de muestras de páramo en AAC



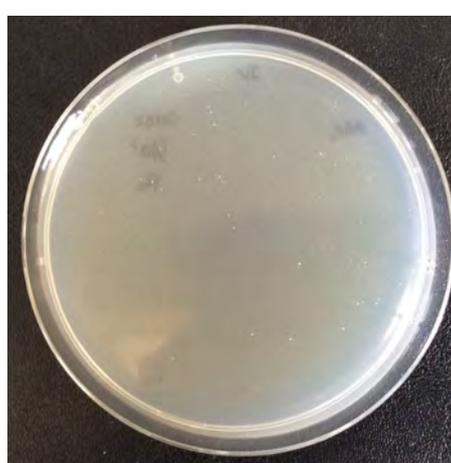
Chimborazo A1, Dilución 1/10 Repetición 2



Chimborazo A1, Dilución 1/100 Repetición 2

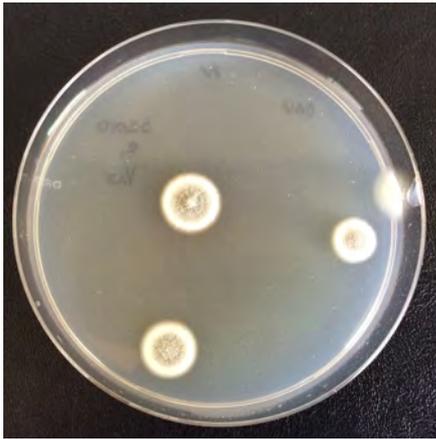


Chimborazo A2, Dilución 1/10 Repetición 2



Chimborazo A2, Dilución 1/100 Repetición 2

Aislamiento selectivo de muestras de suelo en AAV



Suelo 2010, Dilución 1/10 Repetición 1

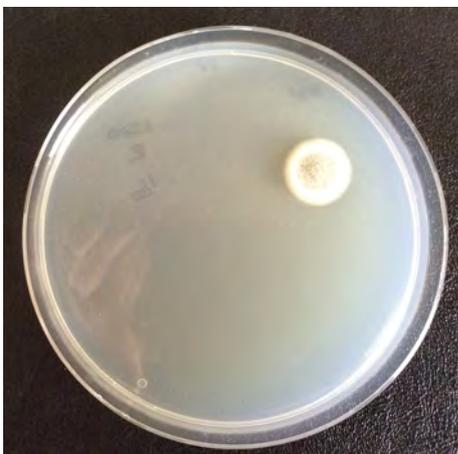


Suelo 2011, Dilución 1/10 Repetición 2

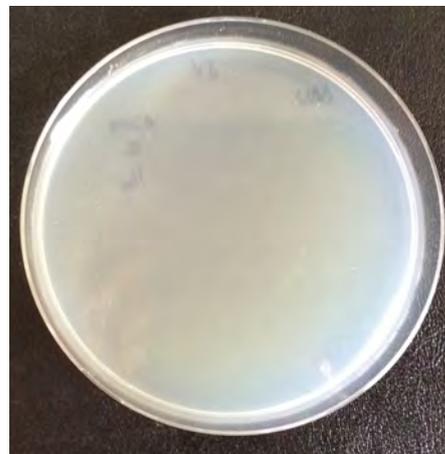


Suelo 2012, Dilución 1/10 Repetición 1

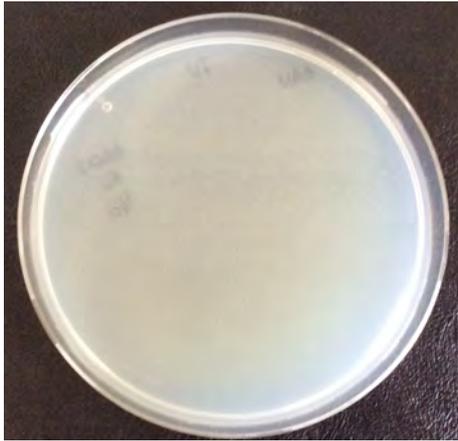
Aislamiento selectivo de muestras de arena en AAV



