

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA, LIGNINOLÍTICA Y
AMILOLÍTICA DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SUELO RIZOSFÉRICO DE
TRÉBOL BLANCO (*TRIFOLIUM REPENS*).**



MARIA ELISA PAILLIÉ JIMÉNEZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
JUNIO DE 2012**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA, LIGNINOLÍTICA Y
AMILOLÍTICA DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SUELO RIZOSFÉRICO DE
TRÉBOL BLANCO (*TRIFOLIUM REPENS*).**



MARIA ELISA PAILLIÉ JIMÉNEZ

**INGRID SCHULER GARCÍA
BIÓLOGA PhD
DECANA ACADÉMICA**

**JANETH ARIAS PALACIOS
BACTERIÓLOGA M.Sc
DIRECTORA DE CARRERA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA, LIGNINOLÍTICA Y
AMILOLÍTICA DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SUELO RIZOSFÉRICO DE
TRÉBOL BLANCO (*TRIFOLIUM REPENS*).**



MARIA ELISA PAILLIÉ JIMÉNEZ

IVONNE GUTIÉRREZ ROJAS
BACTERIÓLOGA M.Sc, PhD
DIRECTORA

MARCELA FRANCO CORREA
MICROBIÓLOGA M. Sc, Ph D
CODIRECTORA

JURADO

BALKYS ESMERALDA QUEVEDO
INGENIERA QUÍMICA M.Sc, Ph

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA, LIGNINOLÍTICA Y AMIOLÍTICA DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SUELO RIZOSFÉRICO DE TRÉBOL BLANCO (*TRIFOLIUM REPENS*).



MARIA ELISA PAILLIÉ JIMÉNEZ

**IVONNE GUTIÉRREZ ROJAS
BACTERIÓLOGA M.Sc, PhDc
DIRECTORA**

JURADO

**BALKYS ESMERALDA QUEVEDO
INGENIERA QUÍMICA M.Sc, PhD**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de julio de 1946

RESUMEN.

Este trabajo consistió en determinar, cualitativa y cuantitativamente la actividad celulolítica, amilolítica y ligninolítica de 23 aislamientos de actinobacterias aisladas de suelos rizosféricos. Para los ensayos cualitativos, se realizó un tamizaje de los aislamientos en medios sólidos de inducción, la siembra consistió en el traspaso de discos previamente inoculados con cada uno de los aislamientos a evaluar en los agares Carboximetilcelulosa (CMC), almidón y lignina. Se evidenció que de los 23 aislamientos, ninguno tiene la capacidad de sintetizar enzimas del complejo ligninolítico, mientras que en el medio CMC el 62.2% de los aislamientos mostraron tener actividad celulolítica y en el medio almidón el 52.1% actividad amilolítica. Por otro lado se evidenciaron diferencias significativas entre los tiempos de muestreo 4, 7 y 13, en los que dependiendo del medio y del aislamiento, el día de mayor producción de halo de hidrólisis (cm) varía. En medio CMC, los aislamientos MCR33 y MCR4 fueron los que estadísticamente mostraron mayor diferencia significativa con un promedio de área bajo la curva (abc) de 46.825 y 40.725 respectivamente, y en medio almidón MCR 6 y MCR4 con un promedio de abc de 44.45 y 38.6625 respectivamente. Posteriormente, se realizó la determinación cuantitativa de la actividad celulolítica en dos medios líquidos; cuya composición variaba según la fuente nitrógeno (orgánica e inorgánica), y se mantuvo constante CMC como fuente de carbono. En cuanto a la producción de biomasa y enzimas Carboximetilcelulasas (CMCasas) por parte de MCR4, no se obtuvieron los resultados que se esperaban posiblemente por variables no controladas, por lo que no fue posible cuantificar su actividad enzimática durante los tiempos de fermentación, y se recomienda optimizar las condiciones de cultivo y evaluación enzimática para el aislamiento CMR4. Finalmente, no se logró obtener resultados cuantitativos de MCR33 pues no se obtuvo suficiente inóculo para iniciar dicha evaluación.

Palabras claves: actinobacterias, CMCasas, amilasas, ligninasas.

1. INTRODUCCIÓN.

Existen varios tratamientos biológicos utilizados para degradar residuos naturales y de tipo antropogénico, en los que son usados diversidad de microorganismos como hongos, bacterias y actinomicetos, esta alternativa biológica no genera un impacto negativo al medio ambiente y suele ser de bajo costo lo cual facilita su acceso y aplicación (1). En la literatura se encuentran numerosos reportes de microorganismos que sintetizan enzimas, que para su producción requieren del consumo de carbono, nitrógeno y energía, algunas son expresadas de manera constitutiva o inducidas bajo circunstancias específicas (2), las cuales son capaces de degradar compuestos de origen vegetal y varían en su complejidad estructural (3-5).

Uno de los principales componentes de los residuos naturales es la celulosa, junto con otro tipo de polisacáridos como la hemicelulosa y la pectina (4). La celulosa es el principal

polisacárido constituyente de tejidos vegetales, comúnmente presente en la pared celular de estos, es el producto primario de la fotosíntesis en ambientes terrestres, y es considerada uno de los recursos biológicos renovables de mayor abundancia en la biosfera (5). La biodegradación de la celulosa esta mediada por enzimas de tipo celulasas, producidas por los microorganismos, su mineralización representa el mayor flujo de carbono en el suelo, el cual es importante en varios procesos de tratamiento de residuos agrícolas, contribuyendo a mejorar las condiciones del suelo(6); por otro lado los residuos vegetales ricos en celulosa pueden ser utilizados para crear productos sostenibles de base biológica y bioenergética para sustituir el uso de combustibles fósiles (7).

La lignina es un polímero amorfo que funciona como un sellante fuerte entre los materiales que conforman las células de la madera, y comprende aproximadamente del 20 al 32% de la masa seca de la misma (8); su degradación está ampliamente estudiada empleando hongos de podredumbre blanca capaces de realizar su mineralización (9, 10); sin embargo no ha habido reportes de bacterias filamentosas capaces de mineralizar completamente este polímero, más si, de especies de actinomicetos capaces de realizar modificaciones parciales en la estructura de la lignina (9). Lo anterior sugiere que deben realizarse estudios en los que se evalúen actinomicetos y sean empleados para la formulación de consorcios microbianos con el objetivo de mineralizar la lignina en cortos períodos de tiempo.

Otro polímero de origen natural es el almidón, el cual se encuentra comúnmente en desechos de residuos agrícolas, domésticos e industriales y su degradación está asociada a la formación de azúcares de fácil asimilación como glucosa y maltosa, principales constituyentes del almidón (11). La hidrólisis biológica del almidón está ligada a la síntesis de enzimas extracelulares de tipo amilasas las cuales hidrolizan la molécula para poderla integrar a la célula y completar su metabolismo, entre el grupo de microorganismos encontrados capaces de producir amilasas se encuentran algunas especies de actinobacterias aisladas de suelos terrestres o sedimentos marinos(12).

La degradación biológica de los polímeros anteriormente nombrados ha sido estudiada con fines agrícolas, por tal motivo se han evaluado diversos modelos biológicos entre los cuales se encuentran los actinomicetos, estos han sido reportados como bacterias capaces de expresar enzimas amilolíticas, celulolíticas, proteolíticas, entre otras (13), y a su vez actúan como bacterias promotoras de crecimiento vegetal debido a que tienen la capacidad de solubilizar fósforo y fijar nitrógeno (14, 15); lo cual le confiere a los actinomicetos la capacidad de ser empleados como cepas multipropósito en cultivos agrícolas, que puedan aportar al desarrollo del ciclaje de macromoléculas como carbono (C), Nitrógeno (N) y fosforo (P) (16). En la presente investigación se evaluaron 23 aislamientos de actinomicetos, previamente caracterizados como promotores de

crecimiento vegetal (15); con el objetivo de determinar, mediante pruebas cualitativas y cuantitativas, la actividad enzimática celulolítica, ligninolítica y amilolítica.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los cultivos agrícolas generan gran cantidad de residuos vegetales ricos en celulosa, lignina y almidón, los cuales no tienen un posterior uso, acumulándose en el suelo disminuyendo espacio para los cultivos y dando origen a la proliferación de plagas y hospederos fitopatógenos. Para evitar dicha acumulación se suelen realizar quemas a cielo abierto lo cual genera emisiones críticas de CO₂, convirtiéndose en una amenaza para la salud humana y el medio ambiente (17). Como alternativa está el uso y aplicación de microorganismos capaces de sintetizar enzimas que degraden diferentes componentes propios de los residuos vegetales ya sean polímeros simples o complejos, lo cual conlleva a una aceleración en el tiempo de degradación natural, generación de subproductos como el compost, aumento en el flujo de carbono lo cual generará mayor disponibilidad de nutrientes y mejorará la calidad del suelo. Por otro lado existe la posible aplicación de estas enzimas en numerosas industrias para la producción de alimentos, cervecerías y elaboración de vinos, textiles, detergentes, alimentación animal, papel y cuero (18).

3. MARCO TEÓRICO.

3.1 ACTINOBACTERIAS.

Las actinobacterias son bacterias Gram positivas, aerobias y quimioorganotrofas (15, 19), las cuales están ampliamente distribuidas en suelos de pH neutro o poco alcalino, el cual les brinda un medio adecuado para su desarrollo metabólico. Los antecedentes indican también la existencia de diferentes géneros de actinobacterias aisladas de hábitats con concentraciones moderadas o altas de sal como suelo marino o sedimentos del mismo (20). Las diferentes condiciones que tienen estos diversos hábitats y la variedad nutricional que encuentran allí, generan gran influencia en la producción de enzimas (21). Comparten propiedades con los hongos y las bacterias, la pared celular que poseen es característica de procariontes y su morfología filamentosa y de conidios en cadena es similar a la de los hongos (22).

