



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA INGENIERÍA DE INDUSTRIAS PECUARIAS

**CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA USO
AGROINDUSTRIAL AISLADOS DE UN BOSQUE PRIMARIO EN
EL CANTON CUMANDÁ”.**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

AUTOR: SILVIA AZUCENA DELGADO CAIZAGUANO

DIRECTOR: Ing. IVÁN PATRICIO SALGADO TELLO MSc.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Silvia Azucena Delgado Caizaguano

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, SILVIA AZUCENA DELGADO CAIZAGUANO, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 31 de enero de 2023

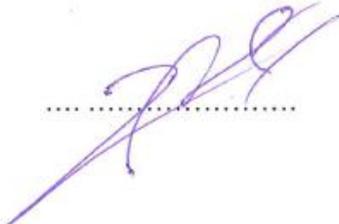
A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Silvia', is positioned above the printed name and phone number.

Silvia Azucena Delgado Caizaguano

0604717744

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Trabajo Experimental, **CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA USO AGROINDUSTRIAL AISLADOS DE UN BOSQUE PRIMARIO EN EL CANTON CUMANDÁ**”, realizado por la señorita: **SILVIA AZUCENA DELGADO CAIZAGUANO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. César Iván Flores Mancheno PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-01-31
Ing. Iván Patricio Salgado Tello MSc. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2023-01-31
BQF. María Verónica González Cabrera MIEMBRO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2023-01-31

DEDICATORIA

La presente investigación está dedicada primero a Dios segundo a mis padres por ser mi apoyo incondicional para poder llegar a cumplir una meta más en mi vida, ya que ellos siempre han sido mi mayor motivación para nunca rendirme.

Silvia

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme salud y sabiduría cada día y a mis padres por el apoyo que me brindaron moralmente y económico en todo momento.

Al Ing. Iván Patricio Salgado Tello MsC como director por su ayuda permanente para culminar este trabajo de titulación.

A la BQF. María Verónica González Cabrera como asesor de mi trabajo de titulación, por su paciencia y revisión.

Silvia

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	3
1.1. Bosque Primario.....	3
1.1.1. <i>Características de los Bosques Primarios.....</i>	<i>3</i>
1.2. Muestreo.....	4
1.2.1. <i>Tipos de muestreos del suelo.....</i>	<i>4</i>
1.3. Suelo.....	4
1.3.1. <i>Horizontes de un suelo.....</i>	<i>5</i>
1.3.2. <i>Composición del suelo.....</i>	<i>5</i>
1.3.3. <i>Propiedades físicos- químicos del suelo.....</i>	<i>6</i>
1.3.3.1. <i>Relación del suelo pH.....</i>	<i>6</i>
1.3.3.2. <i>Materia orgánica del suelo.....</i>	<i>7</i>
1.3.3.3. <i>Nitrógeno.....</i>	<i>8</i>
1.4. Microorganismos.....	8
1.4.1. <i>La diversidad microbiana del suelo.....</i>	<i>8</i>
1.4.2. <i>Crecimiento de los microorganismos.....</i>	<i>9</i>
1.4.3. <i>Bacterias presentes en el suelo.....</i>	<i>10</i>
1.4.4. <i>Bacterias ácido lácticas.....</i>	<i>10</i>
1.4.4.1. <i>Bacillus.....</i>	<i>11</i>
1.4.5. <i>Bacterias acéticas.....</i>	<i>12</i>
1.4.6. <i>Levaduras.....</i>	<i>12</i>
1.4.6.1. <i>Las levaduras presentes en el suelo.....</i>	<i>13</i>
1.4.6.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae.....</i>	<i>13</i>
1.4.7. <i>Aislamiento microbiano.....</i>	<i>14</i>
1.4.8. <i>Técnicas de aislamiento.....</i>	<i>14</i>
1.4.8.1. <i>Método de siembra por estría en placa.....</i>	<i>14</i>

1.4.8.2.	<i>Método de siembra en superficie o siembra en placa.</i>	14
1.4.9.	Métodos de identificación.	14
1.4.9.1.	<i>Tinción de Gram y morfología.</i>	15
1.4.9.2.	<i>Movilidad.</i>	15
1.4.10.	Pruebas bioquímicas.	16
1.4.10.1.	<i>Prueba de catalasa.</i>	16
1.4.10.2.	<i>Prueba de oxidasa.</i>	16

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	17
2.1.	Población de estudio.	17
2.2.	Tamaño de muestra.	17
2.3.	Selección de la muestra.	18
2.4.	Localización y duración del experimento.	18
2.5.	Localización del lugar del muestreo.	18
2.6.	Unidades experimentales.	19
2.7.	Materiales, equipos e instalaciones	19
2.7.1.	<i>Materiales.</i>	19
2.7.2.	<i>Insumos de laboratorio</i>	20
2.7.3.	<i>Equipos</i>	21
2.7.4.	<i>Instalaciones</i>	21
2.8.	Mediciones experimentales.	21
2.9.	Características análisis físico - químicas del suelo.	21
2.10.	Aislamiento, purificación e identificación de microorganismos de uso Agroindustrial del suelo	22
2.10.1.	<i>Bacterias ácido - lácticas</i>	22
2.10.2.	<i>Bacterias acéticas</i>	22
2.10.3.	<i>Levaduras</i>	22
2.11.	Técnicas estadísticas	22
2.12.	Metodología de la evaluación.	22
2.13.	Método de muestreo en campo.	22
2.14.	Fase de laboratorio.	23
2.14.1.	<i>Método de preparar las muestras en laboratorio para el aislamiento.</i>	23
2.14.2.	<i>Siembra de Bacterias Ácido - lácticas (Medio de Cultivo MRS).</i>	23
2.14.3.	<i>Siembra de levaduras (Medio de Cultivo Sabouraud).</i>	24
2.14.4.	<i>Siembra de bacterias fermentativas</i>	24

2.14.5.	<i>Recuento en placa a las 48 horas.</i>	24
2.14.6.	<i>Identificación macroscópica de microorganismos de uso agroindustrial.</i>	25
2.14.7.	<i>Identificación microscópica de Bacterias Ácido Láctica.</i>	25
2.14.8.	<i>Identificación microscópica de levaduras.</i>	25
2.14.9.	<i>Identificación microscópica de Bacteria fermentativas.</i>	26
2.14.10.	<i>Aislamiento de Bacterias Ácido - Lácticas</i>	26
2.14.11.	<i>Aislamiento de levaduras.</i>	27
2.14.12.	<i>Aislamiento de bacterias fermentativas</i>	27
2.14.13.	<i>Identificación bioquímica de los microorganismos.</i>	28
2.14.13.1.	<i>Prueba de catalasa.</i>	28
2.14.13.2.	<i>Prueba de oxidasa.</i>	28
2.14.13.3.	<i>Prueba de tinción de Gram</i>	28
2.14.13.4.	<i>Prueba KOH.</i>	28
2.14.13.5.	<i>Prueba de movilidad.</i>	29
2.14.13.6.	<i>Prueba de fermentación de azúcares.</i>	29
2.14.13.7.	<i>Prueba de fermentación de azúcares en bacterias acéticas y levaduras.</i>	30
2.14.13.8.	<i>Prueba bioquímica caldo YPD.</i>	30
2.14.13.9.	<i>Conservación de especies aisladas.</i>	31
2.15.	Pruebas físico - químicas del suelo.	31
2.15.1.	<i>Medida del pH en las muestras del suelo.</i>	31
2.15.2.	<i>Medición de la cantidad de la materia seca en las muestras del suelo</i>	32
2.15.3.	<i>Medición de la cantidad de cenizas en las muestras de suelo</i>	32
2.15.4.	<i>Medición de la cantidad de materia orgánica en las muestras del suelo.</i>	33
2.15.5.	<i>Medición de la cantidad de nitrógeno en las muestras del suelo</i>	33
2.15.6.	<i>Medición de la cantidad de minerales (Magnesio) en las muestras de suelo</i>	34
2.15.7.	<i>Medición de la cantidad de minerales Nitratos en las muestras de suelo.</i>	34
2.15.8.	<i>Medición de la cantidad de potasio en las muestras de suelo.</i>	35

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	36
3.1.	Análisis físicos químicos del suelo.	36
3.1.1.	<i>pH del suelo del bosque primario.</i>	36
3.1.2.	<i>Materia orgánica del suelo del bosque primario</i>	36
3.1.3.	<i>Humedad del suelo de bosque primario.</i>	37
3.1.4.	<i>Ceniza del suelo de bosque primario.</i>	37
3.1.5.	<i>Nitrógeno asimilable del suelo del bosque primario.</i>	37

3.1.6.	<i>Cantidad de potasio (K), de las muestras de suelo de bosque primario.</i>	38
3.1.7.	<i>Cantidad de magnesio (Mg), de las muestras de suelo de bosque primario.</i>	38
3.1.8.	<i>Cantidad de nitratos de las muestras de suelo de bosque primario.</i>	38
3.2.	Bacterias Ácido - Lácticas.	38
3.2.1.	<i>Aislamiento de las Bacterias Ácido - Lácticas.</i>	38
3.3.	Caracterización de los microorganismos para uso agroindustrial.	39
3.3.1.	<i>Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas de Bacterias ácido lácticas.</i>	39
3.3.2.	<i>Prueba de movilidad.</i>	40
3.3.3.	<i>Prueba de fermentación de azúcares.</i>	40
3.4.	Bacterias Acéticas.	41
3.4.1.	<i>Identificación morfológica de las Bacterias Acéticas.</i>	41
3.4.2.	<i>Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas.</i>	41
3.4.3.	<i>Prueba de fermentación de azúcares de las BAA</i>	42
3.5.	Levaduras.	43
3.5.1.	<i>Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas.</i>	44
3.5.2.	<i>Prueba de fermentación de azúcares de levaduras.</i>	44
	CONCLUSIONES	46
	RECOMENDACIONES	47
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Propiedades físicos-químicos del suelo.....	6
Tabla 1-2:	Ingredientes de caldo rojo fenol.	29
Tabla 2-2:	Ingredientes del TSI Agar.	30
Tabla 3-2:	Fórmula del caldo YPD.....	31
Tabla 1-3:	Estadística descriptiva del suelo del bosque primario del cantón Cumandá.	36
Tabla 2-3:	Identificación morfológica de las BAL aisladas del bosque primario del cantón Cumandá.	39
Tabla 3-3:	Pruebas bioquímicas en BAL Catalasa, Oxidasa e Hidróxido de Potasio.....	39
Tabla 4-3:	Resultados de la prueba de fermentación de azúcares en BAL.	40
Tabla 5-3:	Morfología de las bacterias acéticas aisladas del bosque primario del Cantón Cumandá.	41
Tabla 6-3:	Pruebas bioquímicas en bacterias Acéticas Oxidasa y Catalasa.....	42
Tabla 7-3:	Fermentación de azúcares de bacterias acéticas.	42
Tabla 8-3:	Morfología de las levaduras aisladas del bosque primario de Cumandá.....	43
Tabla 9-3:	Pruebas bioquímicas en Levaduras Caldo YPD.	44
Tabla 10-3:	Pruebas bioquímicas en Levaduras en Fermentación de Azucars.	44

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-1:	Horizontes del suelo.....	5
Ilustración 2-1:	Caracterización morfológica de las bacterias.....	15
Ilustración 1-2:	Ubicación de muestreo – Cumandá.	17
Ilustración 2-2:	Localización de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.....	18
Ilustración 3-2:	Zona amarilla área de muestreo.	19
Ilustración 4-2:	Aislamiento mediante siembra por estrías.	26

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR MRS.
- ANEXO B:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO MRS.
- ANEXO C:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR ACETOBACTER GLUCOSA.
- ANEXO D:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR SABORAU DEXTROSA.
- ANEXO E:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR POTATO DEXTROSA.
- ANEXO F:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO POTATO DEXTROSA BROTH.
- ANEXO G:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO YPD.
- ANEXO H:** ESTADISTICA DESCRIPTIVA pH DEL SUELO BOSQUE PRIMARIO.
- ANEXO I:** ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE HUMEDAD DEL SUELO DEL BOSQUE PRIMARIO.
- ANEXO J:** ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE CENIZAS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.
- ANEXO K:** ESTADISTICA DESCRIPTIVA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.
- ANEXO L:** ESTADISTICA DESCRIPTIVA NITROGENO DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.
- ANEXO M:** ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE NITRATOS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.
- ANEXO N:** ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE POTASIO DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.
- ANEXO O:** ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE MAGNESIO DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.
- ANEXO P:** LUGAR Y REALIZACIÓN DEL MUESTREO.
- ANEXO Q:** PESAJE DE LAS MUESTRAS Y ESTERILIZACIÓN.
- ANEXO R:** SIEMBRA LOS MICROORGANISMOS EN LOS AGARES ESPECÍFICOS.
- ANEXO S:** SELECCIÓN DE CEPAS MÁS TINCIÓN GRAM.
- ANEXO T:** RESULTADOS DE TINCIÓN GRAM DE MRS.
- ANEXO U:** PRUEBA DE TINCIÓN DE GRAM SABOURAUD.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue caracterizar microorganismo para uso agroindustrial aislados de un bosque primario en el cantón Cumandá y analizar sus propiedades físico – químicas identificando los microorganismos mediante pruebas bioquímicas y el análisis físico químico del suelo. Se realizó un muestreo mediante la ayuda del barreno posteriormente se desarrolló una solución madre para realizar diluciones y después sembrar los microorganismo en agar MRS, *Acetobacter* glucosa y Sabouraud que fueron incubadas por 48 horas a 37, 27 y 30 ° C. Posteriormente se efectuó un aislamiento para la identificación de los microorganismos con respecto a su morfología (color, superficie, forma y tinción de gram); después se realizaron las pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa tanto para bacterias lácticas y acéticas, e hidróxido de potasio para BAL; pruebas de caracterización como la fermentación de carbohidratos y caldo YPD para levaduras, donde se obtuvo cuatro especies de bacterias ácido lácticas, dos especies de bacterias acéticas y levaduras, dando como resultado las bacterias lácticas positivas para tinción y negativo para oxidasa, catalasa y KOH; en cuanto a las bacterias acéticas dieron negativo para tinción y oxidasa pero positivo para catalasa. Para los análisis físicos – químicos se realizó de acuerdo con la normativa establecida para cada mineral. Se concluyó que las especies aisladas pueden pertenecer al género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Acetobacter* y *Saccharomyces*. Se recomienda emplear otras pruebas bioquímicas como las API 50 CHL, o en un PCR en tiempo real para una mejor identificación de cada uno de los microorganismos aislados.

Palabras clave: <BACTERIAS LÁCTICAS>, <BACTERIAS ACÉTICAS>, <LEVADURAS>, <BOSQUE PRIMARIO>, <CONTENIDO DE MINERALES>, <PRUEBAS BIOQUÍMICAS>.