Arena 2010, Dilución 1/10 Repetición 1



Arena 2011, Dilución 1/10 Repetición 1



Arena 2012 , Dilución 1/10 Repetición 2

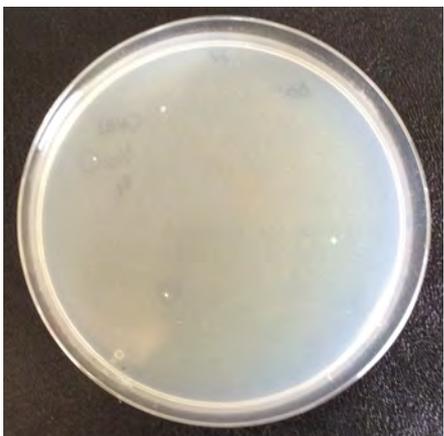
Aislamiento selectivo de muestras de páramo en AAV



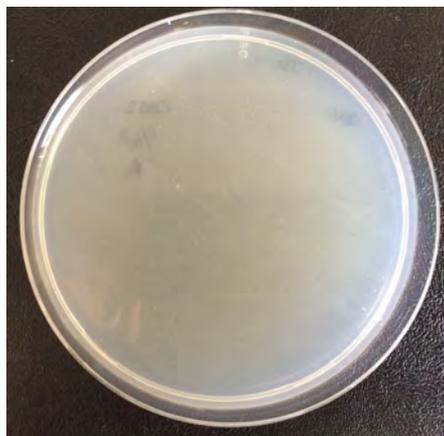
Chimborazo A1, Dilución 1/10 Repetición 1