Debido a la capacidad de sintetizar diversas sustancias de interés agrícola e industrial, los actinomicetos han sido ampliamente estudiados y utilizados en la industria biotecnológica, pues con la acción de estas logran degradar la materia orgánica presente en el suelo, promoviendo el ciclaje de nutrientes y mejorando las características y condiciones de éste (19). Dentro de las sustancias más ampliamente usadas se encuentran, vitaminas, antibióticos, hormonas de crecimiento vegetal, metabolitos

antimicrobianos y enzimas entre otras; que contribuyen al mejoramiento de la producción agrícola y el control de plagas (12, 23,24).

3.2 LIGNINA.

La lignina es un polímero de origen natural conformado por subunidades de fenilpropano, la cual constituye entre un 25 a 30% de la biomasa total de las plantas, y es la forma más abundante de compuestos aromáticos a base de carbono en la biosfera (25). La lignina brinda características de rigidez y fuerza a células y tejidos vegetales, y forma una barrera en contra del ataque microbiano, ya que protege a los azúcares de fácil asimilación contenidos en las plantas (26). Dentro de la molécula de lignina prevalecen grupos funcionales alcohol y metilo, y predominan entre las subunidades enlaces covalentes (C-C, éter, Aril-Alcohol); por lo tanto es un polímero de lenta degradación y de características recalcitrantes (27). En el sistema ligninolítico existen diferentes tipos de enzimas, sin embargo las principales enzimas implicadas en la mineralización de la lignina son lacasa, manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP) (11, 28). En su gran mayoría se reportan actinobacterias del género *Streptomyces* y *Thermomonospora*, capaces de liberar enzimas encargadas de dar inicio a la biodegradación de la lignina, conocidas como ligninoperoxidasa, las cuales generan una acción de despolimerización oxidativa (29,30).

3.3 CELULOSA.

La celulosa es el polisacárido de mayor abundancia en el planeta tierra y es el principal componente de los tejidos vegetales. Es una macromolécula no ramificada de longitud variable, conformada por monómeros de glucosa unidos entre sí por enlaces β 1-4, dando origen a microfibrillas cristalinas (31). Dentro de los ecosistemas, microorganismos como bacterias y hongos son los encargados de transformar la celulosa insoluble a azúcares solubles como la celobiosa y glucosa mediante hidrólisis enzimática (32,33).

La degradación por parte de microorganismos implica la acción sinérgica de tres enzimas: endo- β -1,4-glucanasa (E.C. 3.2.1.4), exo- β -1,4-celobiohidrolasa (E.C. 3.2.1.91) y β -glucosidasa (E.C.3.2.1.21) (32). Existen numerosas especies de *Streptomyces* capaces de sintetizar al menos una de las 3 enzimas que están involucradas en la degradación de celulosa a glucosa (1, 34,35). También otros géneros aislados de residuos de arroz como, *Nocardiosis*, *Micromonospora*, *Nocardiodides* han sido reportados como microorganismos celulolíticos (17). Esta capacidad para descomponer la biomasa celulósica en glucosa, que a su vez puede convertirse en otros productos químicos y energéticos, ha hecho de las celulasas uno de los componentes de los sistemas enzimático más ampliamente investigados (36).

3.4 ALMIDÓN.

El almidón es un polímero de glucosa compuesto principalmente de dos tipos de alfa glucanos, amilosa y amilopectina; los cuales constituyen el 99% del peso seco de la molécula. La amilosa es un polímero lineal conformado por un 99% de enlaces α (1 \rightarrow 4) y un 1% de enlaces α (1 \rightarrow 6); la amilopectina es un polímero de mayor tamaño y peso molecular que la amilosa, en el que predominan un 95% de enlaces α (1 \rightarrow 4), y en un 5% de enlaces α (1 \rightarrow 6) (37). El almidón se encuentra comúnmente en plantas y semillas de leguminosas y cereales en donde actúa como reserva de energía, y se obtiene a partir de la sacarosa producida durante el proceso de fotosíntesis (37,38). En su gran mayoría se han aislado actinobacterias de suelos terrestres y marinos, del genero *Streptomyces* *Nocardiosis*, *Thermomonospora* capaces de producir enzimas amilolíticas las cuales a su vez son termoestables, esto con el fin de ser utilizados en la industria farmacéutica y de detergentes (15, 39,40).

4. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL.

1.1 Determinar mediante pruebas cualitativas y cuantitativas la actividad enzimática celulolítica, amilolítica y ligninolítica de aislamientos de actinobacterias obtenidas de suelos Colombianos.

2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

2.1. Establecer si los aislamientos poseen o no la capacidad de producir celulasas, amilasas y ligninasas, mediante pruebas cualitativas.

2.2 Cuantificar la actividad enzimática celulolítica, y ligninolítica, de los aislamientos que hayan mostrado mayor actividad en las pruebas cualitativas.

5. METODOLOGÍA.

5.1 MICROORGANISMOS.

Los 23 aislamientos de actinobacterias evaluadas en el presente estudio, se tomaron del banco de conservación de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA) de la Pontificia Universidad Javeriana. Se realizaron siembras masivas de los aislamientos en agar avena (agar 15g/L, avena molida 15g/L), y se incubaron por 14 días a 26°C.

5.2 EVALUACIÓN ENZIMÁTICA CUALITATIVA.

5.2.1 PREPARACIÓN DE CULTIVOS.

Pasados los 14 días de incubación, se tomaron discos de 9mm de cada uno de los aislamientos empleando puntas azules estériles, los cuales fueron traspasados a los medios específicos descritos en el siguiente numeral, posteriormente se incubaron a 26°C y se realizaron las mediciones de los halos de degradación los días 4, 7 y 13 según se explica en el anexo 1, figura 1. Todos los ensayos fueron evaluados por triplicado.

5.2.2 EVALUACIÓN DE HALOS EN MEDIOS DE INDUCCIÓN.

Agar Lignina. (Fosfato bibásico de potasio 0.5g/L, sulfato de magnesio 0.2 g/L, Nitrato de amonio 0.1 g/L, Cloruro de potasio 0.1 g/L, Sulfato de hierro heptahidratado 0.02 g/L, Cloruro de calcio 0.04, Extracto de malta 2 g/L, agar-agar 15 g/L, Dioxano 10mL, Lignina alcalina 1 g/L, Guaiacol 0.4mL, Hidróxido de potasio 5mL (1M), Nistatina 0.3 mL/L y agua destilada 5mL). Para el caso de este medio no es necesario agregar un revelador para ver la generación de un halo, pues este se observa a simple vista ya que el Guaiacol agregado previamente actúa como un indicador colorimétrico el cual al oxidarse por acción de las enzimas ligninolíticas, dará una coloración roja vino tinto diferente al color ámbar del medio (41).

Agar CMC. (Carboximetilcelulosa) al 1% como fuente de carbono 10g/L, NH₄Cl 1g/L, (NH₄)₂SO₄ 1g/L, KH₂PO₄ 0.1g/L, CaCl₂ 0.4g/L, MgSO₄ + 7H₂O 0.1g/L, agar-agar 15g/L). Los halos de degradación fueron revelados con Rojo Congo al 0.1% y γNaCl 0,1 M, siguiendo el protocolo estandarizado en el laboratorio de Biotecnología Aplicada(42), el cual consiste en agregar aproximadamente 3mL de Rojo Congo, dejar actuar por 15 minutos y descartar el exceso, posteriormente agregar 2mL NaCl 0.1M por 15 minutos y descartar nuevamente el exceso, luego de esto se llevan las cajas a nevera por 24 h. Pasado este tiempo se realizaron las lecturas correspondientes de los halos de degradación.

Agar Almidón. (Almidón soluble al 1% como fuente de carbono 10g/L, Extracto de levadura 3g/L y agar-agar 12g/L). Para este medio se utilizó lugol como revelador de los halos de hidrólisis siguiendo el protocolo previamente establecido por el laboratorio de Biotecnología Aplicada(42), el cual consiste en inundar la caja completa con el revelador, verificando que no falte ningún espacio y se prosigue a descartar el exceso para su inmediata lectura del halo.

5.2.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Para el análisis de los resultados se compararon los diámetros de los halos de hidrólisis obtenidos por cada día de muestreos correspondientes a los aislamientos. Posteriormente se realizaron los cálculos respectivos para hallar el promedio del área bajo la curva (abc) de cada aislamiento. Todos los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de un factor (SPSS 1 Software 17), para determinar diferencias significativas entre los aislamientos evaluados en cada medio inductor. Posteriormente se realizó un análisis Post Hoc para identificar los aislamientos estadísticamente diferentes.

5.3 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Una vez seleccionado el aislamiento con mayor actividad celulolítica se realizó la cuantificación siguiendo los protocolos respectivos para el medio líquido de inducción, CMC. Se prepararon dos medios con diferentes fuentes de nitrógeno, 15 matraces con nitrógeno inorgánico (CMC sin modificar) y otros 15 con nitrógeno orgánico (extracto de levadura 2g/L), para un total de 30 matraces.

5.3.1 FERMENTACIÓN LÍQUIDA.

A partir de siembras masivas del aislamiento seleccionado incubado 14 días en medio avena, se inocularon 230mL de caldo avena (15g/L) el cual fue incubado a 26°C por 7 días a 120 rpm. Pasado este tiempo, se centrifugó la biomasa obtenida a 5000 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se hicieron 3 lavados con solución salina al 0.85%, con el objetivo de remover trazas de avena. La biomasa lavada fue suspendida en tubos falcon con 50mL de solución salina al 0.85%, a partir de esta se tomaron 5mL para inocular cada uno de los matraces de 250mL que contenían 45mL de caldo CMC. Se evaluaron dos tipos de fuentes de nitrógeno, las cuales fueron extracto de levadura (2g/L) como fuente orgánica y sulfato de amonio (1g/L) y cloruro de amonio (1g/L) como fuentes inorgánicas.