0664-DBRA-UPT-2023

ABSTRACT

This study aimed to characterize microorganisms for agroindustrial use isolated from a primary forest in the Cumandá canton and to analyze their physical-chemical properties. Biochemical tests and physical-chemical analysis of the soil identified the microorganisms. Sampling was carried out with the help of an auger. Then a stock solution was developed to make dilutions to seed the microorganisms in MRS, Acetobacter glucose, and Sabouraud agars, which were incubated for 48 hours at 37, 27, and 30° C. Subsequently, isolation was carried out to identify the microorganisms concerning their morphology (color, surface, shape, and gram staining). Biochemical tests such as catalase and oxidase for lactic and acetic acid bacteria and potassium hydroxide for LAB were then performed. Characterization tests such as carbohydrate fermentation and YPD broth for yeasts were also performed. Four species of lactic acid bacteria, two species of acetic acid bacteria, and yeasts were obtained, resulting in lactic acid bacteria positive for staining and negative for oxidase, catalase, and KOH; acetic acid bacteria were harmful to staining and oxidase but positive for catalase. The physical-chemical analyses were carried out according to the regulations established for each mineral. It was concluded that the species isolated might belong to the genus Lactobacillus, Lactococcus, Bifidobacterium, Acetobacter, and Saccharomyces. It is recommended to employ other biochemical tests such as API 50 CHL or real-time PCR for better identification of each of the isolated microorganisms.

Keywords: <LACTIC BACTERIA>, <ACETIC BACTERIA>, <LEVADURES>, <PRIMARY FOREST>, <MINERAL CONTENT>, <BIOCHEMICAL TESTS>.

0664-DBRA-UPT-202



Dra. Gloria Isabel Escudero Orozco MsC.

0602698904

INTRODUCCIÓN

Ecuador posee bosques primarios que son de gran importancia debido a la diversidad biológica de numerosas especies, bacterias, levaduras, hongos, etc., son altamente diversos y heterogéneos ubicados en gran parte en la Amazonía del Ecuador, por lo general estas zonas no han sido intervenidos por el hombre, motivo por el cual existen microorganismos que pueden ser estudiados y ser utilizados con fines benéficos en el campo agroindustrial, farmacéutico y biotecnológico (Palacio y Jaramillo, 2001: pp. 46-48)

De acuerdo con (García, 2021, pp.2-3) la cantidad y calidad de materia orgánica presente en el suelo sirven de fuente principal para el crecimiento y desarrollo de microorganismos, estos a su vez juegan un papel importante en las propiedades biológicas, químicas y físicas del suelo. Entre los principales parámetros del suelo se encuentran el tipo de nutrientes, humedad, temperatura, aireación, etc., que son importantes para la supervivencia y proliferación de poblaciones microbianas (Márquez et al., 2008. p.93).

De acuerdo con (Vierra–Arroyo, 2020, pp. 67-68), las tecnologías microbianas han sido aplicadas en varios problemas en la agricultura y el medio ambiente, así como en procesos agroindustriales tales como es el caso del *Rhizobacterium*, *Tricoderma* y *Beauveria* usados en la agricultura; de igual forma del género *Lactobacillus*, *Streptococos* utilizados para la producción de derivados lácteos, o, del género *Acetobacter* para la producción de vinagre, así como la aplicación de levaduras como las *Sacharomyces Cerevisiae* utilizados para la elaboración de pan, cerveza, vino; y los *Pleurotus*, *Basidiomycetes* que forma ayudan en la elaboración de nuevos subproductos alimenticios y sirven como descomponedores de la materia orgánica generada por desperdicios de alimentos evitando desechos contaminantes (Velasco et al., 2020: pp.333-345).

El presente trabajo de investigación consiste en identificar microorganismos para uso agroindustrial aislados de un bosque primario en el cantón Cumandá, para el cual se realizará pruebas bioquímicas con el que se establecerá las características metabólicas de los microorganismos y obtener un prototipo benéfico.

Por lo anteriormente mencionado se plantearon los siguientes objetivos.

Caracterizar microorganismos para uso agroindustrial aislados de un bosque primario en el cantón Cumandá.

Analizar la composición físico químico (acidez, pH, materia orgánica y cenizas) del suelo donde se aislarán los microorganismos.

Determinar las características metabólicas de los microorganismos de uso agroindustrial, mediante pruebas bioquímicas.

Identificar in vitro el microbiota de importancia agroindustrial aislada del bosque en estudio.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Bosque Primario.

De acuerdo con la (FAO, 2020, pp.15-16) define a los bosques primarios como bosques regenerados de forma natural que están compuestos por especies nativas y no han sido intervenidos por la actividad humana, estos bosques poseen un valor irremplazable en su biodiversidad, su almacenamiento de carbono y ecosistemas, que han sido incluidos en valores patrimoniales y culturales, en la actualidad se registran grandes extensiones de estos bosques en regiones tropicales y boreales.

Por lo general los bosques primarios son biológicamente más diversos que otros paisajes terrestres y contribuyen significativamente al funcionamiento del ecosistema, especialmente abarca distintas formas de vida como especies, plantas, microorganismos, etc. (Bosques primarios, 2023, pp.2-3). Los bosques primarios conservan la biodiversidad, esto debido a su contenido de flora y fauna, cabe mencionar que de igual forma cuenta con mucha disponibilidad de materia orgánica e inorgánica que es fuente principal fuente de alimento y energía para los microorganismos como bacterias, hongos o levaduras (Quirós, 2002, pp. 12-14).

1.1.1. Características de los Bosques Primarios.

Los bosques primarios presentan grandes extensiones de ecosistemas forestales que tiene gran importancia vital para el planeta y sus habitantes, se estima que el 80 % del total de los bosques han sido destruidos o alterados, estos poseen diferentes funciones como la conservación de la biodiversidad, sumideros de carbono, y ayudan a la preservación de hábitats, flora y fauna (Guía natural, 2011, p.1).

De acuerdo con (Amaguaya, 2015, pp. 8-39) en el suelo se encuentran microorganismos, humus, y en forma condensada carbono orgánico, el cual funciona como fuente energética principal para los microorganismos, estos microorganismos actúan como vinculo para la descomposición de materia orgánica y propician la reintroducción de compuestos inorgánicos lo cual produce biomasa microbiana que sirve como alimento a microorganismo detritívoros (Amaguaya, 2015; citados de Ordoñez, 1999).

1.2. Muestreo

La planificación de muestreo de suelo es un proceso de gestión previa al campo que contiene información relacionada con cada una de las actividades que conforman el muestreo, y define los criterios para la toma de muestras, de acuerdo con los objetivos de este; estos objetivos determinan la técnica, el patrón de muestreo, los equipos a utilizar y el tipo de custodia (Mendoza y Espinoza, 2017: pp.13-14).

1.2.1. Tipos de muestreos del suelo

De acuerdo (Mendoza y Espinoza, 2017: pp.13-14) el muestreo del suelo es la actividad de recolección de muestras que nos permiten caracterizar el suelo en estudio, es definida como una parte representativa que nos permite demostrar las características que presenta el suelo que se está analizando.

Una muestra simple es obtenida mediante una sola extracción del suelo, que por lo general son usadas en trabajos de investigación, extensión, y en suelos muy homogéneos; sin embargo, una muestra compuesta hace referencia a muestras obtenidas por varias extracciones que son reunidas en recipientes previamente codificados por profundidad donde se extrae un Kg de suelo, lo cual es recomendable obtener entre 6 a 12 submuestras por unidad de muestreo (Mendoza y Espinoza, 2017: pp.13-14).

1.3. Suelo.

Sánchez (2022, p.11) señala que el suelo es un sitio donde habitan toda clase de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) los cuales son capaces de producir metabolitos de interés, de acuerdo con el conteo en placas se estima un aproximado de 10⁸ a 10¹⁰ unidades de bacterias por gramo de suelo.

Patiño (2018, pp.1-10) el suelo contiene una mega diversidad de microorganismos especialmente en la rizosfera y consecuentemente los genes para la degradación o transformación de compuestos orgánicos sobre el planeta, lo cual representa un ambiente adecuado para el descubrimiento para nuevas especies microbianas que pueden presentarse como una alternativa para para la industria biotecnológica.

1.3.1. Horizontes de un suelo.

De acuerdo con García (2009, p.12) las capas donde está ubicado el material del suelo se lo llama horizonte y la superposición constituye el perfil de los suelos.

(Mengual, 2013. p.28; citado en Duchi, 2022) el horizonte A es el más superficial ya que se encuentra en la superficie de la tierra, y el horizonte C es más profundo ya que se encuentra alrededor de 30 cm de profundidad de la tierra.

El horizonte A presenta una mayor cantidad de materia orgánica con una coloración gris oscuro, de estructura migajosa y granular, situada a 0 - 20 cm de profundidad; generalmente en un gramo de suelo se aproxima que existen 2500 millones de bacterias, más medio millón de hongos, y una estimación de protozoos (Henry y Heinke, 1999: p.10).

Con respecto a (Moncayo, 2000, p.14), la capa u horizonte B tiene una profundidad del suelo que está entre los 20 a 40 cm, donde existen microorganismos como bacterias aeróbicas, bacterias anaeróbicas y Actinomycetes, entre otros, lo que significa que la microbiota benéfica también se encuentra en la capa B.

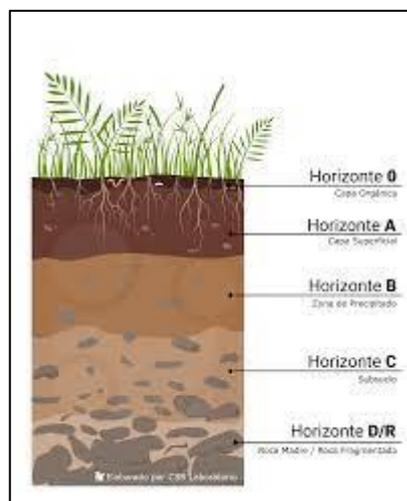


Ilustración 1-1: Horizontes del suelo.

Fuente: (Soil Horizont, 2022)

1.3.2. Composición del suelo.

Aguilera (2000, pp.77-78) señala que la mayoría de la materia orgánica del suelo es constituyente esencial de un sistema edáfico ya que debido a su constitución y propiedades es responsable de los procesos físico – químicos y biológicos del suelo.

Según (Aguilera, 2000, pp.77-78) manifiesta que los importantes hongos y bacterias solubilizadoras, al igual que una fuente de fósforo, nitrógeno y azufre, además, las interacciones micorrizas permite al ecosistema aumentar la eficiencia de la captación de algunos de los nutrientes.

1.3.3. Propiedades físicos- químicos del suelo.

1.3.3.1. Relación del suelo pH.

El pH es una propiedad química que se encarga de medir el grado de acidez o alcalinidad de las soluciones acuosas, en el suelo es de mucha importancia ya que nos indica que tan ácida o alcalina es la solución del suelo, que es de donde las raíces y los microorganismos del suelo toman sus nutrientes (Osorio, 2012, pp.1-4).

Los suelos vírgenes tienden a tener valores de pH 3 - 5 en que demuestra que existe una toxicidad moderada por el aluminio y manganeso, también, existe una deficiencia de fosforo, azufre y molibdeno presentando un alto nivel de algunos micronutrientes (Bava, 1997, p.27).

De acuerdo con (Azcarate et al., 2008: p.45) manifiestan que los nutrientes influyen en el crecimiento microbiano ya que proporciona la energía para el desarrollo de estos; las bacterias crecen fácilmente en medios ácidos (pH 4-5 o menores), las levaduras (4.5 - 6.0 pH), los hongos filamentosos (3.0 - 4.0 pH) y para los actinomicetos (5.0 a 7.0 pH), en el caso que el pH se vea alterado los microorganismos disminuirán su capacidad de crecimiento.

Sánchez (2005, pp.775-779) señala que las propiedades físico - químicas que presentan los suelos están acorde al contenido de materia orgánica y el pH del suelo, la biomasa microbiana es mejor y estable, lo cual se traduce en una mayor actividad biológica en los microorganismos.

Tabla 1-1: Propiedades físicos-químicos del suelo.

MATERIA ORGÁNICA%	REACCIÓN	pH	REACCIÓN
< 0,9	Muy bajo	< 5	Fuertemente ácido
1,0 – 1,9	Bajo	5,1 – 6,5	Moderadamente ácido
2,0 – 2,5	Normal	6,6 – 7,3	Neutro
2,6 – 3,5	Alto	7,4 – 8,5	Moderadamente alcalino
> 3,6	Muy alto	Mayor de 8,5	Fuertemente alcalino (suelos sódicos)

Fuente: (Agrolab, 2005 pág. 31).

1.3.3.2. Materia orgánica del suelo.

De acuerdo con (Docampo, 2010, pp.81-89) la materia orgánica (MO) desempeñan un papel importante en la calidad del suelo, ya que su calidad y cantidad intervienen directa e indirectamente sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, pero es solo una fracción de su cantidad total, solo un pequeño porcentaje.

Según (Medina et al., 2022: pp.14-16) la materia orgánica está conformada por compuestos como carbohidratos, lignina y proteínas, y, los microorganismos descomponen la materia orgánica en dióxido de carbono y los residuos más elásticos en humus. En el proceso de descomposición los microorganismos suelen combinarse con el nitrógeno presente en el suelo (Geissman, 1973, pp.2-3).

Según la investigación de (Doris y Placencia et al., 2012: pp.6-8) señala que la cantidad de materia orgánica del suelo dependerá de la vegetación, clima, textura del suelo, drenaje del mismo y de su laboreo, los suelos minerales que tienen el mayor contenido de materia orgánica son provenientes de suelos de praderas vírgenes; los suelos de bosques primarios que tengan climas cálidos tendrán una menor cantidad de materia orgánica.

De acuerdo con (Azcarate, 2008, p.45) el desarrollo de los microorganismos se da de acuerdo la presencia de nitrógeno, pues para la descomposición de 30 g de celulosa se aplica 1 g de nitrógeno, esto permite comprender la importancia de la relación entre el carbono y nitrógeno en los aportes orgánicos donde degradan moléculas complejas de materia orgánica formando humus.

Según (Patiño, 2018, pp.1-10) manifiesta que los suelos de bosques primarios presentan un rango de materia orgánica $> 3,6$ y un pH menor a 5, lo cual dentro de las propiedades físico-químicas del suelo la materia orgánica tiene una reacción desde muy bajo ($< 0,9$) hasta muy alto ($> 3,6$) y un pH con una reacción fuertemente ácida (< 5) a un fuertemente alcalino ($> 8,5$), lo cual permite la supervivencia de algunas bacterias y la eliminación de otras bacterias como indica en su investigación (Hernández, 2016, p.12-16).

(Amaguaya, 2015, pp.33-39) en su investigación sobre las propiedades físico química del suelo de bosque nativo del cantón Alausí, reportó el 52,72 % de humedad, siendo de un factor muy importante el agua para el crecimiento y desarrollo de microorganismos, además obtuvo un pH de 5.71, y un 22.20% de materia orgánica.