Chimborazo A1, Dilución 1/100 Repetición 2



Chimborazo A2, Dilución 1/10 Repetición 2



Chimborazo A2, Dilución 1/100 Repetición 2

Actinomicetes aislados



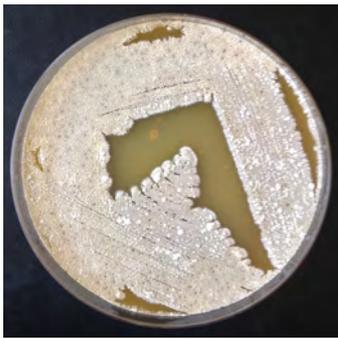
Código: JV - 001



Código: JV - 002



Código: JV - 003



Código: JV - 004



Código: JV - 005



Código: JV - 007



Código: JV - 008



Código: JV - 009



Código: JV - 010



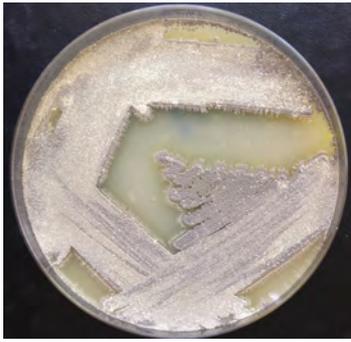
Código: JV - 011



Código: JV - 012



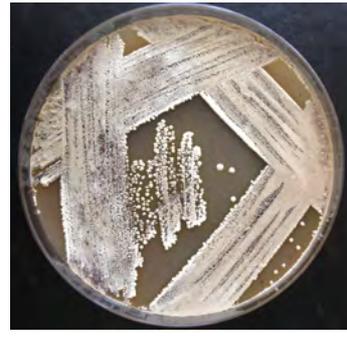
Código: JV - 013



Código: JV - 014



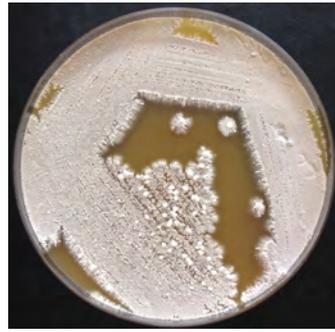
Código: JV - 015



Código: JV - 017



Código: JV - 018



Código: JV - 019



Código: JV - 021



Código: JV - 022



Código: JV - 025



Código: JV - 026