Se realizaron los muestreos retirando 3 matraces por día (0, 1, 2, 4 y 6) estos fueron vertidos en tubos falcon de 50mL y se centrifugaron 20min a 5000 rpm. Los extractos obtenidos se agregaron a un falcon de 50mL para su posterior evaluación enzimática y medición de pH, mientras que la biomasa precipitada se lavó 3 veces con solución salina al 0.85%, para su posterior secado en horno a 70°C.

5.3.2 ACTIVIDAD CELULOLÍTICA.

Para realizar la evaluación cuantitativa de la actividad celulolítica, se tomó 1ml del extracto obtenido y se adicionó a 1mL de buffer fosfato de sodio (100mM, pH 7.0) y 1mL de CMC al 1%(43). Como blanco se tomó 1mL de extracto y 1 mL de buffer fosfato de sodio (100mM, pH 7.0). Las condiciones de incubación de la reacción enzimática fueron 50°C durante 60 minutos. Posteriormente se realizó la cuantificación de azúcares reductores mediante la técnica de DNS descrita por Miller (44) empleando un patrón de glucosa. Una unidad celulolítica se definió como la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μmol de azúcares reductores (glucosa) por minuto por litro ($\mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * \text{L}^{-1}$).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 EVALUACIÓN ENZIMÁTICA CUALITATIVA.

De los 23 aislamientos evaluados, se obtuvieron en total 15 y 12 aislamientos que tenían actividad celulolítica y amilolítica en medio sólido respectivamente, no se obtuvo ninguno con actividad ligninolítica. Para almidón fueron MCR 1, MCR 2, MCR 4, MCR 6, MCR 9, MCR 10, MCR 14, MCR 16, MCR 21, MCR 23, MCR 26, MCR 31 y para el caso de CMC fueron MCR 1, MCR 2, MCR 4, MCR 5, MCR 6, MCR 9, MCR 10, MCR 14, MCR 18, MCR 23, MCR 24, MCR 26, MCR 30, MCR 31 y MCR 33.

En la figura 1, se observa el comportamiento del control positivo en el medio lignina y la diferencia con los medios de lignina en los que se inoculó un disco con las actinobacterias a evaluar, los cuales no mostraron actividad ligninolítica pero sí un crecimiento mayor al del disco inoculado. Como control positivo se utilizó *Pleurotus* sp., tomado del banco de conservación del laboratorio de Biotecnología Aplicada.

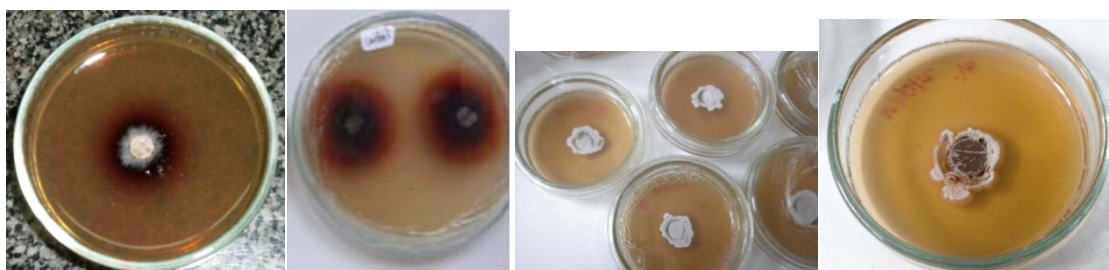
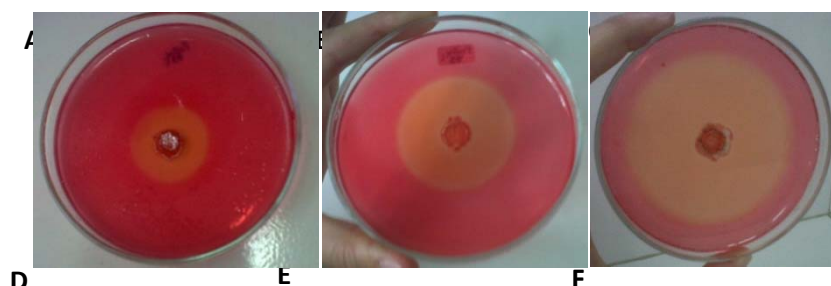


Figura 1. Halo del control positivo en medio lignina, anverso (A) y reverso (B) y siembras de las actinobacterias en medio lignina(C y D) pasados 5 días).

En el medio lignina no hubo zonas de coloración marrón o vino tinto oscuro diferentes al color del medio, resultado que se espera por la oxidación del guayacol, lo que demuestra que los aislamientos de actinobacterias evaluados no tienen la capacidad de sintetizar enzimas ligninolíticas que degraden este sustrato para luego ser tomado como fuente de carbono. El crecimiento de las actinobacterias en este medio, puede deberse a que lograron tomar el extracto de levadura como fuente de carbono y nitrógeno (45). Hay estudios en los que se afirma que la capacidad que tienen cierto tipo de actinobacterias termofílicas, para sintetizar enzimas lignocelulolíticas como lo son las endoxilanasas, ligninoperoxidasas y celulasas, más no de sintetizar enzimas propias del complejo ligninolítico que hidrolicen en su totalidad la lignina (29,30). Muchos de los géneros de actinobacterias con capacidad lignocelulolítica, se distribuyen en hábitats extremos en los que requieren la síntesis de esos complejos enzimáticos, pues no tienen otro tipo de fuente de carbono menos compleja para su óptimo desarrollo (46). Por esto último, la no degradación de la lignina puede ser explicada por el ecosistema del cual fueron tomadas las muestras de suelo, ya que las actinobacterias evaluadas fueron aisladas de suelos rizosféricos de trébol blanco, en donde prevalecen residuos celulósicos, por lo que no requieren de la expresión del complejo enzimático ligninolítico.

En la figura 2, se evidencian los resultados cualitativos que se obtuvieron de los tres aislamientos que presentaron mayor halo de hidrólisis y su crecimiento tras el paso de los 13 días de muestreo tanto en medio almidón como en medio CMC. El aislamiento MCR 33 para los días 4, 7 y 13 de muestreo, reveló halos de 1.75, 3.4, y 5.358 cm respectivamente en medio CMC; el aislamiento MCR 4 fue el segundo que demostró tener mayor actividad siendo sus halos de 1.992, 2.9, y 4.333 cm respectivamente.

Para el caso del medio almidón, MCR 6 fue el aislamiento que tuvo mayor actividad amilolítica obteniendo halos de 2.717, 2.833, y 5.05 cm los días 4, 7 y 13 respectivamente; MCR 4 obtuvo halos de 2.175, 2.458 y 4.567cm en los días de muestreos evaluados por lo que fue el segundo aislamiento con mejor actividad amilolítica.



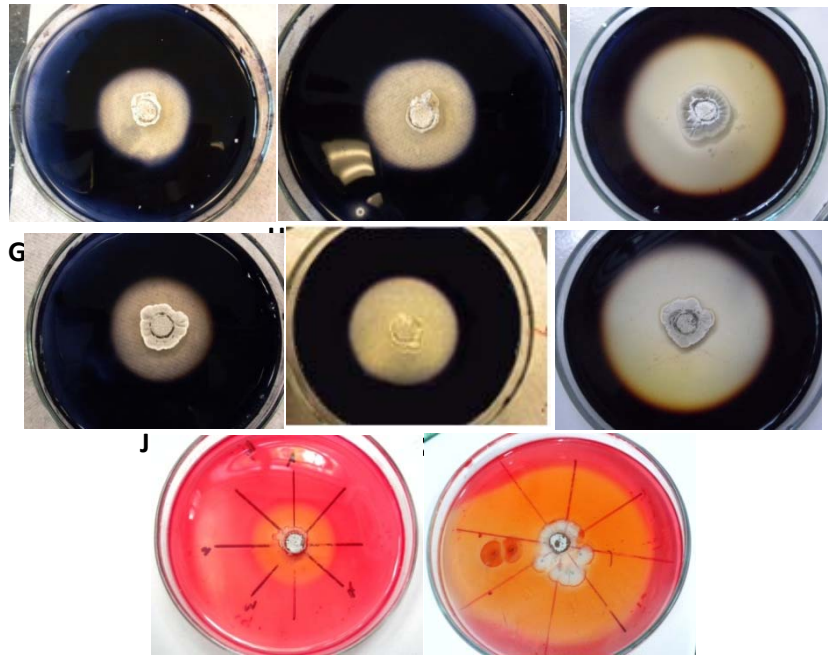


Figura 2. Halos de Hidrólisis de los aislamientos con mayor actividad cualitativa en medio CMC (rojo Congo) y Almidón (Iugol). Aislamiento MCR33 en medio CMC evaluado los días 4, 7 y 13 respectivamente (A, B, C). Aislamiento MCR6 en medio almidón evaluado los días 4, 7 y 13 respectivamente (D, E, F). Aislamiento MCR4 en medio almidón evaluado los días 4, 7 y 13 respectivamente (G, H, I) y en medio CMC evaluado los días 4 y 13 respectivamente (J, K).