1.3.3.3. Nitrógeno.

De acuerdo con (Burbano, 2015, p.13) las plantas, los animales y la mayoría de los microorganismos solo utilizan nitrógeno combinado, es decir, nitrógeno integrado en un compuesto químico, dependientes de formas inorgánicas de aquel elemento, como nitratos, amonio, etc.

1.4. Microorganismos.

Arias et al., (2005: p.15) definen como seres de tamaño microscópico, con una organización biológica sin diferenciación de tejidos u órganos, entre estos se encuentran bacterias, hongos, protozoos y virus, capaces de sobrevivir en ambientes como el suelo, el agua, el aire, la comida etc.

De acuerdo a Arias (2005, p.15) menciona que los microorganismos son seres primitivos y numerosos que habitan en el planeta tierra, que han colonizado todo tipo ambiente, e interactúan continuamente en todos los ecosistemas, además, son necesarios para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el sustento de la vida, puesto que participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos esenciales para la industria tanto farmacéutica, alimenticia, médica, entre otras, así, como para resolver problemas ecológicos y de contaminación ambiental, lo que significa que, parte de la actividad biológica esencial (Cerra et al., 2013: pp. 23-25).

Algunos microorganismos ocasionaron enfermedades devastadoras para la humanidad, como la peste negra (1346 - 1361), se conoce que solo el 1 % de las especies conocidas pueden causar daño al ser humano, plantas o animales; ya que la mayoría de los microorganismos han desempeñado funciones importantes dentro de la biotecnología, o épocas antiguas como para la elaboración de vino o el pan, o en procesos fermentativos (Thieman y Palladino, 2010: pp.3-4).

1.4.1. La diversidad microbiana del suelo.

Según (García, 2011, pp.3-4) indica que los microorganismos presentes en el suelo utilizan la materia orgánica o mineral como su principal fuente de energía y nutrientes, se clasifican en: aerobios, anaerobios, facultativos (crecen con o sin presencia de oxígeno), acidófilos, neutrófilos, basófilos, heterótrofos y autótrofos, de igual manera si sobreviven a temperaturas entre los 15° a 40 ° C se los denomina como mesófilos, y a los que crecen a temperaturas menores a 15° C se los denomina psicrófilos y temperaturas mayores a 40 ° C son termófilos.

De acuerdo con (Wassenaar, 2015, p.47) el suelo ideal para el crecimiento de microorganismos es aquel que contiene una estructura con buena circulación de aire y agua, la mayor concentración de microorganismos se la encuentra en la rizosfera.

(Benavides y Hermida, 2008, pp.22-23) en su estudio menciona que los microorganismos del suelo representan la mayor proporción de uso a nivel industrial, la comunidad edáfica dependerá del conjunto de nutrientes del ecosistema, pero pueden ser considerados como el principal agente transformador en el movimiento de los nutrientes a través del suelo y como una fuente productora de compuestos para las plantas durante sus ciclos de renovación, ya que contiene el más alto número de grupos microbianos, células bacterianas por gramo de suelo, pero existen una gran problemática, ya que no es la cantidad de microorganismos sino la sensibilidad de una fracción de grupos bacterianos muy alterable al cambio de condiciones ambientales, pudiendo estas dejar de producir metabolitos y enzimas (Duxbury et al., 1989: pp.33-67).

Según (León et al., 2020: pp.10-11) en su estudio realizado indica que los efectos de los microorganismos que están en el suelo son muy amplios que van desde la fijación del nitrógeno hasta la descomposición de la materia orgánica, además, de la producción y mejoramiento de la disponibilidad de nitratos, fosfatos, sulfatos y metales esenciales.

Generalmente el carbono es un factor limitante para el crecimiento microbiano en el suelo, aunque también depende del nitrógeno y fósforo, probablemente distintas sustancias sean limitantes en los suelos y que dichos factores puedan variar todo el tiempo, esto influirá en las actividades bacterianas que presente el suelo (Delgado, 2019, p.23).

1.4.2. Crecimiento de los microorganismos.

Según (Tortora et al., 2017 citado en Duchi, 2022) señala que el crecimiento de los microorganismos es el aumento en cantidad constituyente y estructural de las células, cuando presenta crecimiento en ausencia de división celular aumentará el tamaño y peso de la célula, mientras, que cuando el crecimiento es continuo de división celular aumentará el número de células; si el crecimiento de una población es el aumento del número de células será consecuencia de un crecimiento individual y previa división.

(Gómez et al., 2015, pp. 49-59) menciona que la velocidad de crecimiento exponencial se expresa como tiempo de generación y este se define como el tiempo que tarda una población en duplicarse, los tiempos de generación varían ampliamente entre los microorganismos, algunos crecen

rápidamente y presentan tiempos de generación de unos 30 minutos y otros tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días.

Patiño (2018, pp. 1-10) indica que el crecimiento de una población ocurre de una manera exponencial; la velocidad de crecimiento exponencial está expresado como tiempo de generación lo cual se define como el tiempo que se demora una población en duplicarse, estos tiempos dependerán específicamente de los microorganismos, algunos crecerán rápidamente y presentarán tiempos de generación entre 30 minutos y otros variarán en horas o incluso días (Tortora et al., 2017 citado en Duchi, 2022).

1.4.3. Bacterias presentes en el suelo.

Moreno y Velarde (2016: p.77) indica en su estudio que los suelos secundarios del bosque de montaña y subtropical de la Provincia de Chimborazo existe presencia de microorganismos benéficos descubiertos con facilidad debido a la formación de micelios blancos que son bacterias gram positivas, del género *Lactobacillus* y son bacilos esporulados, además, de mohos y levaduras.

De acuerdo con (Grant, 1989, p.23), menciona que las poblaciones microbianas de gran mayoría de los suelos están compuestas por bacterias gram positivas, donde se puede encontrar un aproximado del 70 % en los aislamientos microbianos del suelo donde se clasifican en bacterias gram positivas del género *Arthrobacter sp*, la mayoría de la microflora restante son del género *Bacillus sp*, y *Micrococcus sp* y otros géneros encontrados son considerados nativos los cuales son del género *Acinetobacter sp*, *Agrobacterium sp.*, *Alcaligenes sp.* *Nocardia sp.*

Benavides (2008, p.6), indica que existe un alto porcentaje de bacterias Gram positivas lo cual mediante el uso de pruebas bioquímicas y medios de cultivos selectivos se identificaron entre 40 cepas bacterianas correspondientes a los siguientes géneros: *Amphibacillus*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Caryophanon*, *Kurthia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Sacharococcus*, *Sarciana*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus* y *Trichococcus* en la cual los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus* fueron los géneros más predominantes de su investigación.

1.4.4. Bacterias ácido lácticas.

Según (Ramírez et al., 2011: pp.1-3) las bacterias ácido - lácticas (BAL) pertenecen a un grupo de microorganismos representadas por distintos géneros con características morfológicas,

fisiológicas y metabólicas en común, las BAL por lo general son cocos o bacilos gram positivos, no esporulados, anaeróbicos, no móviles, microaerofílicos o aerotolerantes con oxidasa y catalasa negativas, carecen de citocromos, como el único o principal producto es la fermentación de carbohidratos, además, las BAL son ácido tolerantes capaces de crecer en pH bajos como 3.2 hasta un pH máximo de 5.5 y a temperaturas entre 20 - 45 ° C (Ramírez et al., 2011: pp.1-3).

De acuerdo con (Murillo y Pullupaxi, 2019: pp.40-41), la identificación de bacterias ácido - lácticas en placas incubadas con agar MRS, forman colonias de color blanco cremoso, con un tamaño aproximado de 1 a 2 mm, forma redonda, puntiformes, superficie convexa, de consistencia húmeda o lisa, cocos, diplococos (hileras pareadas), en forma cúbica y también pueden presentar formas alargadas como bacilos o bastones.

Según (Castillo,2012, p.71) los define como bacilos microaerófilos, gram positivos y catalasa negativa, estos organismos forman ácido láctico, pertenecientes al género *Lactobacillus*, se dividen en dos grupos como Homofermentativas es el mayor y convierte casi completamente la azúcar fermentada en ácido láctico y del grupo Heterofermentativas que producen cantidades importantes de otros productos de fermentación, incluyendo bióxido de carbono, etanol y ácido acético. Con respecto a su temperatura pueden ser tanto mesófilos como termófilos capaces de crecer entre 2 ° C y 53 ° C, aunque su temperatura óptima es de 30 - 40 ° C; su pH ideal oscila entre 5,5 y 6,2 (Castillo, 2012, p.71).

(Toalombo, 2012, pp.56-67) reportó en su investigación realizada en un bosque Secundario en la Provincia de Tungurahua en el cantón Tisaleo, la identificación de bacterias ácido-lácticas como el *Lactobacillus plantarum* de igual forma pudo identificar levaduras del género *Sacharomyces cerevisiae*.

Según (Carmen et al., 2011: p.7), manifiesta la presencia de bacterias ácido - lácticas en un suelo de bosque nativo de Colombia en la cual se pudo identificar *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *E. faecium*, género *Bacillus* con potencial biofertilizante al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana. Por otra parte (Maza, 2004, p.33), indica que según la morfología de las bacterias aisladas del suelo en medios de cultivos selectivos se identificaron las bacterias del género *Lactococcus spp* y *Enterococcus spp*.

1.4.4.1. *Bacillus*.

(Ordóñez, 1998, p.63) afirma que este género presenta *Bacillus* Gram positivos esporoformadores, que poseen gran adaptabilidad y se disponen en pares o cadenas, además, de una gran

adaptabilidad y bacterias enzimáticas que pueden ser aislados en diversos hábitats con respecto al calor, pH y salinidad.

(Ordóñez, 1998, p.63) menciona que tienen catalasa positiva y pueden crecer en medios sintéticos que contengan azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, como únicas fuentes de carbono, además, producen una enzima hidrolítica que degrada polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos.

(Calvo y Zúñiga, 2010, pp.31-39) manifiestan que el 100% de las cepas de *Bacillus* aisladas crecieron de una forma óptima a un pH entre 4 - 5.5, lo que indica una buena adaptación del crecimiento en suelos de pH ácidos, en cuanto a la materia orgánica los *Bacillus* pueden crecer en un rango medio de 3 - 5,9 %.

1.4.5. Bacterias acéticas

Según (Gerard, 2016, p.2) define que son microorganismos que pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*, Gram negativos de forma elipsoidal o cilíndrica que suelen encontrarse aislados, en parejas o formando cadenas; con un tamaño que oscila entre 0,4 a 1 µm de ancho y de 0,8 a 4,5 µm de longitud, son móviles por flagelación polar, presentan actividad catalasa positiva, oxidasa negativa y no forman endosporas, además, tienen un metabolismo aeróbico estricto.

(Joyeux et al., 1984: pp.153-156) mencionan que la temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25 - 30 ° C, aunque también pueden desarrollarse a temperaturas más altas (38 – 40 ° C) y otras, a temperaturas más bajas (10 ° C). Su pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6; sin embargo, la mayoría de las cepas pueden crecer a pH inferiores a 5 pero la tolerancia a los bajos pH depende de otros parámetros, como la concentración de etanol y la disponibilidad de oxígeno (Gullo et al., 2006: pp.106-209).

1.4.6. Levaduras.

Pérez y Mendoza (2019: pp.11-12) mencionan que la levadura es un nombre genérico que agrupa a una diversidad de organismos unicelulares, que incluyen especies patógenas tanto para las plantas y animales, así como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad; las levaduras han sido utilizadas, desde la antigüedad, en la elaboración de cervezas, pan y vino.

Morfológicamente suelen ser esféricos, alargados, tienen tendencia a depositarse en el fondo del líquido o flotar en la cual la mayoría de las levaduras tienen un ciclo de reproducción asexual por

gemación, las colonias tienen un ancho de 2,50 – 10,00 mm y de largo 4,50 – 21,00 mm, una de las levaduras más conocidas es la especie (*Saccharomyces cerevisiae*), esta levadura tiene la facultad de crecer en forma anaerobia realizando la fermentación alcohólica como lo afirma (Machín et al., 2016: pp.20-29).

1.4.6.1. Las levaduras presentes en el suelo.

Quintana (2017, p.37) menciona que en el suelo de los bosques investigados se desarrollan levaduras del *Phylum Basidiomycota*, las especies de levaduras con mayor frecuencia de ocurrencia fueron *Cryptococcus phenolicus*, *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* y *Saccharomyces Cerevisiae*, estas especies junto a *Cryptococcus aerius* y *Cryptococcus terricolus* se consideran en estos bosques mientras que las especies *Rhodotorula fujisanensis*, *Rhodotorula colostri*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* y *Cystofilobasidium capitatum*, también, indica que se identificaron seis posibles especies nuevas, tres incluidas en el género *Cryptococcus* (*Basidiomycota*) y tres incluidas en el género *Candida* (*Ascomycota*).

(Moreno y Velarde, 2016: p.77), en un estudio realizado en los bosques de una montaña subtropical en la Provincia de Chimborazo lograron observar la morfología de algunas levaduras y hongos miceliales demostrando así la presencia de este tipo de hongos y levaduras en las muestras analizadas, los mismos que son encargados de degradar proteínas complejas y carbohidratos, que producen sustancias bioactivas que estimulan el crecimiento y actividad de otras especies.

1.4.6.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*.

Según (Quispe, 2010, p.27) manifiesta que las levaduras sintetizan tanto sustancias antimicrobiales, como compuestos útiles para el crecimiento de las plantas, partiendo de aminoácidos y azúcares, así como de materia orgánica, los elementos producidos por las levaduras promueven la división activa de células, siendo también, sustratos útiles para las bacterias ácido lácticas y los actinomicetos.

(Duchi, 2022: citado en Guamán, 2015) nos menciona sobre la evaluación de la eficiencia de microorganismos nativos, donde señala que las levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae*, cumple la función de degradar proteínas complejas y carbohidratos y que puede crecer a un pH entre 3 – 6, lo que pueden resistir a pH ácidos. Por lo que (Toalombo, 2012, pp.56-67) realizó un estudio en un bosque secundario de la provincia de Tungurahua lo cual pudo identificar levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*.

1.4.7. Aislamiento microbiano.

Las técnicas de aislamiento microbiano permiten obtener microorganismos provenientes de muestras complejas (suelo, alimentos, agua, etc.) donde existe una gran diversidad microbiana, los cultivos puros están conformados por un solo tipo de microorganismos, esto es indispensable para conocer las características morfológicas, tinciones, patogenidad y la sensibilidad a antibióticos. Para esto es muy importante tener en cuenta las condiciones de incubación óptimas para su desarrollo (Aquiahual y Pérez, 2004. p. 37).

1.4.8. Técnicas de aislamiento

De acuerdo con (Sanz, 2011, p.30) existen diferentes métodos de siembra como siembra por estría y en superficie, generalmente se aplica sobre un medio sólido que contiene la placa Petri, que tiene como objetivo obtener por medio de un número elevado de microorganismos a un número reducido de colonias denominado cultivos puros.