Código: JV - 027



Código: JV - 028



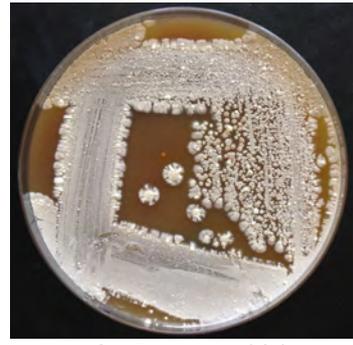
Código: JV - 029



Código: JV – 031



Código: JV – 033



Código: JV - 034



Código: JV – 035



Código: JV – 036



Código: JV - 037



Código: JV – 038



Código: JV – 039



Código: JV - 041



Código: JV – 042



Código: JV – 043



Código: JV - 045

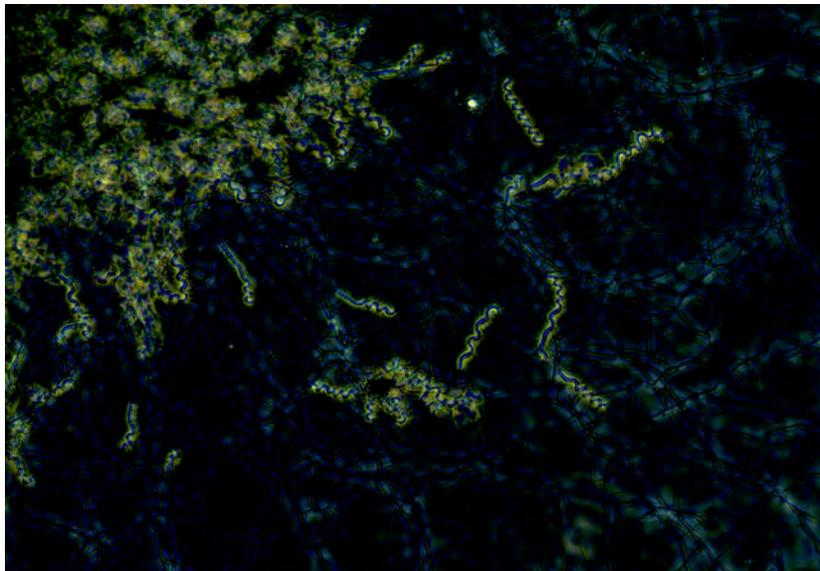


Código: JV – 047

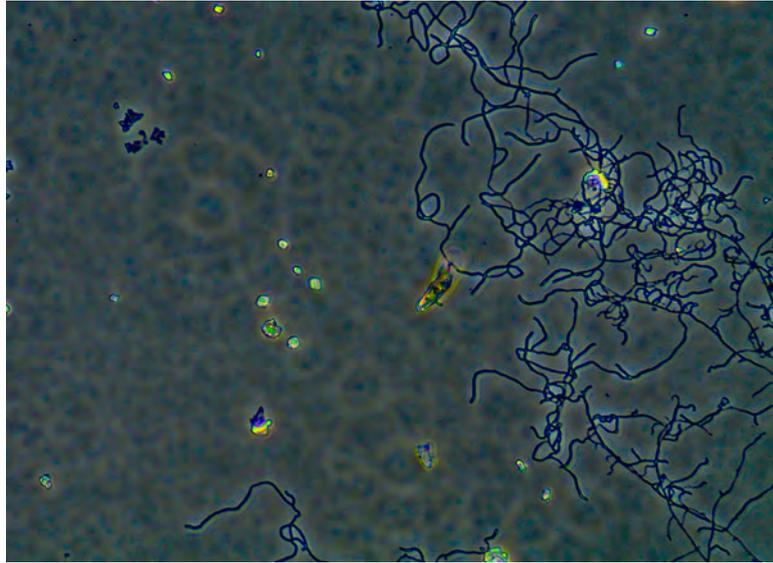
Caracterización microscópica



Cadena de Esporas Recta; Cultivo JV – 009; Lente 40X

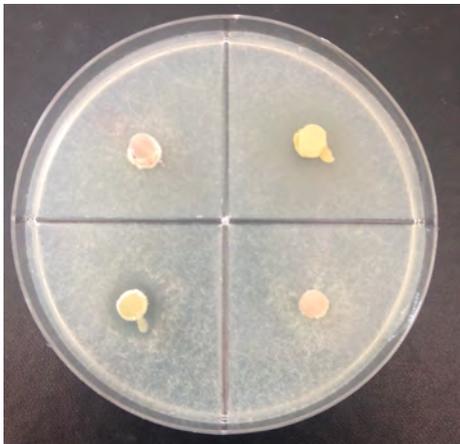


Cadena de Esporas Espirales; Cultivo JV – 015; Lente 40X

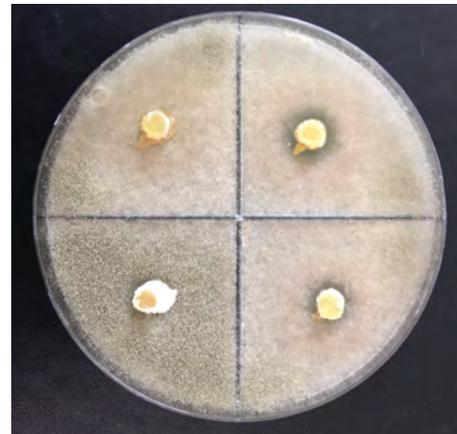


Cadena de Esporas Flexuous; Cultivo JV – 031; Lente 40X