En la figura 3, se muestran los halos de hidrólisis (cm) que presentó cada uno de los aislamientos en medio CMC (A) y en medio almidón (B), durante los muestreos. Se realizó un ANOVA para cada aislamiento en medio CMC (ver anexo 2, tablas) y medio almidón (ver anexo 2, tablas), con el fin de conocer si entre los días de muestreo, había diferencias significativas en cuanto a las actividades de interés. Luego se realizó una prueba Post-hoc en la que se observó el día o los días estadísticamente significativos. Para el medio CMC, 11 de los 15 aislamientos generan mayor halo el día 13, pues este tuvo mayor diferencia significativa en cuanto a la producción de enzima, con una significancia menor a 0.005, estos fueron MCR 1, MCR 2, MCR 4, MCR 5, MCR 6, MCR 10, MCR 14, MCR 18, MCR 24, MCR 30, MCR 33. Otros dos aislamientos, MCR 9 y MCR 23, no mostraron diferencias significativas entre los días de muestreo ($\text{sig.} > 0.05$), es decir tomar muestras los días 4, 7 o 13 no genera diferencias significativas en cuanto a la producción de enzima. Por último para los aislamientos MCR 26 y MCR 31, se evidenció que realizar muestreos los días 4 y 7 o 7 y 13 no genera diferencias significativas por lo que se recomienda realizar los muestreos hasta el día 4 para estos dos últimos aislamientos.

En el medio almidón todos los aislamientos tienen mayor actividad enzimática el día 13 de muestreo ya que estadísticamente hay diferencias significativas respecto a los otros días, a excepción del aislamiento MCR 16, el cual al día 7 tiene la mayor producción de enzima y no es diferente al día 13, pero si diferente al día 4.

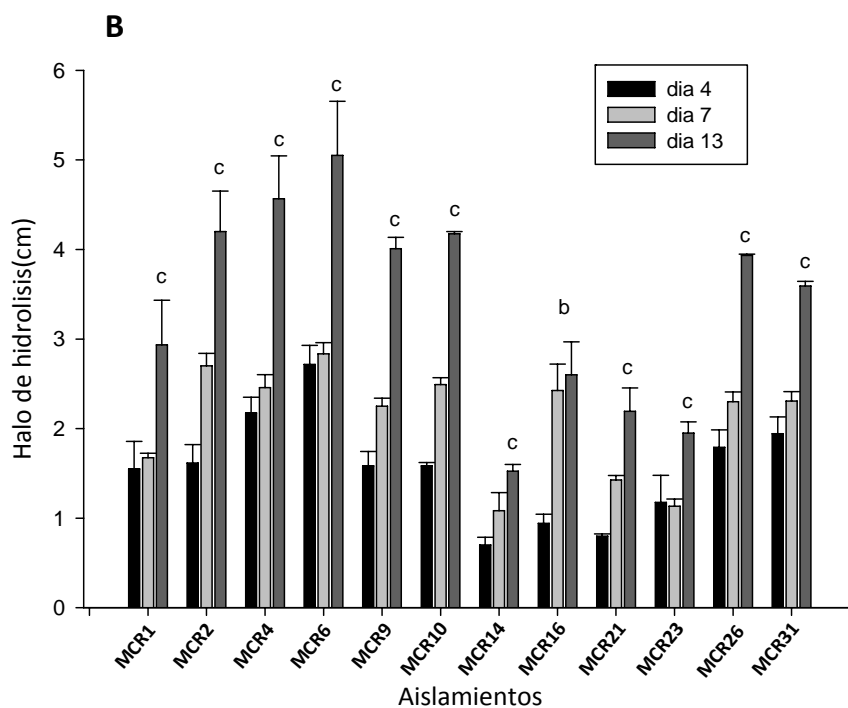
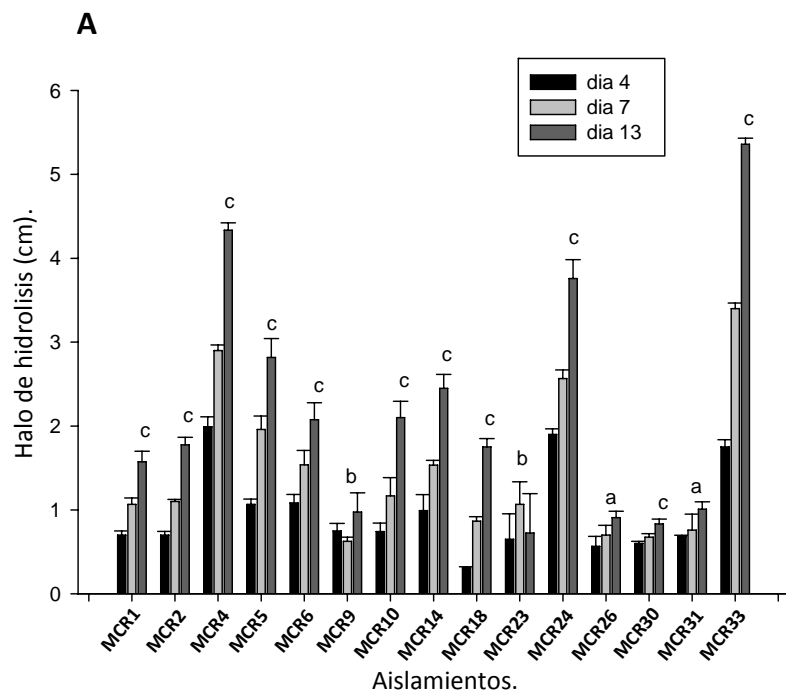
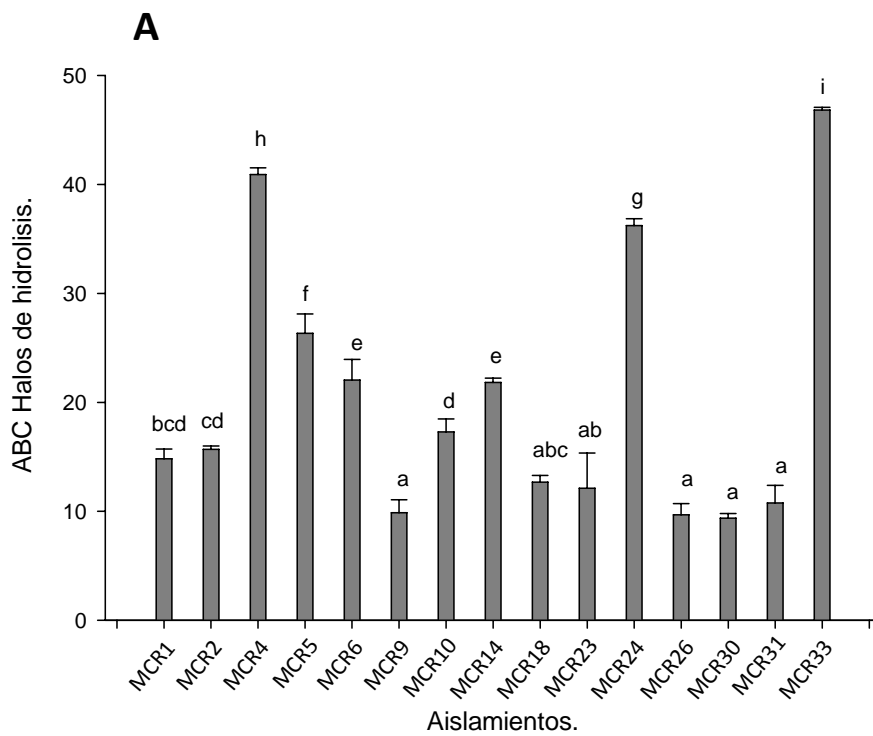


Figura 3. Halos de hidrólisis (cm) de cada uno de los aislamientos evaluados en medio CMC (A) y medio almidón (B). Las barras de error representan la desviación estándar de cada experimento (n=3). La respuesta fue estadísticamente igual en las barras con letras iguales. Las barras en color negro, gris y gris oscuro representan los días 4, 7 y 13 de muestreo respectivamente.

Por otro lado, en la figura 4, se muestran los resultados obtenidos del área bajo la curva (abc) de cada aislamiento en los medios inductores evaluados. El análisis de varianza (ANOVA) mostró que existen diferencias significativas entre los aislamientos evaluados tanto en el medio CMC ($p < 0.05$) (Ver anexo 2, tabla 1) como en el medio almidón ($p < 0.05$) (ver anexo 2, tabla 3). Las pruebas Post-hoc mostraron que el aislamiento

MCR33 (grupo i), estadísticamente presentó mayor diferencia significativa respecto a los demás aislamientos evaluados en CMC con un promedio de abc de 46.825, a su vez estas pruebas mostraron para almidón, que el aislamiento que estadísticamente mostró mayor diferencia significativa fue MCR6 (grupo e) con un promedio de abc de 44.45. Por otro lado se evidenció que el aislamiento con mayor capacidad hidrolítica en las dos fuentes evaluadas fue MCR4 (grupo h en cmc y grupo d en almidón), con promedios de abc de 40.725y 38.6625 para CMC y almidón respectivamente.