1.4.8.1. Método de siembra por estría en placa.

(Olivas y Alarcón, 2011, p.12) es un método cualitativo de aislamiento que consiste en una técnica de siembra mediante estría que nos permite aislar bacterias que dan lugar a colonias separadas, es decir un cultivo en un medio nuevo, así permite desarrollar un cultivo bacteriano puros.

1.4.8.2. Método de siembra en superficie o siembra en placa.

(Volke & Lilia, 2012, p.12) menciona que esta técnica permite sembrar 0.1 mL de inóculo donde es homogenizado con el asa de Digralsky obteniendo un conteo de microorganismo viables, esto nos quiere decir que los microorganismos crecerán en la superficie del agar.

1.4.9. Métodos de identificación.

De acuerdo con (Cercenado y Cantón, 2010, pp.3-6) la identificación bacteriana se realiza mediante métodos convencionales que se basan en las características fenotípicas, esto debido a que su desarrollo y costo es accesible; los métodos tradicionales que se basan en las características que se visualizan en las bacterias como su morfología, propiedades bioquímicas y metabólicas.

1.4.9.1. Tinción de Gram y morfología.

De acuerdo con (Rodríguez y Arenas, 2018, p. 166-167) la tinción de gram diferencia a dos grupos de bacterias, las gram positivas que tienden a una coloración de azul violeta y las bacterias gram negativas las que se decoloran y después se tiñen con safranina; de igual forma las gram positivas poseen una pared gruesa compuesta por peptidoglicanos lo cual la hacen impermeable resistente a la decoloración, a comparación de las gram negativas que poseen una capa delgada de peptidoglicano más una capa de lipoproteínas que deshacen la decoloración.

La tinción de las células corresponde a una herramienta usada en el área de la microbiología; corresponde a una de las tinciones más conocidas en la microbiología desarrollada en 1884 por Hans Christian Gram, que tiene como fin diferenciar a dos grupos de bacterias, permitiendo clasificarlas como gram positivas y gram negativas, esto dependerá del colorante cristal violeta usado en la tinción que se lo utiliza ampliamente en los laboratorios de microbiología (Bonilla et al., 2016. p.38).

Tamaño Grande = mayor 1mm de diametro Medio = 1mm Pequeño = menos 1mm						
Forma						
Elevación						
Margen (borde de la colonia)						
Color Blanco, Negro, Crema, Naranja, etc.						
Apariencia de la superficie	Brillante Opaco	Suave Rugosa	Granular Cremosa			
Densidad (capacidad de ver a través de la colonia)	Opaca	Transparente	Translúcida			
Consistencia (observable al tomar una colonia con asa)	Cremosa	Viscosa	Friable	Membranosa		

Ilustración 2-1: Caracterización morfológica de las bacterias.

Fuente: (Martínez y Steven, 2019, p. 24)

1.4.9.2. Movilidad

Por lo general las bacterias poseen pared celular y entre uno o varios flagelos que utilizan para moverse en el medio que se encuentran, los flagelos les ayudan a moverse a distintos lugares del medio con el fin de desarrollarse y tengan mejores condiciones o adquieran alimento (Pino, 2012; citados en Duchi, 2022, p.13).

1.4.10. Pruebas bioquímicas.

De acuerdo con (Cercenado y Cantón, 2010, pp.3-6) las pruebas bioquímicas nos permiten determinar las características metabólicas que presentan las bacterias, existen técnicas rápidas que evalúan la presencia de una enzima y su reconocimiento puede variar entre segundos hasta horas, sin embargo, otras pruebas requieren una incubación entre 18 a 48 horas para el crecimiento del microorganismo.

1.4.10.1. Prueba de catalasa.

La catalasa es una enzima que está presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos, estas bacterias sintetizan catalasa e hidrolizan el agua oxigenada en agua y oxígeno liberando burbujas (Cercenado y Cantón, 2010, pp.3-6).

1.4.10.2. Prueba de oxidasa.

De acuerdo con (Cercenado y Cantón, 2010, pp.3-6) menciona que esta prueba permite determinar la presencia de enzimas oxidasas, esta reacción de oxidasa se debe a la presencia de un sistema de citocromo - oxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular produciendo agua o peróxido de hidrógeno dependiendo de la especie.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Población de estudio.

El presente trabajo de investigación forma parte de un proyecto de investigación de la Facultad de Ciencias Pecuarias referente al estudio de microorganismos del suelo primario de la provincia de Chimborazo, que tiene como objetivo dar a conocer a los docentes, técnicos y estudiantes de la Carrera de Ingeniería Agroindustrial.

Se tomó muestras de suelo del bosque primario clasificados como bosques verde montanos, ubicado en la provincia de Chimborazo del cantón Cumandá ubicado a una altitud de 300 a 1900 msnm.

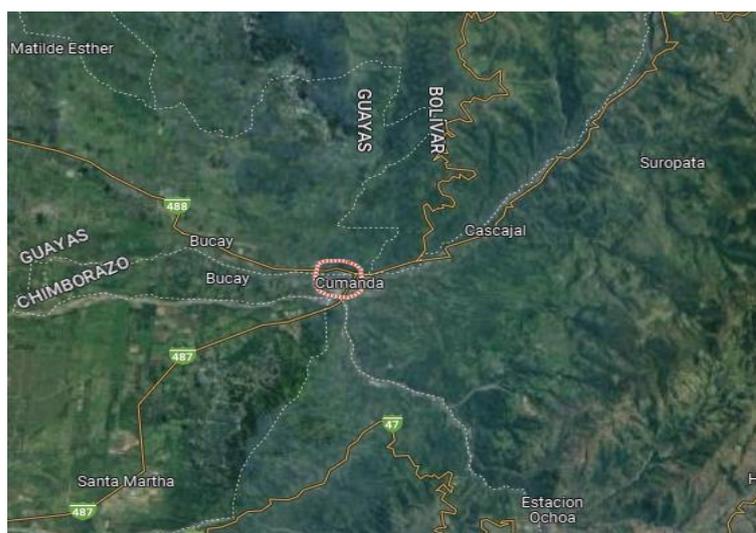


Ilustración 1-2: Ubicación de muestreo – Cumandá.

Fuente: Google maps citado por Delgado, S, 2023

2.2. Tamaño de muestra.

Se recolectó muestras del suelo del bosque nativo del cantón Cumandá en distintas áreas, se tomó 2500 g de muestra la misma que fue empacada en fundas ziploc previamente codificada, las cuales fueron transportadas en condiciones de refrigeración.

ubicado con las coordenadas $2^{\circ}12'00''\text{S}$ $79^{\circ}08'00''\text{O}$ y una altitud de 300 hasta 1900 msnm aproximadamente.

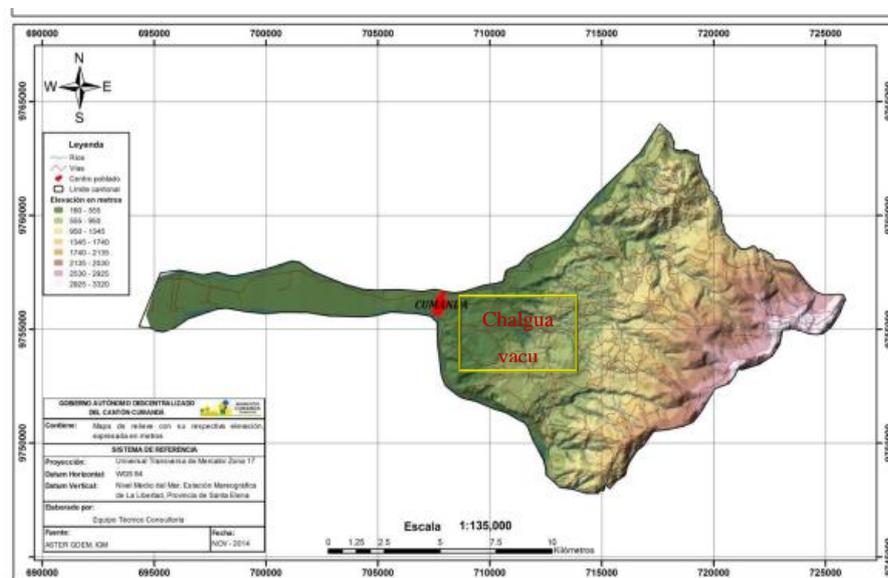


Ilustración 3-2: Zona amarilla área de muestreo.

Fuente:(Cumandá, 2019, p.25)

2.6. Unidades experimentales.

Para este estudio se utilizó 500 g de suelo y se aplicó 5 repeticiones con un total de 2500 g de unidades experimentales.

2.7. Materiales, equipos e instalaciones

2.7.1. Materiales.

- Barreno
- GPS
- Fundas ziploc
- Cooler
- Cámara fotográfica
- Gradillas
- Tubos de ensayo
- Pipetas, micropipetas (10 ml; 5 ml)
- Asa de siembra

- Frascos termorresistentes
- Mecheros
- Buretas
- Erlenmeyer
- Probetas (10 ml; 100 ml)
- Pinzas
- Piseta
- Cajas Petri vidrio
- Pera de succión
- Papel industrial
- Papel aluminio
- Botellas de plástico
- Tanque de gas
- Guantes, cofia y mandil
- Materiales de oficina

2.7.2. Insumos de laboratorio

- Agua destilada
- Alcohol (96 %)
- Agar MRS
- Agar PDA
- Agar Sabouraud
- Agar Acetobacter
- Medio Sim
- Caldo MRS
- Caldo PDA
- Caldo Acetobacter
- Azúcares para fermentación (lactosa, glucosa, maltosa, manitol y fructosa)
- Glicerol
- Ácido bórico
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio
- Rojo fenol
- Lugol

- Rojo fenol
- Safranina
- Alcohol cetona
- Yodo
- Aceite de inmersión
- Amonio cuaternario.

2.7.3. Equipos

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Balanza electrónica
- Vórtex
- Microscopio
- Baño maría
- Espectrofotómetro
- Computador
- Cámara fotográfica

2.7.4. Instalaciones

Laboratorios de: Ciencias Biológicas, y de Bromatología y Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.8. Mediciones experimentales.

Se analizaron las siguientes mediciones experimentales:

2.9. Características análisis físico - químicas del suelo

- pH
- Humedad %
- Cenizas
- Materia orgánica %
- Nitrógeno %

- Potasio (mg/L)
- Magnesio (mg/L)
- Nitratos (mg/L)

2.10. Aislamiento, purificación e identificación de microorganismos de uso Agroindustrial del suelo

2.10.1. Bacterias ácido - lácticas

- *Lactobacillus*
- *Enterococcus*

2.10.2. Bacterias acéticas

- *Acetobacter spp*

2.10.3. Levaduras

- *Saccharomyces spp*

2.11. Técnicas estadísticas

Estadística descriptiva: media, y desviación estándar

2.12. Metodología de la evaluación

En la presente investigación se utilizará el siguiente procedimiento:

2.13. Método de muestreo en campo.

Se realizó el siguiente procedimiento de acuerdo con (Guía de muestreo, 2022, pp. 1-8):

Con una pala o azadón previamente limpio, se procedió a cavar varios hoyos en el suelo de aproximadamente 25 x 25 cm y 30 cm de profundidad, posteriormente se realizó la desinfección del instrumental utilizado para asegurar que las muestras no se contaminaran, luego se tomaron las muestras de suelo y se envasaron en fundas ziploc previamente codificadas y se colocaron en un cooler para transportarlas a los laboratorios; tanto, para las pruebas físicas y químicas se utilizó

250 g las cuales fueron pasadas por un tamiz para obtener una estructura uniforme, posterior se mezclaron las muestras con agua destilada (90 ml) en 5 Erlenmeyer codificados, se realizaron pruebas bioquímicas de acuerdo con las forma, color, estructura y consistencia de colonias.

2.14. Fase de laboratorio.

2.14.1. Método de preparar las muestras en laboratorio para el aislamiento.

El procedimiento de preparación de las diluciones de las muestras obtenidas se lo realizó de acuerdo con (Bou et al., 2011: pp.601-608) el cual, se detalla a continuación:

Se prepararan tubos de ensayo de acuerdo con las repeticiones, que contenían 90 ml de agua esterilizada y se pesaron 10 g de cada muestra, posteriormente, se realizaron diluciones de las muestras hasta llegar a la dilución 10^{-5} , teniendo en cuenta que la primera dilución de 10^{-1} contiene 10 g de muestra original (muestra madre); se homogenizó la muestra por 60 segundos utilizando la misma técnica hasta llegar a una dilución de 10^{-5} , luego se tomó 1 ml de la dilución 10^{-5} y se procedió a sembrar en las cajas Petri con los medios de cultivo preparados, aplicando la técnica de siembra con asa, con las cajas Petri previamente codificadas, se procede a hacer un estriado, luego se colocaron en la incubadora a 27° C por un lapso de tiempo de 48 a 72 horas.

2.14.2. Siembra de Bacterias Ácido - lácticas (Medio de Cultivo MRS).

Luego de obtener la dilución de 1×10^{-5} , se realizó el procedimiento de (Vargas, 2018, p.28), detallado a continuación:

Se tomaron 7 g de agar MRS y se disolvieron en 100 ml de agua destilada, puesto que utilizaron 5 muestras por duplicado, cada placa Petri contiene 10 ml, se debe tener en cuenta que el agua debe tener un pH entre 4.8 a 5.2.

$$\text{Agar MRS (g)} = \frac{70 \text{ g} \times 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 7 \text{ g de Agar MRS}$$

Preparado el agar MRS, junto a las placas Petri, pipetas, micropipetas, etc., se llevó a la autoclave (120° C por 15 min). Se realizó la siembra en la cámara de flujo laminar previamente esterilizada, en cada tubo de ensayo se introduce 1 ml de concentración 1×10^{-5} que se obtuvo a partir de la muestra madre, para después dispersar la solución en cada caja Petri, pasado las 24 y 48 horas se debe observar para verificar el crecimiento de colonias (Vargas, 2018, p.28).

2.14.3. Siembra de levaduras (Medio de Cultivo Sabouraud).

El procedimiento se lo tomo de acuerdo con (Galindo, 2016 citado por Vargas, 2018) donde Para después de obtener la concentración de 1×10^{-5} en los tubos de ensayo se emplea 6.5 g de agar Sabouraud disueltos en 100 ml de agua destilada previamente homogenizado, después de haber preparado el agar, las cajas Petri, micropipetas, tubos de ensayo se colocaron en la autoclave (120°C por 15 min), posteriormente se debe desinfectar correctamente la cámara de flujo laminar para luego proceder a sembrar con la muestra de concentración 1×10^{-5} a partir de la muestra madre, en cada caja Petri se dispersó la solución (1 ml), finalmente, se incubó a una temperatura de 30°C por 48 horas.