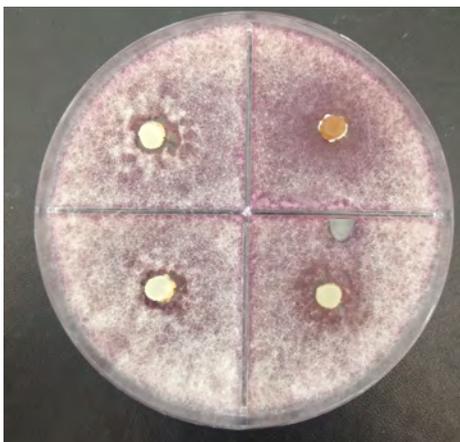
Capacidad Antagónica



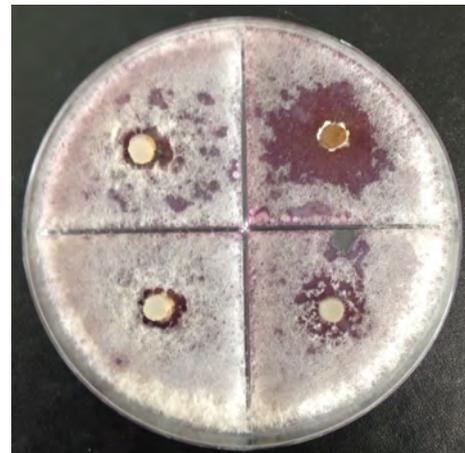
Actividad frente a *Botrytis* - Día 3



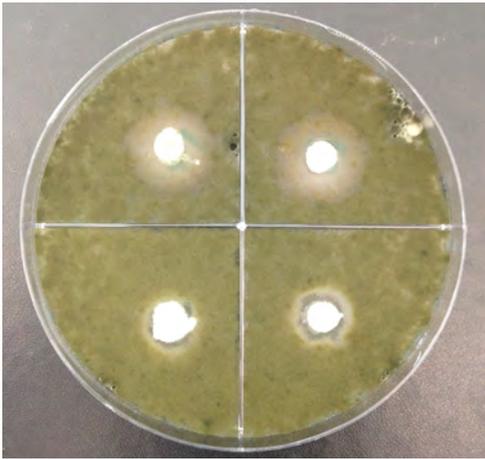
Actividad frente a *Botrytis* - Día 5



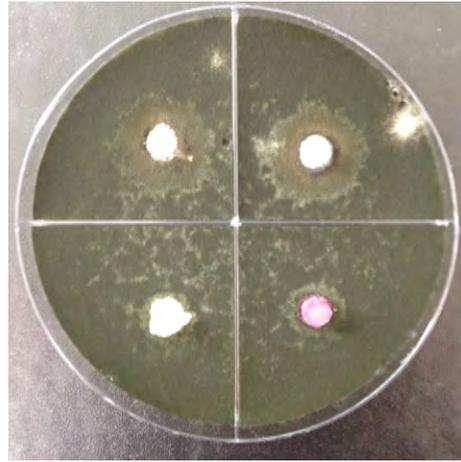
Actividad frente a *Fusarium* - Día 3



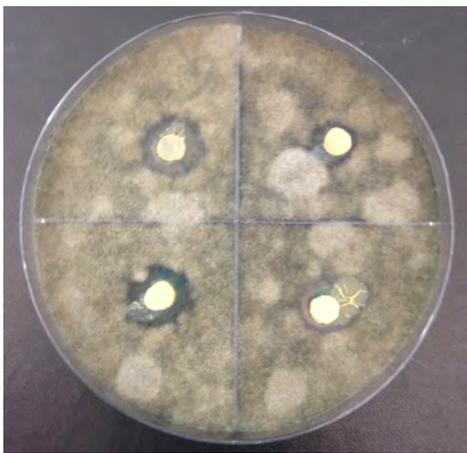
Actividad frente a *Fusarium* - Día 5



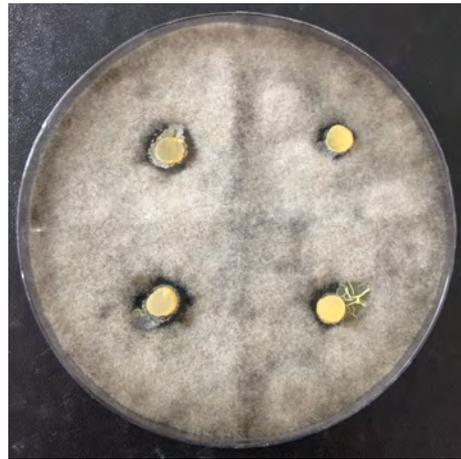
Actividad frente a *Alternaria* - Día 3



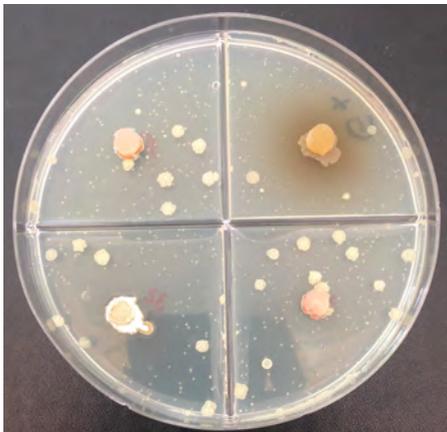
Actividad frente a *Alternaria* - Día 5



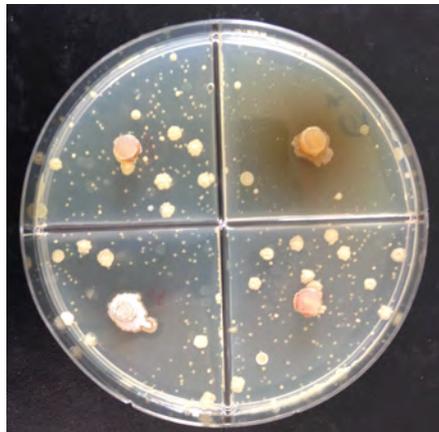
Actividad frente a *Phoma* - Día 3



Actividad frente a *Phoma* - Día 5



Actividad frente a Bacteria G⁺ - Día 3



Actividad frente a Bacteria G⁺ - Día 5