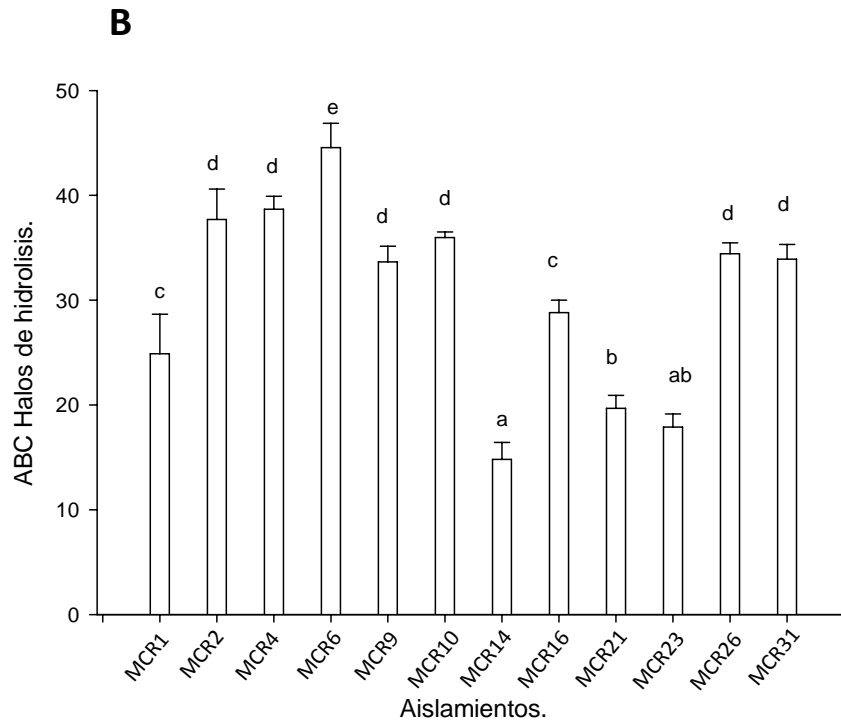


Figura 4. Promedio del área bajo la curva de los aislamientos evaluados en medio CMC (A), y medio almidón (B). La respuesta fue estadísticamente igual en las barras con letras iguales. Las barras de error representan la desviación estándar de cada experimento(n=3).

En cuanto a la degradación de CMC, como ya fue dicho para el presente trabajo los dos aislamientos seleccionados con mayor halo de aclaramiento fueron MCR33 y MCR4, los cuales presentaron al día 7 de incubación un halo de 3.4 cm y 2.9 cm respectivamente. Para el día 13 de muestreo el halo era de 5.4 cm y 4.3 cm respectivamente, resultado que se esperaba y coincide aplicando diversas metodologías previamente utilizadas como por ejemplo el estudio realizado por El-Sersy y colaboradores en 2010, en el cual realizaron la misma metodología de siembra y revelado con rojo congo utilizado en este trabajo, para seleccionar los mejores aislamientos productores de celulasas, cualitativamente obtuvieron al día 7 de incubación un halo de aclaramiento de 2.5 cm producido por una especie de *Streptomyces*, en cuanto al tiempo de muestreo, concluyeron que era necesario prolongar el tiempo de incubación para mejores resultados a nivel de actividad enzimática (47,48). Otros estudios reportan la utilización de actinobacterias aisladas de suelo, que sintetizan enzimas del sistema enzimático celulolítico como β -glucosidasas, papel filtro celulasasFPasas(y CMCasas (49,50). En un estudio realizado por Kishore en 2011, se evaluó la actividad celulolítica en agar ISP2 suplementado con CMC al 1%, de 15 aislamientos de actinobacterias aislados de un ecosistema de manglar y como resultado obtuvo una actividad positiva para todos los aislamientos analizados (51). Todos los reportes anteriormente mencionados concuerdan con lo obtenido y esperado en este trabajo, ya que a partir de actinobacterias aisladas de diferentes muestras de suelo, determinan la capacidad de estas para degradar CMC, es decir sintetizar enzimas del tipo CMCasas.

Por último, los resultados obtenidos para almidón en este trabajo, coinciden con diversos estudios anteriormente realizados en los que se reportan géneros de actinobacterias con

capacidad amilolítica. Por ejemplo en estudios realizados por Narayana y Vijayalakshmi en 2008, afirman la capacidad que tiene una especie de *Streptomyces* para hidrolizar almidón soluble al 1% a 30°C, por medio de la acción de enzimas α -amilasas (52). Otros autores afirman que algunas cepas de este mismo género, han sido reportadas con actividad amilolítica, por medio de la producción de enzimas específicas como lo son las α -amilasas, pululanasa y glucosiltransferasa (53). Para determinar actividad amilolítica, diferentes estudios utilizaron el método sensible en placa de agar, donde el medio contenía almidón soluble al 1%, posterior al tiempo de incubación inundaron las cajas con solución de yodo o lugol, las cuales revelaron halos de hidrólisis (aclaramiento del medio) alrededor de las colonias (48, 54).

Los reportes mencionados anteriormente concuerdan con lo esperado para este trabajo, pues con los mismos métodos utilizados por los autores citados, se evidenció que los aislamientos de actinobacterias evaluadas, tienen la capacidad de producir enzimas del tipo celulasas y amilasas que degradan CMC y almidón hidrosoluble respectivamente, tomando estos sustratos como fuente de carbono. Las enzimas mencionadas ejercen una acción hidrolítica sobre el sustrato, liberando monómeros de glucosa los cuales son tomados por las actinobacterias como fuente principal para su desarrollo metabólico (17, 53,55). Por tanto se obtuvo que el 65.2% de los aislamientos evaluados fue positivo para actividad celulolítica y un 52.1% de los aislamientos fue positivo para actividad amilolítica evaluados en medio sólido.

Tras la obtención y análisis estadísticos de los resultados cualitativos se decidió continuar con el aislamiento MCR4, ya que este tiene la mayor capacidad de sintetizar enzimas que degradan CMC, y a su vez también tuvo actividad amilolítica en agar almidón (ver figura 2, literal G, H e I y ver anexo 3, figura 1), de todos los aislamientos evaluados. No se siguió evaluando el aislamiento MCR33 ya que para la evaluación cuantitativa no fue posible obtener el inóculo necesario a partir del banco de conservación que se tenía.

No se evaluó MCR6 en medio líquido de almidón ya que en el transcurso se decidió enfocar este trabajo a la degradación de la celulosa como polisacárido que se encuentra en mayor proporción en las plantas y residuos de estas mismas, siendo un recurso renovable con diversidad de aplicaciones biotecnológicas y agroindustriales (5,31).

6.2 EVALUACIÓN ENZIMÁTICA CUANTITATIVA.

Los resultados respecto al análisis cuantitativo de la actividad enzimática se muestran en las figuras 5 y 6, donde se evidencia el comportamiento del aislamiento MCR 4 en presencia de la misma fuente de carbono (CMC), y diferentes fuentes de nitrógeno, extracto de levadura ($2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fuente orgánica y sulfato de amonio ($1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y cloruro de amonio ($1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fuentes inorgánicas, en función de tiempo. Para los dos casos, no hubo diferencia en la producción de biomasa y tampoco hubo producción de enzimas del tipo CMCasas ni azúcares reductores. La biomasa inicial expresada en logaritmo natural (Ln) para los dos medios fue de 0.449, en el medio con extracto de levadura, para el día 6, la biomasa en LN fue de 1,3627 como punto máximo durante la fermentación. Para el medio con sulfato y cloruro de amonio la biomasa en Ln, para el día 6 y como punto máximo fue de 1,3362.

En cuanto al pH en el medio líquido con extracto de levadura, al finalizar fue de 8,5 y su punto máximo fue de 8,5, por lo que se considera que el medio se alcalinizó respecto al pH inicial el cual era de 7. Para el caso del medio líquido con sulfato de amonio y cloruro de amonio el pH se mantuvo ácido, pues inició con un pH de 6,5 y finalizó con un pH de 6,7.

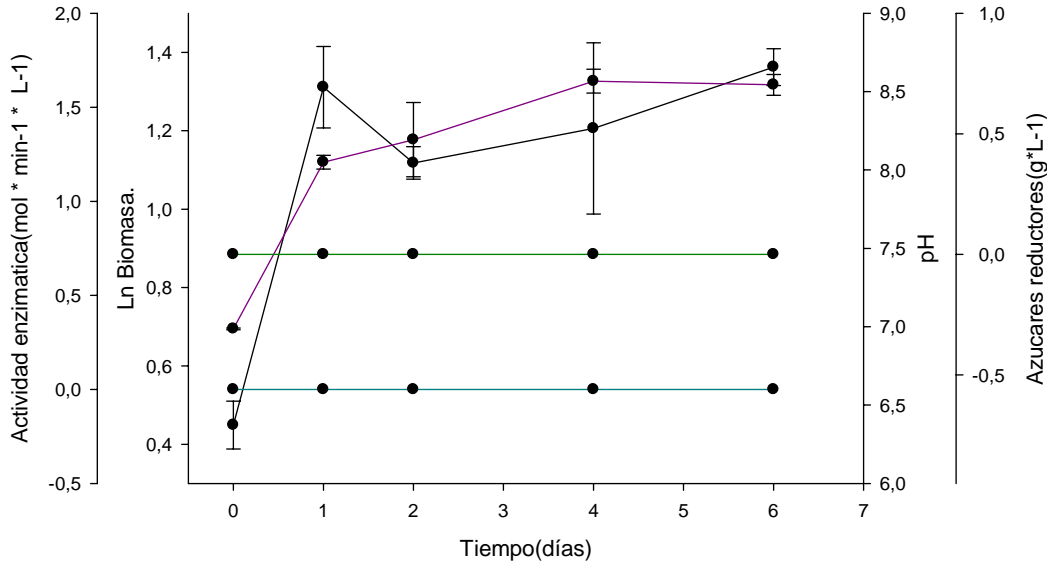


Figura 5. Grafica integrada del logaritmo natural (Ln) de biomasa (—●—), actividad celulolítica (—●—), azúcares reductores (—●—) y comportamiento del pH (—●—) en función del tiempo (días), en medio CMC con extracto de levadura como fuente orgánica de nitrógeno. Se muestra un promedio de tres replicas para todas las variables. Las barras de error representan el error estándar de cada experimento(n=3).