2.14.4. Siembra de bacterias fermentativas

A continuación, se describe el siguiente procedimiento de acuerdo con (Vargas, 2018, p.28):

Se utilizó 3.8 gramos de agar Acetobacter para proceder a disolver en 100 ml de agua destilada, posteriormente, se procedió a autoclavar las cajas Petri, puntas, pipetas, etc., (120°C por 15 min), se procedió a desinfectar la cámara de flujo laminar, luego se realizó las siembras con las muestras de concentración 1×10^{-5} a partir de la muestra madre, donde se colocó 1 ml del tubo de ensayo de concentración y se dispersó la solución por toda la caja Petri. Finalmente se incubó a 30°C durante 72 horas.

2.14.5. Recuento en placa a las 48 horas.

Con respecto a (Arana et al., 2022: pp.2-3) se procedió a contar las placas que presenten 30 a 300 colonias, con la ayuda de una cuenta colonias, donde se observará la morfología de cada colonia bacteriana de acuerdo con su forma, tamaño, borde, consistencia, color. Se utilizó la siguiente fórmula para realizar el conteo en placas:

Fórmulas para conteo de UFC

$$\text{No. Colonias UFC} = (\text{CA} + \text{CM} + \text{CB} / 3) * 65$$

Donde:

- **CA** = carga alto
- **CM** = carga medio

- **CB** = carga bajo
- **UFC/ml o UFC/g** = No. de colonias por placa * el factor de dilución / ml de la muestra sembrada.

2.14.6. Identificación macroscópica de microorganismos de uso agroindustrial.

Para el siguiente procedimiento se lo realizo de acuerdo con (Cerda y Pérez, 2020):

Después de obtener los resultados, se procedió a analizar las cantidades de colonias presentes en las cajas Petri, luego de 48 horas de ser incubadas a una temperatura de 30 ° C, luego en él cuenta colonias se observó las características morfológicas como tamaño, forma, color y apariencia, además, se deberá tener en cuenta el olor; posteriormente se efectuó una evaluación macroscópica de las colonias donde se hace una comparación con colonias de microorganismos consultados bibliográficamente teniendo en cuenta la diferencia entre bacterias ácido-lácticas, levaduras y bacterias fermentativas como las de la familia *Saccharomyces*, *Lactobacillus* y *Acetobacter*.

2.14.7. Identificación microscópica de Bacterias Ácido Láctica.

(Otero, 2011, p. 26) describe el siguiente procedimiento detallado a continuación:

Previamente se procede a desinfectar y esterilizar el lugar y los materiales que se van a utilizar. Se procedió a colocar una gota de agua destilada en un portaobjetos, con la ayuda del asa de siembra se esteriliza al rojo vivo en el mechero y se frota en la muestra, se realizó la técnica de tinción de Gram y posteriormente se adicionó una gota de aceite de inmersión para observar en el microscopio con el lente de 100X.

2.14.8. Identificación microscópica de levaduras.

Según (Reynoso et al., 2006, p.75) describe el siguiente procedimiento:

Se realizó la limpieza y desinfección de los materiales que utilizarán, posteriormente, se adiciona una gota de agua destilada en el portaobjetos para flamearla con la ayuda de un mechero, después se realizó un frotis en el portaobjetos. Se realizó la tinción con azul de metileno, luego se agregó una gota de aceite de inmersión, para observar con el lente de 100 X del microscopio.

2.14.9. Identificación microscópica de Bacteria fermentativas.

De acuerdo con (Hernández, 2016, p.76) detalla el siguiente procedimiento:

Para realizar este procedimiento se procederá a esterilizar y desinfectar todos los materiales a emplear, en este análisis se adicionó una gota de agua destilada al portaobjetos y con la ayuda de un asa de siembra previamente flameada se tomó una muestra para realizar un frotis en el portaobjetos, después, se fijó la muestra y se aplicó una tinción Gram, luego se añadió aceite de inmersión y finalmente se procede a observar con el lente de 100X en el microscopio.

2.14.10. Aislamiento de Bacterias Ácido - Lácticas

El procedimiento se lo realizó de acuerdo con (Verdezoto, 2017, p.28):

En este caso se toma la colonia de dilución (1×10^{-5}) y con la ayuda del asa de siembra se flamea por el mechero a rojo vivo y se toma una colonia de la caja Petri, para posterior sembrar en la nueva placa mediante un estriado a 90° sin levantar el asa; de igual manera se realiza un segundo estriado sin tocar el primer estriado, luego se procedió a envolver las placas con Parafilm para colocarlos en una ambiente anaerobiosis por 48 horas a 37°C . Después de un lapso de 48 hora con la ayuda del cuenta colonias se procede a observar si existe presencia de colonias secundarias de acuerdo con sus características morfológicas, posteriormente se realiza una nueva siembra con las colonias descubiertas en las cajas Petri, y se procederá a realizar nuevamente la siembra y se esperará 48 horas para presenciar si hubo o no crecimiento; este procedimiento se realizó hasta observar homogeneidad en las colonias de acuerdo a sus características morfológicas, una vez obtenido homogeneidad se habrá obtenido un cultivo puro.

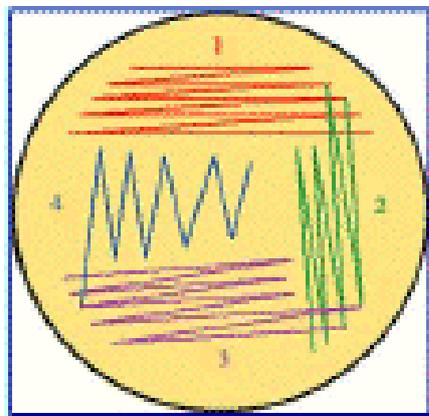


Ilustración 4-2: Aislamiento mediante siembra por estrías.

Fuente: (Ordoñez, 2013)

2.14.11. Aislamiento de levaduras.

Procedimiento:

Se lo realizó de acuerdo con (Achigar, 2017, p.46) que se detalla a continuación:

Para este procedimiento se utilizó agar Sabouraud; se procedió a auto clavar todos los materiales que se van a utilizar, se tomaron en cuenta las colonias que resistieron a una concentración de alcohol del 5 %, para realizar la siembra en nuevas cajas Petri la concentración del 1×10^{-5} , con el asa de siembra flameada al rojo vivo en el mechero; se tomó una colonia de la muestra y se procedió a realizar la siembra en una nueva caja Petri por estriado a 90° sin levantar el asa de siembra y evitando tomar contacto con el segundo estriado. Después se incubó las cajas Petri a una temperatura de 25°C por 48 horas, transcurrido el tiempo se verificó si existió crecimiento de colonias en las cajas, con la ayuda de la cuenta colonias se determinó las características de cada colonia si existen diferentes especies. De igual manera se realizó nuevas siembras en la placa esperando 48 horas hasta ver crecimiento, una vez que se obtengan colonias que presenten las mismas características morfológicas y homogeneidad se habrá obtenido un cultivo puro.

2.14.12. Aislamiento de bacterias fermentativas

De acuerdo con (Fernández, 2014, p.62) determina el siguiente procedimiento:

En este caso se realizó un mejor aislamiento de las colonias que resistieron concentraciones del 8% de alcohol, se sembró en las cajas Petri con agar Acetobacter provenientes de la de concentración 1×10^{-5} , con el asa de siembra flameada al rojo vivo se procedió a tomar una colonia de la muestra y se siembra en una nueva placa Petri mediante un estriado, después del primer estriado se realizó otro estriado a 90° sin levantar el asa de siembra evitando tocar el primer estriado, de igual forma el segundo estriado, posteriormente se incubó por 48 horas a una temperatura de 25°C en condiciones aerobias. Pasado las 48 horas se verificó si existe crecimiento de colonias secundarias, mediante él cuenta colonias se identifica si existen nuevas especies diferentes a la placa para posteriormente realizar una nueva siembra por estriado, técnica aplicada anteriormente. Posterior a la siembra se verificará de igual forma si existe crecimiento de nuevas colonias, mediante él cuenta colonias se identificará en base a las características y homogeneidad que presenten las bacterias se habrá obtenido un cultivo puro.

2.14.13. Identificación bioquímica de los microorganismos.

2.14.13.1. Prueba de catalasa.

El procedimiento se determinó en base a (Jaimes y Zulay 2011, p.52), se realizó un frotis en un portaobjetos completamente limpio después se añadió 1 a 2 gotas de agua oxigenada al 3 %, donde se pudo observar la presencia o ausencia de efervescencia evidenciando la presencia de catalasa, las bacterias ácido - lácticas tienen catalasa negativa.

2.14.13.2. Prueba de oxidasa.

Se tomó una colonia con el asa de inoculación y se depositó en una tira de oxidasa, cuando la cepa es oxidasa positiva existe un viraje del color blanco de la tira a morado, si no presenta esta coloración se reportará como oxidasa negativa (Jiménez y Vélez, 2012: pp.557-573).

2.14.13.3. Prueba de tinción de Gram

Para el procedimiento se lo realizó con respecto a (Toro, 2005, pp.14-17) detallado a continuación:

Se procedió a colocar una gota en el portaobjetos limpio, con la ayuda del asa de siembra previamente flameada en el mechero se procede a tomar una muestra de las colonias y se extiende por el portaobjetos, se procede a fijar la muestra con el fuego; procedemos a colocar 1 gota de cristal violeta por un minuto y se procede a lavar con agua destilada, luego colocamos 1 gota de lugol por un minuto y nuevamente se lava con agua destilada; colocamos alcohol cetona por 30 segundos y lavamos, finalmente se coloca una gota de safranina por un minuto y procedemos a lavar, dejamos reposar la muestra hasta que esté totalmente seca; colocamos una gota de aceite de inmersión y procedemos a tomar lectura en el microscopio.

2.14.13.4. Prueba KOH.

Según (Latorre, 2011, p. 26) indica que es una prueba de confirmación de la tinción de gram, se procede a raspar una colonia de la caja Petri y se frota en un portaobjetos, luego se le añadió KOH al 3 % y visualiza la aparición de mucoide.

2.14.13.5. Prueba de movilidad

Con la ayuda de una aguja se tomó una muestra del cultivo sólido, se procedió a sembrar en línea recta tratando dos tercios de profundidad del medio de cultivo, luego se incubó por 24 horas a 37 ° C en condiciones anaeróbicas (Reynoso, 2011, p.28).

2.14.13.6. Prueba de fermentación de azúcares

Se formuló caldo rojo fenol que se utiliza de base para evidenciar la fermentación del carbohidrato glucosa, ya que posee el indicador rojo fenol (Vargas, 2018, pp.30-38).

Formulación de caldo rojo fenol

Los ingredientes se detallan siguiente cuadro el caldo rojo fenol y un pH final de 7.4, que se ajustó con NaOH 2N (Vargas, 2018, pp.30-38).

Tabla 1-2: Ingredientes el caldo rojo fenol.

Ingredientes	Cantidad
Peptona	12 g
NaCl	5 g
Extracto de carne	1 g
Rojo fenol	0,018 g
Agua destilada	10 ml
Glucosa	10 g

Fuente: (Moreno, 2017, p. 34).

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

Procedimiento:

Se procede a colocar 10 ml de rojo fenol en un tubo de ensayo estéril con la abertura hacia abajo, procedemos a auto - clavar los tubos de ensayo (121 ° C * 15 minutos), evitando que el carbohidrato sufra una reacción de Maillard; posteriormente con la ayuda de una asa de inoculación se toma una cepa aislada y se inoculara en el caldo por 37 ° C; si presenta fermentación obtendrá una coloración amarilla y si existe presencia de gas en el interior de los tubos Durham será positiva (Vargas, 2018, p.30).

2.14.13.7. Prueba de fermentación de azúcares en bacterias acéticas y levaduras.

(Dickinson, 2015, pp. 1-4 citado en Duchi, 2022, p.27), la prueba de fermentación de azúcares en levaduras y bacterias acéticas se utilizará AGAR TSI, lo cual contiene tres azúcares para detectar la fermentación de carbohidratos, y sulfato ferroso para la detección de producción de ácido sulfhídrico.

Tabla 2-2: Ingredientes del TSI Agar

Digerido péptico de tejido animal	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Digerido pancreático de caseína	10,0 g
Dextrosa	10,0 g
Sacarosa	1,0 g
Tiosulfato sódico	0,2 g
Sulfato ferroso de amonio	0,2 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar	13,0 g

Fuente: (Duchi, 2022, p. 42)

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

De acuerdo con (Dickinson, 2015, pp.5-7) se realizó el siguiente procedimiento:

Utilizar las normas de higiene adecuadamente, para este análisis, se debe tocar con mucha cautela sólo el centro de una colonia aislada en un medio en placa entérico con una aguja estéril fría, luego se inserta en el medio de la base del tubo para extender en ambas direcciones por la superficie del agar, se incuba con las tapas flojas a 35 ° C por 24 horas donde se detecta la fermentación de carbohidrato, producción de gas o ácido sulfúrico (Dickinson, 2015, pp. 1-4).

2.14.13.8. Prueba bioquímica caldo YPD.

(Condalab, 2019, p.18) menciona que después del aislamiento se procede a enriquecer las muestras aisladas en agua peptonada por 24 o 48 horas, después se preparará el caldo YPD añadiendo azúcares que fermentan la familia de las levaduras *Saccharomyces*, la fórmula del caldo YPD se detalla a continuación:

Tabla 3-2: Fórmula del caldo YPD.

Ingredientes	Cantidad
Dextrosa	20 g
Peptona	20 g
(Cloranfenicol)*	0.5 g
Extracto de Levadura	10 g

Fuente: (Condalab, 2019, p. 18)

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

Procedimiento:

Se utilizó dextrosa para preparar el caldo, después, se coloca en tubos de ensayo, posteriormente, se agrega 1 ml de la muestra enriquecida, luego se introduce los tubos con el caldo YPD estéril de color naranja; después de las 24 o 48 horas presenta una coloración amarillo el caldo esto significa que existe fermentación que da un resultado positivo si el tubo con el caldo YPD no cambia de color, pero si se mantiene anaranjado quiere decir que da negativo a fermentación (Condalab, 2019, p.18).

2.14.13.9. Conservación de especies aisladas.

Procedimiento:

Se realizó el cultivo overnight a 33 ° C en el caldo MRS de las colonias aisladas, se mezcló volúmenes iguales y glicerol al 30 %, previamente esterilizada (120 ° C y atmósfera de presión), posteriormente se colocaron bacterias ácido-lácticas, bacterias acéticas y levaduras sobre el glicerol y se procedió a mezclar constantemente hasta lograr una mezcla homogénea (Vargas, 2018: p.32)

2.15. Pruebas físico - químicas del suelo.

2.15.1. Medida del pH en las muestras del suelo.

Para el proceso de medición de pH se realizó de acuerdo con la (NTE INEN-ISO 10390, 2014, p.6) donde se procedió a medir con un potenciómetro donde se tomó una muestra de 5 ml colocando un vaso de precipitación, posteriormente el potenciómetro se introduce en el vaso con la muestra y se toma lectura del pH, cabe mencionar que el potenciómetro debe estar bien calibrado para evitar errores de lectura, en esta investigación pasó 30 días para poder observar el cambio hasta el proceso de fermentación.

2.15.2. Medición de la cantidad de la materia seca en las muestras del suelo.

El siguiente procedimiento está basado en la (NTE INEN-ISO 11461, 2014, pp.1-12):

Se realizó un tamizado de la muestra fresca (suelo), se pesó 5 gramos en los crisoles previamente tarados en una balanza analítica. Después se colocó en una mufla a 500 ° C por 6 horas luego se retiró y se llevó a un desecador para que se enfríe (30 minutos) y así tomar lectura de los resultados; con los resultados obtenidos se realiza una calcinación por 5 horas hasta que la muestra se calcine por completo. La humedad será la diferencia entre el peso del suelo fresco, es decir, los 5 gramos menos el peso del crisol con la muestra calcinada luego de las 5 horas en calcinación.

$$\% \text{ SS} = \frac{(M2-m)}{(M1-m)} * 100$$

Donde:

- **SS** = sustancia seca en porcentaje en masa.
- **m** = masa de la cápsula en g
- **M1** = masa de la cápsula con la muestra en g
- **M2** = masa de la cápsula con la muestra después del calentamiento en g

$$\% \text{ HUMEDAD} = 100 - \% \text{ SS}$$

2.15.3. Medición de la cantidad de cenizas en las muestras de suelo.

El procedimiento se lo realizó de acuerdo con (NTE 544, 1980, pp.1-5):

Se tomó crisoles con la muestra del resultado del procedimiento anterior (humedad); luego se procedió a calcinar las muestras y se procedió a colocar los crisoles en la mufla automática a 500 ° C por 4 horas. Después de este periodo de tiempo, se extrae los crisoles de la mufla cuidadosamente con pinzas para colocar en el desecador por 30 minutos, finalmente, se procedió a la lectura de datos.

Para la determinación del porcentaje de cenizas se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ C} = \frac{(CC-w)}{(CS-w)} * 100$$

Donde:

% C = Contenido de cenizas en porcentaje de masa.

w = Masa de la cápsula vacía en g.

CC = Masa de la cápsula con la muestra después de la incineración en g

CS = Masa de la cápsula con muestra antes de la incineración en g.

2.15.4. Medición de la cantidad de materia orgánica en las muestras del suelo.

Procedimiento:

Para la determinación de materia orgánica se tamizó las muestras de suelo fresco, luego se pesó 5 gramos y se llevó a calcar las muestras en los crisoles durante 5 horas; luego se calcinó las muestras en crisoles de porcelana aproximadamente 5 horas, posteriormente se llevó a la mufla por 5 horas, transcurrido el tiempo se retiró cuidadosamente con las pinzas para colocar en un desecador y se toma los datos (Andrades et al., 2015: p.73).

$$\% \text{ materia orgánica} = \frac{(M1-M2)}{(M1-M0)} * 100$$

Donde:

- **M₀** = Peso del crisol (g).
- **M₁** = Peso del crisol y la muestra seca (g).
- **M₂** = Peso del crisol y la muestra después su incineración (g).

2.15.5. Medición de la cantidad de nitrógeno en las muestras del suelo

El siguiente procedimiento se lo realizó de acuerdo con (Andrades et al., 2015: p.75):

Se empleó el método Kjeldahl, se procedió a pesar 9 gramos de sulfato de sodio y 1 gramo sulfato de cobre, se mezcla y se lo coloca en el balón de digestión. Después se procede a pesar 2 gramos de muestra de suelo fresco y se lo coloca en el balón de digestión, se adiciona 25 mL de H₂SO₄ y se procede a digerir hasta obtener un color verde esmeralda, luego de haber obtenido ese color se deja reposar el balón y se le adicionan 200 ml de agua, 100 ml de NaOH y los catalizadores (granallas de zinc); luego en un matraz Erlenmeyer se coloca 100 mL de H₃BO₃ (ácido bórico) al 25% donde se receptorá el líquido destilado.

Finalmente se procede a realizar la titulación con HCl, y adicionando el indicador mixto (4 gotas) se procede a titular y a tomar los valores.

$$\%N = \frac{(T-B) \times 14,007 \times N}{W(\text{mg})} \times 100$$

Donde:

T = ml del HCL en valoración de la muestra

B = ml del HCL en valoración del blanco

N = Normalidad del valor

W = peso de la muestra mg.

2.15.6. Medición de la cantidad de minerales (Magnesio) en las muestras de suelo

Procedimiento:

Se procedió a tomar 5 gramos de muestra de suelo fresco y se mezcló con 15 mL de agua destilada en un matraz, luego se filtró con el papel filtro en el matraz, pasado el tiempo del filtrado por completo se procede a llevar al espectrofotómetro; se colocó en la celda del espectrofotómetro de 10 mL y se le va a adicionar el reactivo de lectura del mineral, en este caso el reactivo de magnesio en polvo; luego se colocó la celda dentro del espectrofotómetro y se procedió a encender el equipo después se tomó lectura, la lectura se presentará en mg/L es decir miligramos por litros de potasio en la muestra (HANNA INSTRUMENTS, 2021, p.53).

2.15.7. Medición de la cantidad de minerales Nitratos en las muestras de suelo.

Procedimiento:

Se procedió a tomar 5 gramos de suelo fresco y se mezcló con 15 mL de agua destilada en un matraz, después se procedió a filtrar en papel filtro, una vez filtrado se lo llevó a un espectrofotómetro de 10 mL y a este se le va a adicionar el reactivo del mineral en este caso el reactivo de nitrato en polvo; se coloca la celda dentro del espectrofotómetro y se procede a encender para tomar lectura, la cantidad estará expresada en forma de mg/L es decir miligramos por litros de potasio en la muestra (HANNA INSTRUMENTS, 2021, p.53).

2.15.8. Medición de la cantidad de potasio en las muestras de suelo.

Procedimiento:

Se procedió a tomar 5 gramos de muestra fresca de suelo homogenizado, se mezcló con 15 mL de agua destilada en un matraz, luego se procedió a agitar y continuamente se filtró en la ayuda de embudos hasta filtrar completamente, una vez obtenido el filtrado se procede a llevar al espectrofotómetro en una celda de 10 mL, se le adiciona el reactivo del mineral para este caso potasio en polvo, se encendió el equipo y se tomó la cantidad expresada en mg/L es decir miligramos por litros de potasio en la muestra (HANNA INSTRUMENTS, 2021, p.53).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis físicos químicos del suelo.

Composición físico químico del suelo del bosque primario del Cantón Cumandá.

Tabla 1-3: Estadística descriptiva del suelo del bosque primario del cantón Cumandá.

	Media	Desviación estándar
pH	6,55	±0,59
Materia Orgánica	48,62	±11,32
Humedad %	42,10	±8,19
Cenizas %	50,75	±23,70
Nitrógeno %	0,22	±0,07
Nitrato (mg/L)	10,19	±5,11
Potasio (mg/L)	7,84	±3,89
Magnesio (mg/L)	9,20	±6,41

Fuente: (Duchi, 2022, p.61)

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

3.1.1. pH del suelo del bosque primario.

Según lo registrado en cuanto al pH del suelo de bosque nativo del cantón Cumandá se obtuvo un valor de $6,55 \pm 0,59$ registrándose variaciones de 5 a 7,11 como se puede evidenciar en la tabla 1-3, considerándose una concentración neutra según indica la (FAO y MAG, 2013, p.23) lo cual manifiesta que valores de (6.6 - 7.2) son neutros, resultados que coinciden, con lo indicado por (Patiño, 2018, p.40), en su investigación realizada en un suelo de bosque nativo en Lluçud, lo cual indica que adquirió un valor de 6.65, lo cual concuerda con los resultados conseguidos en la presente investigación.

3.1.2. Materia orgánica del suelo del bosque primario.

La tabla 1-3 revela que la cantidad de materia orgánica encontrado en el suelo de bosque nativo tiene un valor de $48,62 \pm 11,32$ con un rango máximo y mínimo de 27,51 a 66,07, considerándose muy alta según lo indicado por la (FAO y MAG, 2013, p.23), y (Duchi, 2022, p.63) donde manifiestan que valores superiores a 3 % son altos en MO, mientras que en otra investigación realizada por

(Agrolab, 2005) afirma que el contenido de materia orgánica en suelos de bosques se encuentran en un rango de 0,9 a 3,6 % por lo tanto se puede verificar que en suelos con mayor contenido de materia orgánica son normalmente los suelos de bosques primarios.

3.1.3. Humedad del suelo de bosque primario.

De acuerdo a los análisis físico químicos del suelo de bosque primario del cantón Cumandá tiene un porcentaje de humedad de $42,10 \pm 8,19$ variando únicamente de 33,72 a 57,27, como lo indica la tabla 1-3, determinando que los valores obtenidos son mayores por los obtenidos por (Duchi, 2022, p.54) en su estudio realizada en un suelo de bosque Primario en la Parroquia Pungalá, lo cual identifico una humedad de 9.30 %, esto responde a que el suelo de bosque primario de Pungalá es arenoso a diferencia del suelo de Cumandá que es más arcilloso.

3.1.4. Ceniza del suelo de bosque primario.

Con los estudios realizados se verifico que la cantidad de cenizas del suelo de bosque primario de Cumandá en estudio tiene un porcentaje de $50,75 \pm 23,70$, variando entre de 8,74 a 82,97, como lo pueden apreciar en la tabla 1-3. Lo cual los resultados obtenidos son inferiores a los conseguidos por (Duchi, 2022, p.63), en un bosque nativo de Pungalá que obtuvo una cantidad de cenizas de 90,82 %, posiblemente el bajo contenido de cenizas se deba por cantidad de materia orgánica en concentraciones superiores o en el contenido de minerales en bajas cantidades.

3.1.5. Nitrógeno asimilable del suelo del bosque primario.

Con los datos obtenidos se logró verificar que la cantidad de nitrógeno del suelo de bosque primario del cantón Cumandá posee un valor de $0,22 \pm 0,07$ registrándose variaciones de 0,13 a 0,37, como podemos apreciar en la tabla 1-3, que se considera una concentración media; de acuerdo con lo manifestado por (FAO y MAG, 2013, p.19) y (Duchi, 2022, p.63) que considera que valores 0,15 al 0,25 %, son rangos medios.

Resultados iguales a los conseguidos por (Rivadeneira, 2015, p.33) lo cual menciona que en su estudio en un suelo nativo del cantón Cayambe obtuvo un valor medio de 0.17 %, sin embargo, en otro estudio realizado por (Aguilar et al., 1987: p.15), en un bosque de Primario, menciona que los suelos vírgenes presentan valores entre 0,10 al 0,30 %, concordando con los resultados obtenidos en el presente estudio.

3.1.6. Cantidad de potasio (K), de las muestras de suelo de bosque primario.

Con la investigación realizada se evidenció que el valor potasio expresada en miligramos por litro del suelo de bosque primario tiene un valor de $7,84 \pm 3,89$ registrándose variaciones de 3,8 a 17,3, como lo revela la tabla 1-3, valores que son similares al estudio de (Mamani, 2014, p.31) , en un bosque primario en Chile, que obtuvo un valor de potasio de 7,93 mg/L considerando una concentración baja en potasio según lo expuesto por (Agrolab, 2005) que menciona que valores por debajo de 150 ppm son considerado suelos bajos en potasio.

3.1.7. Cantidad de magnesio (Mg), de las muestras de suelo de bosque primario.

Con el estudio obtenido, se pudo evidenciar que el valor de magnesio igualmente expresado Mg/L en del suelo de bosque primario del cantón Cumandá tiene un valor de $9,20 \pm 6,41$, como se puede evidenciar en la tabla 1-3, resultados que concuerdan con el estudio realizado por (Espín, 2019, p.24), en un suelo de Páramos cruz verde y Guasca CUNDINAMARCA, lo cual obtuvo un valor de magnesio de 10 mg/L, considerado valores bajos en magnesio ya que según (Agrolab Análisis Técnicos, 2017) afirma que rangos menores a 200 ppm son bajos en magnesio.

3.1.8. Cantidad de nitratos de las muestras de suelo de bosque primario.

De acuerdo con la tabla 1-3, los datos obtenidos sobre la cantidad de nitratos del suelo de bosque primario del cantón Cumandá posee un valor de $10,19 \text{ mg/L} \pm 5,11$ variando de 3,8 a 20, valores que son diferentes con la investigación realizada por (Sepúlveda, 2017, p.69), que manifiesta que en su investigación de un bosque primario obtuvo un rango de nitratos de 4.68 mg/L, lo cual se considera un resultado inferior con la investigación del presente estudio, esto responde a la concentración de cenizas en bajos rangos.

3.2. Bacterias Ácido - Lácticas.

3.2.1. Aislamiento de las Bacterias Ácido - Lácticas.

Después de la observación morfológica se lograron identificar 4 especies de bacterias ácido lácticas, de esta manera hacemos una comparación de nuestras colonias con la morfología que tiene una colonia de BAL, presentando características propias como es el color, tamaño, forma, etc., que servirán para una identificación morfológica adecuada con las especies ya identificadas (Castillo, 2022, p.43).

Tabla 2-3: Identificación morfológica de las BAL aisladas del bosque primario del cantón Cumandá.

#Especie	Superficie	Forma	Color
1	Cóncava	Irregular	Crema
2	Liza	Circular	Crema
3	Convexa	Irregular	Crema
4	Liza	Irregular	Crema

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

Se realizó la identificación Morfológica observando su forma, color, superficie, como lo indica en la Tabla 2-3, esto es un paso fundamental para el aislamiento de colonias bacterianas, en la especie 1 se obtuvo una forma irregular, de color crema y superficie cóncava, la colonia 2 posee una forma circular, color crema, y superficie liza, mientras que la colonia 3 y 4 tienen semejanza en su forma y color y se diferencia únicamente en la superficie que son convexa, liza por lo que concuerdan con los resultados realizados por (Hernández, 2011, p.8), y (Allauca, 2023, p. 65) en su investigación sobre aislamiento de cepas bacterianas en el medio sólido MRS, en la que se menciona que, para identificar morfológicamente una bacteria ácido láctica debe tener un tamaño promedio de 1 a 5 mm, forma puntiforme, circular, regular, con superficie lizo, convexa, y cóncava y color blanco o crema.

3.3. Caracterización de los microorganismos para uso agroindustrial.

3.3.1. Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas de Bacterias ácido lácticas.

En la identificación bioquímica realizada en el Laboratorio de Ciencias biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias se obtuvieron los siguientes resultados como se describe en la tabla 7-3 (Duchi, 2022, p.53).

Tabla 3-3: Pruebas bioquímicas en BAL Catalasa, Oxidasa e Hidróxido de Potasio.