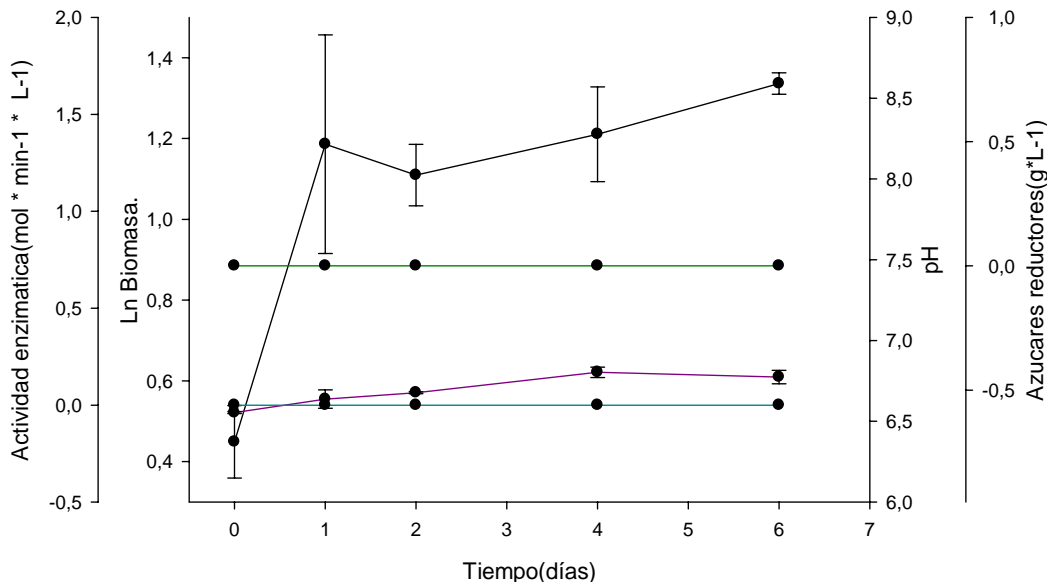


Figura 6. Grafica integrada del logaritmo natural (Ln) de biomasa (—●—), actividad celulolítica (—●—), azúcares reductores (—●—) y comportamiento del pH (—●—) en función del tiempo (días), en medio CMC con sulfato de amonio y cloruro de amonio como fuente inorgánica de nitrógeno. Se muestra un promedio de tres replicas para todas las variables. Las barras de error representan el error estándar de cada experimento(n=3).

En el medio de CMC con extracto de levadura se esperaba mayor producción de biomasa ya que el extracto de levadura provee una fuente alternativa de carbono diferente al CMC, y a su vez contiene aminoácidos, proteínas y vitaminas útiles para el desarrollo metabólico del microorganismo (45). En los dos medios evaluados, la biomasa tuvo un comportamiento similar durante los días de fermentación y no se obtuvieron los resultados que se esperaban, indicando que bajo las condiciones de ensayo, el microorganismo no tuvo la capacidad de producir enzimas responsables de la degradación de la celulosa contenida en el medio CMC, ya sea por escaso crecimiento o variables no controladas que hayan inhibido su crecimiento y por ende la producción de enzimas CMCase. Probablemente el crecimiento que mostró el aislamiento en los dos medios evaluados, para el día 1, fue por la presencia de trazas de avena que provenían del inóculo, la cual es una fuente de fácil asimilación para el microorganismo. No hubo evidencia que demostrara, que el microorganismo tomó el CMC como fuente de carbono.

Los dos medios fueron ajustados a un pH de 7, pero al agregar 5mL de inóculo, el pH inicial era de 6.9867 y 6.5533 para el medio con extracto de levadura y el medio con sulfato y cloruro de amonio respectivamente. Es probable que el inóculo agregado a los dos medios haya descendido el pH, pues este debía traer ácidos orgánicos responsables de esta acidificación, producidos previamente por el microorganismo que se encontraba en caldo avena el cual contiene hidratos de carbono.

La presencia del extracto de levadura como fuente orgánica de nitrógeno, generó alcalinidad en el medio pues hubo liberación de amonio a partir de las proteínas y los ácidos nucleicos presentes en el extracto por acción del microorganismo, pero probablemente no hubo asimilación del amonio ya que el medio se mantuvo alcalino hasta finalizar el tiempo de fermentación, lo que puede indicar que el metabolismo del microorganismo se vio afectado por condiciones o variables no controladas o conocidas(56,57).

Por otro lado el medio con nitrógeno inorgánico, continuó ácido durante la fermentación, pues se cree que no hubo sustancias que lo alcalinizaran o lo que era de esperarse, sustancias que disminuyeran notablemente el pH, pues la única fuente de carbono a la que estaba expuesto el microorganismo era CMC, cuya hidrólisis por actividad enzimática liberaría glucosa, para ser cuantificada como azúcar reductor, y esta a su vez sería metabolizada por el microorganismo generando ácidos orgánicos que acidificaran el medio(58).

En cuanto a la actividad enzimática, el aislamiento MCR 4 en medio sólido con CMC como fuente de carbono y con fuentes inorgánicas de nitrógeno, mostró tener actividad celulolítica, sin embargo, en la cuantificación enzimática en medio líquido con CMC y fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas no se evidenció dicha actividad. Como ya fue dicho anteriormente, esto puede deberse a muchas variables no controladas como por ejemplo, la aplicación de metodologías para la cuantificación de la enzima CMCase,

más específicamente las condiciones de incubación, pues es necesario conocer las temperaturas óptimas, en este caso de la enzima endo- β -1,4-glucanasa, pues ha sido reportado que por la diferencia que presentan las secuencias de aminoácidos o los, la temperatura óptima puede variar o ser afectada directamente por restos de carbohidratos no-covalente unidos a la enzima (59).

En cuanto al tipo de fermentación, es posible que este microorganismo por ser filamentoso requiera de una matriz sólida para adherirse y desarrollar su maquinaria enzimática, pues es sabido que estos microorganismos tienen la capacidad de colonizar rápida y abundantemente residuos agro-industriales junto con la producción de un alto rango de enzimas con actividades relacionadas con la lignocelulosa (46). De Jager y colaboradores en 2009, modelaron el crecimiento cinético de una especie de *Streptomyces* realizando una fermentación continua en un reactor de membrana gradostático (MGR), el microorganismo formaba una biopelícula sobre la superficie de una matriz sólida que en este caso era una membrana con fibra de cerámica, produciendo así altas concentraciones del metabolito de interés como lo son las enzimas (59). Otro estudio realizado por Saqib y colaboradores en 2010, evidenciaron que al realizar fermentaciones sólidas se obtienen mejores resultados en cuanto a la producción de biomasa y actividad enzimática, y puede deberse al hecho de que las condiciones experimentales son más cercanas a la naturaleza del hábitat del microorganismo(60). Por otro lado hay estudios en los que utilizan medios líquidos para obtener biomasa y metabolitos bioactivos por parte de una especie de *Streptomyces*, Singh y colaboradores en 2009, optimizaron un medio líquido con un medio basal con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno al 1%, por otro lado evaluaron diferentes condiciones de incubación como temperatura, agitación, pH del medio y periodos de incubación para así conocer que días hay menor o mayor producción ya sea del metabolito de interés o de biomasa generada(61,63).

7. CONCLUSIONES.

- Con la metodología utilizada para el análisis enzimático cualitativo, se logró evidenciar los aislamientos que tenían la capacidad de sintetizar enzimas que degradaran CMC, almidón o lignina como fuente única de carbono.
- Ninguno de los aislamientos evaluados, tienen la capacidad de producir enzimas que logren degradar la lignina como única fuente de carbono bajo las condiciones estudiadas.
- De los 23 aislamientos evaluados, el 65.2% de los aislamientos fueron positivos para CMC y el 52.1% fue positivos para almidón.
- Los aislamientos que demostraron tener mayor diferencia significativa a nivel estadístico fueron, para CMC los aislamientos MCR 33 y MCR 4, y para almidón MCR 6 y MCR 4.

- Se evidenciaron diferencias significativas entre los tiempos de muestreo 4, 7 y 13, en los que dependiendo del medio y del aislamiento, el día de mayor producción de halo de hidrólisis (cm) varía.
- No se evidenció actividad enzimática en medio líquido utilizando CMC como fuente de carbono y diferentes fuentes de nitrógeno, para el aislamiento MCR4.

8. RECOMENDACIONES.

- Se recomienda realizar estudios de optimización para el aislamiento MCR4 en medios líquidos, donde se evalúen diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para conocer su metabolismo, condiciones óptimas de crecimiento y de incubación.
- Evaluar la actividad celulolítica en medio líquido de MCR4, aplicando la optimización de las condiciones de cultivo y empleando diferentes metodologías para la cuantificación de CMCasas.
- Buscar otras alternativas para realizar mediciones de biomasa en fermentación líquida, eliminando cualquier interferente que pueda generar falsos positivos (ej: precipitados de almidón).
- Realizar un tamizaje de los aislamientos que tuvieron mayor actividad celulolítica en medio sólido, o evaluar MCR 4 en fermentación sólida, posteriormente evaluar la actividad enzimática utilizando DNS y metodologías descritas para este tipo de fermentación

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Pina N, Peñuela G. Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2011; **65**, 827 – 831.
2. Findlay S, Sinsabaugh R. Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter. Arnosti C. Chapter 13: Microbial Extracellular Enzymes and their Role in Dissolved Organic Matter Cycling, Pages 315-342. University of Toledo, OH, U.S.A. 2002, 512 pages.
3. Gupta R, Beg QK, Lorenz P, Bacterial alkaline protease: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; **59**, 15–32.

4. Fraeye I, Roeck A, Duvetter T, Verlent I, Hendrickx M, Loey AV. Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation. *Food Chemistry* 2007; **105**, 555-563.
5. Zhang Y-HP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnology Bioengineering* 2004; **88**, 797–824.
6. Melillo JM, Steudler PA, Aber JD, Newkirk K, Lux H, Bowles FP. Soil warming and carbon-cycle feedbacks to the climate system. *Science* 2002; **298**, 2173–2179.
7. Moreira N. Growing expectations: new technology could turn fuel into a bump crop. *Science News Online* 2005; **168**(14):209–233.
8. Sjostrom E. *Wood chemistry: fundamentals and applications*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press Inc.; 1993.
9. Sena-Martins G, Almeida-Vara E, Duarte JC. Eco-friendly new products from enzymatically modified industrial lignins. *Industrial crops and products* 2008; **27**, 189-195.
10. Tengerdy RP, Szakacs G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 2003; **13**, 169-179.
11. Bozic N, Ruiz J, Lopez-Santín J, Vujcic Z. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal* 2011; **53**, 203-209.
12. Haritha R, Kumar KS, Mohan J, Ramana T. Amylolytic and proteolytic Actinobacteria Isolated from marine sediments of Bay of Bengal. *International Journal of Microbiological Research* 2010; **1**(2), 37-44.
13. Chang CH, Yang SS. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multifunctional biofertilizer preparation. *Bioresource Technology* 2009; **100**, 1648-1658.
14. Fuentes MS, Benimeli CS, Cuozzo SA, Amoroso MJ. Isolation of pesticide-degrading actinomycetes from a contaminated site: Bacterial growth, removal and dechlorination of organochlorine pesticides. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2010; **64**, 434-441.

15. Franco M, Quintana A, Duque C, Suarez C, Rodriguez MX, Barea JM. Evaluation of actinomycetes strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology* 2010; **45**, 209-217.
16. Fuka MM, Engel M, Munch JC, Schloter M. *Biology of the Nitrogen Cycle*. 1a Edición. H Bolye, JS Ferguson y WE Newton. Alemania. 2007; 303-309 pag.
17. Abdulla HM, El-Shatouru SA. Actinomycetes in rice Straw decomposition. *Waste Management* 2007; **27**, 850-853.
18. Jan HD, Chen KS. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 2003; **19**(8), 263.
19. Montenegro TL, Montenegro TC, Pereira N, Rosália CE, Do Cormo M, Ha-Park Y, Bae JW, Araujo JM. Interspecies variation of *Kitasatospora* endophytic from yam bean producing thermostable amylases in alternative media. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2007; **23**, 1719-1724.
20. Al-Zarban SS, Abbas I, Al-Musallam AA, Steiner V, Stackerbrandt E, Kroppenstedt, RM. *Nocardiopsis halotolerans* sp. Nov., isolated from salt marsh soil in Kuwait. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; **52**, 525-529.
21. Boyaci, IH. A new approach of determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 2005; **25**, 55-62.
22. Dietz A, Currie SA. Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry. Capítulo 5: Actinomycetes. 1996, Pag. 85–99. Consultado el día 20 de enero de 2012, en <https://bases.javeriana.edu.co>.
23. Gopalaskrishnan S, Pande S, Sharma M, Humayun P, Kiran BK, Sandeep D, Vidya MS, Deepthi K, Rupela O. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. *Crop Protection* 2011; **30**, 1070-1078.
24. Hamdali H, Hafidi M, Virolle MJ, Ouhdouch Y. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Applied Soil Ecology* 2008; **40**, 510-517.

25. Arora DS, Chander M, Gill PK. Involvement of lignin peroxides, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration*2002; **50**, 115-120.
26. Hofrichten M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase(MnP). *Enzyme and Microbial Techonology*2002; **30**, 454-466.
27. Thevenot M, Dignac MF, Rumpel C. Fate of lignins in soils: A review. *Soil Biology & Biochemistry*2010; **42**, 1200-1211.
28. Glenn JK, Gold MJ. Purification and characterization of an extracellular Mn(II) dependent peroxidase from the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*1985; **242**, 329-341.
29. Tuncer M, Ball AS, Rob A, Wilson MT. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme and Microbial Technology*1999; **25**, 38-47.
30. Iyer AP, Mahadevan A. Lignin degradation by bacteria. *Progress in industrial microbiology* 2002; **36**, 311-330.
31. Jakob HF, Fengel D, Tschegg SE, Fratzl P. The elementary cellulose fibril in *Picea abies*: comparison of transmission electron microscopy, small-angle X-ray scattering and wide-angle X-ray scattering results. *Macromolecules*1995; **28**, 8782-8789.
32. Zugenmaier P. Crystalline cellulose and derivatives: Characterization and structures sprignerseties in wood science. In P.Zugenmaier(Ed.), *Crystalline cellulose and derivatives, characterization and structures*2008, 7-8.
33. Bayer EA, Chanzy H, Lamed R, Shoham Y. Cellulose, cellulose and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*1998; **8**, 546-557.
34. Grigorevski de Lima AL, Pires do Nascimento R, Pinto da Silva E, Rodriguez R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology*2007; **37**, 272-277.
35. Jang HD, Chen KS. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces transformant* T3-1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*2003; **19**, 263-268.

36. Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*2000; **18**(83), 355.
37. Tester RF, Karkalas, J, Qi X. Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 2004; **39**, 151-165.
38. Hoover R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*2001; **45**, 253-267.
39. Busch JE, Stutzenberger FJ. Amylolytic activity of *Thermomonosporafusca*. *World Journal of Microbiology and biotechnology*1997; **13**, 637-642.
40. Abou-Elela GM, El-Sersy NA, Wefky SH. Statistical optimization of cold adapted α -amylase production by free and immobilized cells of *Nocardiaopsisaegyptia*. *Journal of Applied Sciences Research*2009; **5**(3), 286-292.
41. Thorn RG, Reddy CA, Harris D, Paul EA. Isolation of Saprophytic Basidiomycetes from Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; **62**(11):4288-4292.
42. Pedroza AM, Matiz A, Quevedo B, Aguirre A. Manual de introducción a la Biotecnología. Primera Edición. Bogotá DC,. Colombia. 2007. Capitulo 4, 39-43.
43. Da Vinha FN, Gravina-Oliveira MP, Franco MN, Macrae A, Pinto E, Pires R, Rodriguez RR. Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2011; **164**, 256-267.
44. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959; **31**, 426–8.
45. Mehta VJ, Thumar JT, Singh SP. Production of alkaline protease from an alkaliphilicactinomycete. *Bioresource Technology*2006; **97**, 1650-1654.
46. Orozco AL, Guevara O, Rodriguez J, Hernandez M, Gonzales-Vila FJ, Polvillo O, Arias ME. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py-GC/MS analysis. *Journal of analytical and applied pyrolysis*2008; **81**, 247-252.

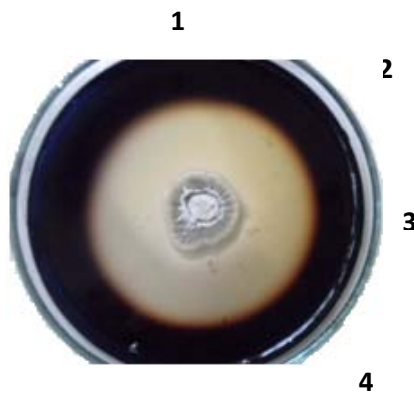
47. El-Sersy NA, Abd-Elnaby H, Abou-Elela GM, Ibrahim H, El-Toukhy NM. Optimization, economization and characterization of cellulose produced by marine *Streptomyces ruber*. *African Journal of Biotechnology* 2010; **9**(98), 6355-6364.
48. Manivasagan P, Gnanam S, Sivakumar K, Thangaradjou T, Vijayalakshmi S, Balasubramanian T. Isolation, identification and characterization of multiple enzyme producing actinobacteria from sediment samples of Kodiyakarai coast, the Bay of Bengal. *African Journal of Microbiology Research* 2010; **4**(14), 1550-1559.
49. Arora A, Nain and Gupta JK.. Solid-state fermentation of wood residues by *Streptomyces griseus* B1, a soil isolate, and solubilization of lignins. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2005; **21**: 303–308.
50. Arunachalam.R, Wesely.E.G, George.J and Annadurai. Novel Approaches for Identification of *Streptomyces noboritoensis* TBG-V20 with Cellulase Production. *Current Research in Bacteriology* 2010; **3** (1): 15-26.
51. Kishore P. Isolation, characterization and identification of Actinobacteria of Mangrove ecosystem, Bhitarkanika, Odisha. Department of Life Science National Institute of Technology Rourkela, Odisha. **Master of Science Thesis**, 85pages.
52. Narayana KJP y Vijayalakshmi. Production of extracellular α -amylase por *Streptomyces albidoflavus*. *Asian Journal of Biochemistry*. 2008; **3** (3): 194-197.
53. Nigam P, Singh D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology* 1995; **17**, 770-778.
54. Vengadesh K, Sundaramoorthi C, Gupta S, Karthick K, Tamiselvi N. Production and characterization of antibiotics from soil-isolated actinomycetes. *International Research Journal of Pharmacy* 2011; **2**(4):114-118.
55. Reddy NS, Nimmagadda A, Sambasiva KRS. An overview of the microbial α -amylase family. *African Journal of Biotechnology* 2003; **2**(12), 645-648.
56. Chikae M, Ikeda R, Kerman K, morita Y, Tamiya E. Estimation of maturity of compost from food waste and agro-residues by multiple regression analysis. *Bioresource Technology* 2006; **97**, 1979-1985.
57. Ke GR, Lai CM, Liu YY, Yang SS. Inoculation of food waste with the thermo-tolerant lipolytic actinomycete *Thermoactinomyces vulgaris* A31 and maturity evaluation of the compost. *Bioresource Technology* 2010; **101**, 7424-7431.