#ESPECIE	K(OH)	TINCIÓN	OXIDASA	CATALASA
1	-	+	-	-
2	-	+	-	-
3	-	+	-	-
4	-	+	-	-

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

A partir del análisis morfológico se aislaron 4 especies de Bacterias ácido lácticas, sometiéndose a pruebas bioquímicas básicas llegando a la conclusión que todas las especies aisladas son bacterias ácido - lácticas, ya que todas las especies resultaron negativas para oxidasa, catalasa e hidróxido de potasio y positivos para tinción gram. Resultados similares a los descritos por (Martínez y Steven, 2019: p.28) citado por (Almeida, 2017, p.28) en su investigación sobre aislamiento de microorganismos, mencionando que para ser considerada como BAL, debe ser oxidasa y catalasa negativa y positivo a tinción gram, también se realizó la prueba del hidróxido de potasio, dando una reacción negativa a todas las especies aisladas, concordando con el criterio de (Duchi, 2022, p.53), (Latorre, 2011, p.28) y (Almeida, 2017, p.28) , que manifiesta que para ser considerado bacteria ácido láctico debe ser negativo a hidróxido de potasio.

3.3.2. Prueba de movilidad.

Todas las especies de BAL dieron negativo a la prueba de movilidad concordando con los resultados expuestos por (Morales, 2011, p.19) que menciona, que para ser considerado como BAL no debe haber la existencia de este tipo de reacción.

3.3.3. Prueba de fermentación de azúcares.

La prueba de fermentación de azúcares permite identificar la especie del BAL que existe en el suelo de bosque primario del cantón Cumandá la cual pasaron las pruebas anteriores de oxidasa, catalasa y movilidad. Lo cual se obtuvieron resultados como se puede apreciar en la tabla 3-3.

Tabla 4-3: Resultados de la prueba de fermentación de azúcares en BAL.

ESPECIE	FRUCTOSA	LACTOSA	MANITOL	MALTOSA	GLUCOSA	SIM
<i>P. pentosaceus</i>	+	-	+	+	+	-
<i>L. mesenteroides</i>	+	-	-	-	+	-
<i>L. brevis</i>	+	+	-	+	+	-
<i>L. plantarum</i>	+	+	+	+	+	-

Fuente (Duchi, 2022, p.53).

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

Con los estudios realizados en la prueba de fermentación de carbohidratos; la especie numero 1 dio como resultados positivos a fructosa, maltosa, manitol, glucosa y negativo a lactosa, concordando con los resultados obtenidos por (Rodríguez, 2020, p.70) , (Ahmad et al., 2018: p.3) en su investigación sobre capacidad de crecimiento, actividad antimicrobiana y susceptibilidad a antimicrobianos por lo que probablemente corresponda a *Pediococcus pentosaceus*, la especie 2 dio positivo a los sustratos, glucosa, fructosa y negativo a lactosa, maltosa y manitol, lo cual

probablemente pueda corresponder al género de *Leuconostoc mesenteroides*; concordando con los resultados realizados por (Duchi, 2022, p.53), (Castillo, 2012, p.71) y (Coman et al., 2019: p.1252) en su estudio sobre aislamiento e identificación de *lactobacillus spp. (lactobacillaceae)* resistentes en suelos; la especie 3 negativo a manitol y positivo a glucosa, fructosa, lactosa y maltosa, probablemente este tipo de especie pueda pertenecer a *Lactobacillus brevis*; siendo también resultados similares a los reportados por (García, 2007, p.70) y (Coman et al., 2019: p.1252); y finalmente la especie 4, positivos a los sustratos como la lactosa, fructosa, maltosa, glucosa y manitol, posiblemente corresponda al género de *Lactobacillus plantarum*, por lo que coincide con los resultados encontrados por, (Duchi, 2022, p.53), (Peralta, 2014, p.47), y (Ahmad et al., 2018, p.3) en su estudio sobre identificación de *lactobacillus*.

3.4. Bacterias Acéticas

3.4.1. Identificación morfológica de las Bacterias Acéticas.

Tabla 5-3: Morfología de las bacterias acéticas aisladas del bosque primario del Cantón Cumandá.

#ESPECIE	COLOR	SUPERFICIE	COLOR
1	Elipsoidal	Crema-blanco	Lisa brillante
2	Circular	Crema-blanco	Lisa brillante

Fuente; (Duchi, 2022, p.52).

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

Se realizó la identificación morfológica de cada una de las especies identificadas, observando su forma, color, superficie, como lo indica la Tabla 5-3, por lo que la especie 1 posee una forma Elipsoidal, de color crema-blanco y superficie brillante, la especie 2 posee una forma circular de color beige y con una superficie lisa, resultados similares a los reportados por (Duchi, 2022, p.52). (Hernández y Barbero, 2008: p.23) que menciona que para identificar a las bacterias acéticas macroscópicamente debe tener un color crema o blanco, con formas elipsoidales o alargadas, filamentosas, puntiforme o irregular y superficies lisas (con ramificaciones) y que pueden presentarse de manera individual, en parejas o cadenas.

3.4.2. Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas

La identificación bioquímica de las especies aisladas se realizó en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias Pecuarias, obteniéndose los siguientes resultados como lo demuestra la tabla 6-3.

Tabla 6-3: Pruebas bioquímicas en bacterias Acéticas Oxidasa y Catalasa.

#ESPECIE	CATALASA	OXIDASA	TINCIÓN
1	+	-	-
2	+	-	-

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

De las 2 especies aisladas de bacterias acéticas, la especie 1 y 2 resulto negativo a oxidasa y tinción gram y positivo para catalasa, concordando los resultados con los reportados por (Aguirre, 2018, p.28) en su investigación de identificación de microorganismos de suelos de la Provincia de Pichincha, lo cual para que sea considerada bacteria acética debe ser catalasa positiva, tinción y oxidasa negativa (Duchi, 2022, p.53).

(Flanzy, 2000, p.45) citado por (Rivera, 2013, p.5) también menciona que las bacterias acéticas, tienen forma de pequeños bastoncitos, que al ser observadas al microscopio se pueden encontrar agrupadas a menudo en parejas y a veces en pequeñas cadenas. Algunas especies son inmóviles y otras móviles con flagelos polares, lo que coincide con los resultados obtenidos al momento de realizar la tinción gram de las bacterias acéticas, ya que la especie 1 al observar al microscopio se encontraba en forma de bastoncitos y agrupados, mientras que la especie 2 en pequeñas cadenas.

3.4.3. Prueba de fermentación de azúcares de las BAA

La prueba de fermentación de azúcares ayuda a la identificación de las especies de Bacterias Acéticas que existe en el suelo de bosque primario de Cumandá las cuales pasaron las pruebas anteriores de oxidasa, catalasa, y tinción gram, (Duchi, 2022, p.53). Lo cual se obtuvo los siguientes resultados como se describe en la tabla 7-3

Tabla 7-3: Fermentación de azúcares de bacterias acéticas.

#ESPECIE	H ₂ S	DEXTROSA	FRUCTOSA	LACTOSA	GLUCOSA
1	-	+	+	-	+
2	-	-	+	-	+

Fuente; (Duchi, 2022, p.54).

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

Con los resultados obtenidos en la prueba de fermentación de carbohidratos, la especie 1 proporciono resultado positivo a los sustratos como la glucosa, fructosa, dextrosa y negativo a ácido sulfhídrico y lactosa, la especie 2 mostró resultados positivos a glucosa, fructosa pero

negativo a lactosa y ácido sulfhídrico, resultados similares a los obtenidos por (Salazar, 2017, p.66) y a en su estudio sobre aislamiento de microorganismos en suelos y a (Duchi, 2022, p.54) lo cual tanto, las especies 1 y 2 pueden pertenecer al género *A. syzygii* o *A. aceti* sin embargo, para confirmar esto, se deberían realizar más pruebas bioquímicas y correlacionarlas con pruebas moleculares, pruebas API, etc., pero la probabilidad de que sean cualquiera de estos tipos de géneros antes mencionados son altos, porque (Bastidas, 2019. p.76), en estudios realizados sobre el proceso de fermentación con microorganismos de montaña en Chile menciona que, se encontraron varias especies del género *Acetobacter*, en especial el *A. aceti*, por lo que existe una mayor posibilidad que en el suelo de bosque primario del Cantón Cumandá exista este tipo de género.

3.5. Levaduras.

Identificación morfológica de Levaduras.

Con la observación morfológica se lograron identificar 2 especies de levaduras ya que para su aislamiento se la realizó con Agar Potato Dextrosa (PDA), de esta manera hacemos una comparación de nuestras colonias con la morfología de las colonias de levaduras, ya conocidas, presentando características propias como es el color, tamaño, forma, etc., (Castillo, 2022, p.46).

Tabla 8-3: Morfología de las levaduras aisladas del bosque primario de Cumandá.

#ESPECIE	COLOR	SUPERFICIE	FORMA
1	Blanco	Cóncavo	Esférica
2	Crema	Lisa	Cilíndrica

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

Se realizó la identificación morfológica de cada una de las especies identificadas, observando su forma, color, superficie, como lo indica en la Tabla 8-3, la especie 1 posee una forma esférica, color blanco y superficie cóncavo, mientras que la especie 2 tiene una forma cilíndrica, color crema y superficie lisa, resultados similares a los reportados por (Duchi, 2022, p.54) y (Luis y Moncayo, 2007: p.58), que menciona que las levaduras deben tener una forma que puede ser desde esférica a ovoide, alimonada, cilíndrica, triangular e incluso alargada, de diámetro, de color cremosas u opacas, con superficie lisa.

3.5.1. Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas.

Tabla 9-3: Pruebas bioquímicas en Levaduras Caldo YPD.

ESPECIE	FERMENTACIÓN	24h	48h
		pH	pH
1	Presencia	5,3	4,1
2	Presencia	5	4,4

Fuente; (Duchi, 2022, p.55)

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

Se realizó la prueba de fermentación a las 2 especies de levaduras ya identificadas morfológicamente en caldo YPD, como lo indica la tabla 9-3, pasadas las 48 horas las especies 1 y 2 el tono del caldo se volvió amarillo claro, lo que quiere decir que la prueba resultó positiva a fermentación y con un pH de 5 y 5.3, respectivamente, concordando con lo descrito por (Salazar, 2017, p. 34) que afirma que cuando un caldo YPD se torna amarillo existe la presencia de fermentación. (Condalab, 2019, p. 3) indica que este tipo de líquido es específicamente para el crecimiento y desarrollo del género *Sacharomyces*. Por lo tanto, de acuerdo con las reacciones producidas se estima que el género es el ya antes mencionado.

(Arias et al., 2019: p.57) afirma que al momento de observar microscópicamente a las levaduras del género *Saccharomyces* pueden observarse como racimos laxos de levaduras grandes, de color azul violeta en tinción gram, por lo que concuerdan con los resultados obtenidos al momento de realizar la observación en el microscopio con las cepas aisladas, ya que en la especie 1 y 2 se observó racimos grandes de levaduras.

3.5.2. Prueba de fermentación de azúcares de levaduras.

La prueba de fermentación de azúcares ayuda a la identificación de las especies de levaduras que existe en el suelo de bosque primario de Cumandá anteriormente se realizó un análisis con caldo YPD mediante el cual se estimó que pertenecen al género *Sacharomyces*, obteniendo los siguientes resultados como se describe en la tabla 10-3.

Tabla 10-3: Pruebas bioquímicas en Levaduras en Fermentación de Azucares.

ESPECIE	H ₂ S	LACTOSA	DEXTROSA	GLUCOSA	FRUCTOSA
1	-	-	+	+	+
2	-	-	+	+	+

Realizado por: Delgado, Silvia, 2023.

Los resultados encontrados en la prueba de fermentación de carbohidratos, tanto la especie 1 y 2 dieron como resultados positivos a la glucosa, fructosa, dextrosa y negativo a lactosa y ácido sulfhídrico, lo cual estos resultados obtenidos son semejantes a los conseguidos por (Arias et al., 2019: p.52) , y (Mestre, 2011, p.5), por lo que tanto la especie 1 y 2 de levadura posiblemente pueden pertenecer al género *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*, o *Saccharomyces carlsbergensis*, sin embargo se debería realizar más pruebas bioquímicas como pruebas API para confirmar a cada uno de las especies identificadas.

CONCLUSIONES

Se analizó la composición físico químico del suelo dando como resultado un pH de 6,55 considerado neutro, materia orgánica de 48,62 %, cenizas de 50,75 %, nitrógeno de 0,22 %, una humedad de 42,10 %, potasio 7,84 mg/L, nitratos 10,19 mg/L, magnesio 9,20 mg/L considerado un suelo medio en minerales según lo manifestado por el MAG.

Mediante las características metabólicas se determinó que el suelo de bosque primario en estudio existió la presencia de 4 especies de bacterias ácido - lácticas dando negativos para oxidasa, catalasa e hidróxido de potasio, pero positivos para tinción gram, 2 especies de bacterias acéticas dando como resultados negativos a tinción gram y oxidasa, pero positivo para catalasa, finalmente 2 especies de levaduras siendo positivos para caldo YPD y tinción gram

Se logro identificar a cada una de las especies aisladas en cuanto a las bacterias ácido lácticas posiblemente pueden pertenecer a los géneros, *Lactobacillus*, *Enterococcus* *Leuconostoc*; las bacterias acéticas probablemente a los géneros *Acetobacter*; y las levaduras pueden corresponder a los géneros de *Sacharomyces*.

RECOMENDACIONES

Realizar este tipo de estudios en otros tipos de bosques en el Ecuador, para establecer la existencia de microorganismos útiles en la industria.

Con el afán de haber una mayor exactitud en cuanto a la identificación de las especies aisladas, en el bosque primario en estudio, se propone la utilización de pruebas API CHL 50 específica o la utilización de un PCR, ya que ayudarían con más precisión a una mejor identificación.

BIBLIOGRAFÍA

ACHIGAR, R. Aislamiento, Selección E Identificación De Levaduras Nativas Con Propiedades Enológicas En Uvas Tannat. 2017. pp. 50.

AGUILAR, A; et al. Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo. *Análisis técnicos*, S.A de C.V. [en línea], no. 1987, pp. 1-15. Disponible en: <http://edafologia.ugr.es/conta/tema12/medida.htm>.

AGUILERA, S. María. Importancia de la protección de la materia orgánica en suelos. 2000. pp. 77-78.

AGUIRRE, J. *Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito* [en línea]. S.l.: s.n. ISBN 1718812728. 2018. p.28. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15894/1/UPS-QT13036.pdf>.

AHMAD, M.S; et al. Morphological and Biochemical Studies For The Identification of *Lactobacillus plantarum* sp. nov., and *Lactobacillus fermentum* sp. nov., From Municipal Waste. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 7, no. 5, 2018, pp. 1421-1424. ISSN 2278-4136. DOI 10.13140/RG.2.2.13721.06240.

ALMEIDA, L. Universidad Central Del Ecuador. *Universidad Central Del Ecuador*, 2017, pp. 105.

AMAGUAYA, Jose Luis. Determinación de carbono en el suelo de bosque nativo de Ceja Andina en el sector de Guangra, Parroquia Achupallas, Cantón Alausí, provincia de Chimborazo, Tesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Escuela de Ingeniería Forestal, Riobamba – Ecuador, 2015. pp. 8-39.