58. Saqib AA, Whitney PJ. Role of fragmentation activity in cellulose hydrolysis. *International Biodeterioration&Biodegradation* 2006; **58**, 180-185.
59. Jager DD, Sheldon MS, Edwards W. Modelling growth kinetics of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) in a pressurized membrane gradostat reactor (MGR). *Enzyme and Microbial Technology*2009; **45**, 449-456.
60. Singh LS, Mazumder S, Bora TC. Optimization of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *Journal de Mycologie Médicale*2009; **19**, 225-233.
61. Alani F, William AA, Murray MY. New isolate of *Streptomyces* sp. With novel thermo-alkalotolerant cellulases. *Biotechnology Letters*2008; **30**, 123-126.
62. Saqib AA, Hassan M, Khan NF, Baig S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* growth under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). *Process Biochemistry*2010; **45**, 641-646.

Anexo 1.

Figura 1. La lectura correspondiente para cada halo de degradación en los medios específicos se realizó siguiendo la metodología descrita a continuación:

Se trazan 4 líneas en la caja y se miden los mm de halo, en cada uno de los puntos, luego se saca un promedio de las 4 medidas tomadas. También se mide la colonia 4 veces y se promedian. Al tener el promedio de medida tanto de la colonia como del halo de degradación se restan para obtener el valor correcto de la actividad o degradación enzimática.



A - B= C Siendo

A= mm del halo (aclaramiento del medio).

B= mm de la colonia.

C= mm respectivos a la acción enzimática.

Esto se debe realizar por cada caja y aislamiento en cada uno de los 3 días de muestreos.

Anexo 2.

Tablas 1. ANOVA de un factor y pruebas Post Hoc de los halos producidos por 15 aislamiento en medio solido CMC durante el tiempo de muestreo.

AISLAMIENTO 1.

ANOVA.

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,158	2	,579	72,530	,000
Intra-grupos	,048	6	,008		
Total	1,206	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	,7000		
7	3		1,0667	
13	3			1,5750

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

AISLAMIENTO 2.

ANOVA.

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,771	2	,886	250,059	,000
Intra-grupos	,021	6	,004		
Total	1,793	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	,7000		
7	3		1,1000	
13	3			1,7750

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

AISLAMIENTO 4.

ANOVA

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.

Inter-grupos	8,363	2	4,181	481,704	,000
Intra-grupos	,052	6	,009		
Total	8,415	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	1,9917		
7	3		2,9000	
13	3			4,3333

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 5.

ANOVA

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4,594	2	2,297	85,475	,000
Intra-grupos	,161	6	,027		
Total	4,756	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	1,0667		
7	3		1,9583	
13	3			2,8167

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 6.

ANOVA

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,815	2	,908	34,031	,001
Intra-grupos	,160	6	,027		
Total	1,975	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	1,0833		
7	3		1,6333	
13	3			2,1833

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 9.

ANOVA

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,189	2	,094	4,485	,064
Intra-grupos	,126	6	,021		
Total	,315	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1		
7	3			,6250
4	3			,7500
13	3			,9750

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 10.

ANOVA

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,897	2	1,448	45,243	,000
Intra-grupos	,192	6	,032		
Total	3,089	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	,7417		
7	3		1,1667	
13	3			2,1000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 14.

ANOVA

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3,260	2	1,630	73,359	,000
Intra-grupos	,133	6	,022		
Total	3,394	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	,9917		
7	3		1,5333	
13	3			2,4500

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 18.**ANOVA**

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3,170	2	1,585	368,177	,000
Intra-grupos	,026	6	,004		
Total	3,196	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	,3083		
7	3		,8667	
13	3			1,7500

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 23.**ANOVA**

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,296	2	,148	1,160	,375
Intra-grupos	,765	6	,128		
Total	1,061	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
4	3	,6500
13	3	,7250
7	3	1,0667

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 24.

ANOVA

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5,318	2	2,659	121,939	,000
Intra-grupos	,131	6	,022		
Total	5,449	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	1,9000		
7	3		2,5667	
13	3			3,7583

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 26.

ANOVA

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,178	2	,089	8,108	,020
Intra-grupos	,066	6	,011		
Total	,244	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4	3	,5667	
7	3	,7000	,7000
13	3		,9083

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 30.

ANOVA

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,085	2	,043	21,893	,002
Intra-grupos	,012	6	,002		
Total	,097	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4	3	,6000	
7	3	,6750	
13	3		,8333

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

 AISLAMIENTO 31.**ANOVA**

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,174	2	,087	5,873	,039
Intra-grupos	,089	6	,015		
Total	,263	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4	3	,6833	
7	3	,7583	,7583
13	3		1,0083

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

 AISLAMIENTO 33.**ANOVA**

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	19,578	2	9,789	1719,012	,000
Intra-grupos	,034	6	,006		
Total	19,612	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	1,7500		
7	3		3,4000	
13	3			5,3583

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

Tablas 2. ANOVA de un factor y pruebas Post Hoc de los halos producidos por 12 aislamiento en medio solido almidón durante el tiempo de muestreo.

AISLAMIENTO 1.

ANOVA.

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3,509	2	1,754	19,261	,002
Intra-grupos	,547	6	,091		
Total	4,055	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4	3	1,5533	
7	3	1,6800	
13	3		2,9367

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

AISLAMIENTO 2.

ANOVA.

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	10,097	2	5,049	57,574	,000
Intra-grupos	,526	6	,088		
Total	10,623	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	1,6200		
7	3		2,7033	
13	3			4,2033

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

AISLAMIENTO 4.

ANOVA.

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	10,248	2	5,124	54,752	,000
Intra-grupos	,562	6	,094		
Total	10,810	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4	3	2,1767	
7	3	2,4633	
13	3		4,5700

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

AIJSMIENTO 6.**ANOVA.**

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	10,355	2	5,178	36,154	,000
Intra-grupos	,859	6	,143		
Total	11,215	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4	3	2,7200	
7	3	2,8333	
13	3		5,0500

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

AIJSMIENTO 9.**ANOVA.**

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	9,423	2	4,712	284,030	,000
Intra-grupos	,100	6	,017		
Total	9,523	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	1,5833		
7	3		2,2533	
13	3			4,0100

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

AISLAMIENTO 10. **ANOVA.**

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	10,359	2	5,179	1918,259	,000
Intra-grupos	,016	6	,003		
Total	10,375	8			

 PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	1,5867		
7	3		2,4967	
13	3			4,1767

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

 AISLAMIENTO 14. **ANOVA.**

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,027	2	,513	28,542	,001
Intra-grupos	,108	6	,018		
Total	1,135	8			

 PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	,7000		
7	3		1,0833	
13	3			1,5267

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

 AISLAMIENTO 16. **ANOVA.**

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4,987	2	2,494	32,051	,001
Intra-grupos	,467	6	,078		
Total	5,454	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4	3	,9433	
7	3		2,4267
13	3		2,6033

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 21.**ANOVA.**

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,907	2	1,454	61,628	,000
Intra-grupos	,142	6	,024		
Total	3,049	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	,8033		
7	3		1,4300	
13	3			2,1933

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ASLAMIENTO 23.**ANOVA.**

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,272	2	,636	16,459	,004
Intra-grupos	,232	6	,039		
Total	1,504	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
7	3	1,1367	
4	3	1,1767	
13	3		1,9533

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

AISLAMIENTO 26.

ANOVA.

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7,522	2	3,761	230,729	,000
Intra-grupos	,098	6	,016		
Total	7,620	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	1,7933		
7	3		2,3033	
13	3			3,9367

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

AISLAMIENTO 31.

ANOVA.

Halo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4,498	2	2,249	141,737	,000
Intra-grupos	,095	6	,016		
Total	4,593	8			

PRUEBA POST HOC

Subconjuntos homogéneos.

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	1,9433		
7	3		2,3133	
13	3			3,5933

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000

Tabla 3. Análisis de varianza de un factor y pruebas Post Hoc de los halos producidos por los 15 aislamientos evaluados en medio solido CMC.

ANOVA

ABC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6101,748	14	435,839	250,523	,000
Intra-grupos	52,192	30	1,740		
Total	6153,940	44			

Tabla 4. Análisis de varianza de un factor y pruebas Post Hoc de los halos producidos por los 12

PRUEBAS POST HOC

Subconjuntos homogéneos

ABC

Tukey B^a

Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05								
		a	b	c	d	e	f	g	h	i
30	3	9,3625								
26	3	9,6750								
9	3	9,8625								
31	3	10,7625								
23	3	12,1250	12,1250							
18	3	12,6750	12,6750	12,6750						
1	3		14,8250	14,8250	14,8250					
2	3			15,6750	15,6750					
10	3				17,2750					
14	3					21,8250				
6	3					22,0500				
5	3						26,3375			
24	3							36,2250		
4	3								40,7250	
33	3									46,8250

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

aislamientos evaluados en medio solido almidón.

ANOVA

ABC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2821,195	11	256,472	73,053	,000
Intra-grupos	84,259	24	3,511		
Total	2905,454	35			

PRUEBAS POST HOC

Subconjuntos homogéneos

ABC

Tukey B^a

Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		a	b	c	d	e
14	3	14,8000				
23	3	17,8750	17,8750			
21	3		19,6625			
1	3			24,8750		
16	3			28,8125		
9	3				33,6500	
31	3				33,9125	
26	3				34,4250	
10	3				35,9625	
2	3				37,7000	
4	3				38,6625	
6	3					44,5500

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

Anexo 3.

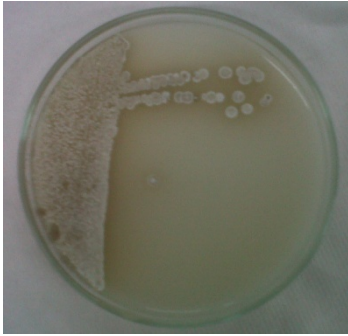


Figura 1. Macroscopia de MCR 4, aislada en medio avena y microscopia con tinción de Gram 100x