ANDRADES, M; et al. Prácticas de edafología: métodos didácticos para análisis de suelos. *Material didáctico. Agricultura y alimentación*, vol. 15, no. 7, 2015. p. 45.

AQUIAHUATL RAMOS & María y PÉREZ CHABELA María. Manual del laboratorio de microbiología general, Universidad Autónoma Metropolitana, México - Itzapalapa, ISBN, 9703101410, 2004, p.37.

ARANA ET AL., Enumeración de microorganismos. Departamento Inmunología, Microbiología y parasitología, Universidad del País Vasco, [Consulta: 02 de mayo 2023], pp. 2-3. Disponible en:https://ocw.ehu.eus/file.php/48/Tema_2._Metodos_basicos_de_enumeracion_de_microorganismos.pdf

ARIAS, A; et al. Identificación morfológica, fisiológica y molecular de levaduras del género *Saccharomyces* para la elaboración de cerveza. *Mente Joven*, vol. 8, 2019, pp. 61.

ARIAS, Daniela & RAMÍREZ, Juan. Actividad microbiana de suelos con manejo orgánico y convencional. *Montaje y producción*, 2014, p. 1930.

ARIAS, Noé Manuel; et al. Los microorganismos: pequeños gigantes. 2005.p.15.

AZCARATE-PERIL, M. Andrea; et al. Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus gasser* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism. 2008, p.45.

BASTIDAS, J. *Evaluación de un proceso de fermentación con microorganismos de montaña, como postratamiento para efluente producido en un biodigestor anaerobio.* S.l.: UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, 2019.p.28

BASTIDAS, Ernesto. *Alternativas económicas de producción sostenible para las familias carboneras del corregimiento de El Encano, municipio de Pasto–departamento de Nariño–Colombia.* 2010. pp. 21-29 Tesis Doctoral. Universidad de Nariño.

BAVA, J. Transformación de Bosques Vírgenes. Aportes Ecológicos y Silviculturales a la Transformación de Bosques Vírgenes de Lengua (*Nothofagus pumilio* (POEPP. ET ENDL.) KRASSER) en Bosques Manejados en el Sector Argentino de Tierra del Fuego. 1997. p. 27.

BENAVIDES, GERMAN. *Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los paramos cruz verde y guasca.* Bogota : Mundi impresiones, 2008.p.6.

BENAVIDES RODRÍGUEZ, Germán David & HERMIDA SILVA, Ana María. Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los Páramos Cruz Verde y Guasca (Cundinamarca). 2008. pp. 22-23.

BONILLA, Mónica et al., Manual de prácticas de microbiología básica. Ingeniería biológica, UAM – Cuajimalpa, ISBN 986072809758, 2016, p. 38.

BOU, Germán; et al. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, vol. 29, no 8, 2011, p. 601-608.

BOSQUES PRIMARIOS [blog]. [Consulta: 02 de mayo 2023], pp. 2-3. Disponible en: <https://www.jcu.edu.au/state-of-the-tropics/publications/2014-state-of-the-tropics-report/spanish-versions/Insight-Primary-Forests-Spanish.pdf>

BURBANO BURBANO, Lucía Adriana & UTRERAS FLOR, José Andrés. *Evaluación de las hojas de canchaquiro (Tournefortia Scabrida, Kunth), presentes en Mojanda (Imbabura Ecuador), como especie vegetal fijadora de nitrógeno.* 2015. p. 13.

CALVO, Pamela & ZÚÑIGA, Doris. Caracterización fisiológica de cepas de Bacillus spp. aisladas de la rizósfera de papa (Solanum tuberosum). *Ecología aplicada*, 2010, vol. 9, no 1, p. 31-39.

CARMEN, J; et al. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. no. 7, 2017.

CASTILLO, L. Identificación de Bacilos Gram negativo no fermentadores para aplicación en celdas de combustible microbianas y en bioremediación. 2012, p. 71.

CERDA MOROCHO, Andrea Carolina & PÉREZ VÉLEZ, Yolanda. Dspace. Dspace ESPOCH. [Online] Febrero 17, 2020. [Cited: Enero 30, 2021.] <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/14263/1/236T0489.pdf>. 236T0489.

CERCENADO, Emilia y CANTÓN, Rafael. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 2010. pp.3-6.

COMAN, M; et al. Probiotic characterization of Lactobacillus isolates from canine faeces. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 126, no. 4, 2019. pp. 1245-1256. ISSN 13652672. DOI 10.1111/jam.14197.

CONDALAB. Caldo YPD se utiliza para el mantenimiento y desarrollo de levaduras en procedimientos de biología molecular. La fórmula es la misma que en la Base Test microbiológico. *Junio*. 2019.

DELGADO, M. <https://www.oriusbiotech.com>. Obtenido de https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Los_microorganismos_del_suelo_en_la_nutrici%C3%B3n_vegetal. 2019. p.23.

DEFT, M. . Caracterización bioquímica y tecnológica de cepas ácido lácticas aisladas de leche cruda de oveja en el proceso de elaboración de queso artesano de Teruel, 2011. p.26

DICKINSON, B. Procedimientos de control de calidad BBL TSI agar slants. Octubre 2015 [Consultado en mayo 2021]. 2015 Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22772#>:

DOCAMPO, Roberto. La importancia de la materia orgánica del suelo y su manejo en producción frutícola. *Serie Actividades de Difusión*, vol. 687, 2010, p. 81-89.

DORIS, S. & S. PLACENSIA. Manejo ecológico del suelo como fundamento de los procesos de transición hacia la agroecología, Tesis Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador, 2012. pp.6-8.

DUCHI, B. *MICROORGANISMOS DE USO AGROINDUSTRIAL AISLADOS DEL DEL SUELO DE UN BOSQUE PRIMARIO DE LA PARROQUIA PUNGALA CANTÓN RIOBAMBA*. S.l.: s.n. 2022.

DUEÑAS, D. *Cuantificación del porcentaje de humedad y porcentaje de cenizas contenido en los residuos sólidos urbano del Distrito metropolitano de Quito*. S.l.: Universidad Internacional SEK.2012

DUXBURY, J; et al. Soil organic matter as a source and sink of plant nutrients. In: Coleman, D:C: Oades, J:M: and Uehara, G. (eds). *Dynamics of Soil Organic Matter in Tropical Ecosystems*. Honolulu. Hawaii, USA. University of Hawaii Press. 1989. pp. 33-67.

ESPÍN, G. Parámetros físicos y químicos para la determinación de la calidad de los suelos en la microcuenca Jun.JUN. *Universidad Técnica de Ambato* [en línea], 2019. pp. 20-84. Disponible

en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30131/1/Tesis-238> Ingeniería Agronómica -CD 641.pdf.

FAO, *El estado de los bosques del mundo*, 2020. pp. 15-16. Obtenido de: <https://www.fao.org/3/ca8642es/CA8642ES.pdf>

FAO & MAG. El manejo del suelo en la producción de hortalizas con buenas prácticas agrícolas ORGANIZACIONES DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA – FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 2013.

FERNANDES, H.P. Aislamiento y selección de levaduras para la producción de etanol durante la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce. , 2014, pp. 139.

FLANZY, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. S.l.: s.2000.

FRANCISCO GALINDO MONTERO, V. Facultad de ciencia y tecnología. Google académico [en línea], 2016. p. 24. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/6858>.

GALINDO MONTERO, V. Facultad de ciencia y tecnología. *Google académico*, 2016. p. 111 pag.

GALLUT, P. Aislamiento y Cultivo de microorganismos asociados a oncoides de manantiales hidrotermales de Santispac, Bahía Concepción, B.C.S., México. [en línea], 2016. pp. 1-70. Disponible en: <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/548>.

GARCÍA, Álvaro. La materia orgánica (MOS) y su papel en lucha contra la degradación del suelo. En *Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Quito, Ecuador, Memorias*. 2008. pp. 1-3.

GARCÍA, F. Microbiología del suelo. Recuperado el 10 de Diciembre de 2017, de http://www.florgarcia.com/wpcontent/uploads/2011/11/MICROBIOLOGIA_DEL_SUELO.pdf

GARCÍA VELASCO, Carlos Alfredo. *Uso del compost y papel de la materia orgánica del suelo en la producción de café, la situación en la zona de San José del Tambo, Bolívar*. 2021. Tesis de Licenciatura. BABAHOYO: UTB, 2021. pp. 2-3.

GEISSMAN, Theodore Albert. *Principios de química orgánica*. Reverte, 1973. pp. 2-3.

GERARD, Liliana Mabel. *Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas*. 2016. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València. p.2.

GÓMEZ, Elvia; et al. Evaluación de harina de soya como fuente primaria en la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Agroindustrial Science*, vol. 5, no 1, 2015. p. 49-59.

GRANT, W. *Microbiología ambiental*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1989. p.23.

GUAMAN, L. Evaluación de la eficiencia de microorganismos Nativos en el tratamiento de pozas sépticas de una granja porcina del Cantón Piñas, Provincia el Oro en el Año 2015 [en línea]. S.l.: (Trabajo de titulación) Universidad Internacional SEK. 2016 pp 76 Disponible en: <https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/1477/1/TESIS ME.pdf>.

GUÍA NATURAL [blog]. [Consulta: 01 de mayo 2023], p. 1. Disponible en: <https://ieslilab.files.wordpress.com/2011/03/los-bosques-primarios.pdf>

GUÍA DE MUESTREO, Instituto geográfico Agustín Codazzi (IGAC) [blog]. [Consulta: 06 de mayo 2023], pp. 1-8. Disponible en: <https://www.igac.gov.co/sites/igac.gov.co/files/guiademuestreo.pdf>

GULLO, M; et al. Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, p. 209.

HENRY, J. & Glynn RUNALLS, O. Residuos peligrosos. *Ingeniería ambiental* (Eds. JG HENRY and GW Heinke), Prentice Hall, México, 1999, p. 620-622. p.23.

HERNANDEZ, I. & BARBERO, F. Bacterias Acéticas: técnicas de detección y eliminación. [en línea], 2016. pp. 12-16. Disponible en: http://www.guserbiot.com/pdf/Guserbiot_Viticultura_Bacterias_Aceticas.pdf, p.46.

HERNÁNDEZ-URZÚA, Miguel. *Microbiología de los alimentos Fundamentos y aplicaciones en Ciencias de la Salud*. México, D.F.: Editorial Médica Panamericana, 2016. ISBN 978-607-9356-84-2 versión impresa ISBN 978-607-9356-85-9 versión electrónica.

INÉS, C. y BASTIDAS, P. Aislamiento, identificación y conservación de microorganismos presentes en residuos lignocelulósicos (Pulpa) provenientes del beneficio del café. , 2011. pp. 1-68.

JAIMES, G. & ZULAY, Y. REVENCYT-RedidiCiencia. Aislamiento, identificación y caracterización molecular de *Lactobacillus* sp, provenientes de diferentes fuentes animales y ensilados: su evaluación como potencial probiótico para nutrición animal|<http://bdigital.ula.ve/RediCiencia/>.2011.

JOYEUX, A; et al. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1), 1984. pp.153–156.

LATORRE, I. Caracterización bioquímica y tecnológica de cepas ácido lácticas aisladas de leche cruda de oveja en el proceso de elaboración de queso artesano de Teruel.. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, 2011. pp. 26.

LEÓN AVILÉS DORIS, Doris Jeaneth; et al. *Análisis de la información científica de Microorganismos eficientes de montaña para potenciar la Diversidad Biológica de los Suelos Agrícolas*. Tesis de Licenciatura. Ecuador, Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi UTC. 2020. pp. 10-11.

MACHÍN, Caridad, et al. Levadura *Saccharomyces Cerevisiae* Y La Producción De Alcohol. Revisión Bibliográfica. Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* and The Production Of Alcohol. A Review. *Revista ICIDCA*, vol. 50, 2016, p. 20-29.

MÁRQUEZ, Pedro Bueno et al., 4. Factores que afectan al proceso de compostaje. *Compostaje*, 2008, p. 93.

MEDINA GONZALEZ, R; et al. DISTRIBUCIÓN Y VARIABILIDAD ESPACIAL DEL pH Y MATERIA ORGÁNICA DE LOS SUELOS DE TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO, MÉXICO. 2022. pp. 14-16.

MENDOZA, R. y ESPINOZA, A. Guía Técnica para muestreo de suelos. *Universidad Nacional Agraria*, 2017. pp. 13-14

MENGUAL, M. El perfil del suelo y sus horizontes. *Obtenido de: <https://historia-vcentenario.wikispaces.com/file/view/El+perfil+del+suelo+y+sus+horizontes.pdf>*, 2013, p.28.

MESTRE, C. Biodiversidad de levaduras de suelo y rizósfera asociadas a especies de Nothofagus ectomicorrícicos del Bosque Andino - patagónico, 2011. pp. 245.

MONCAYO, G. *UNIDAD IV: ECOLOGIA MICROBIANA*. S.l.: s.n. ISBN 9788490225370, 2000. p.14.

MONTERO, V. Facultad de ciencia y tecnología. *Google academico*, 2016. p. 111 pag.

MORENO, LÓPEZ, Joana Alexandra & VELARDE, ESCOBAR, Kristina Estefanía. *Aislamiento, caracterización y usos potenciales de microorganismos de tierra de montaña y subtrópico durante el periodo 2016*. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.2016. p.77.

MURILLO GALLARDO, Erika Lisbeth & PULLUPAXI CHILUIZA, Luis Sebastián. *Aislamiento e Identificación de Microorganismos Fermentadores de una Bebida Ancestral fermentada (chicha) a partir de Chonta (bactris gasipaes hbk)*. Tesis de Licenciatura. Ecuador, Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC). 2019. pp. 40-41.

NORDEN, Natalia. EN BOSQUES trÓPICALES. *Biodiversidad, Conservación y Desarrollo*, 2012, p. 201.

NTE INEN-ISO 11461. Calidad del suelo. Determinación del contenido de humedad del suelo expresado como fracción en volumen utilizando cilindros de muestreo. método gravimétrico (iso 11461:2001, idt) Norma Técnica Ecuatoriana Enero 2014 Disponible en: https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_11461.pdf. 2014. p.1-12

NÚÑEZ REINOSO, José Alejandro & SIERRA ARIAS, César David. *Identificación de microorganismos de suelos de la provincia de Pichincha, con capacidad de producir antibióticos de amplio espectro*. Tesis de Licenciatura. 2018. pp. 10-12.

OCHOA, Marcela Sarabia; et al. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, vol. 12, no 1, 2010, pp. 65-71.

OLMOS, A; et al. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología. 2010. p.18. Recuperado el 30 de octubre de 2017, de

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.

OLIVAS, Evangelina y ALARCON, Luis. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología básica y microbiología de alimentos. 2011. p.12.

ORDOÑEZ P. Evaluación de la participación de bacterias del Género Bacillus en los procesos de degradación de los lodos de las lagunas de oxidación. Tesis de pregrado. Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 1998. p. 63.

OSORIO, N. W. pH del suelo y disponibilidad de nutrientes. *Manejo integral del suelo y Nutrición vegetal*, vol. 1, no 4, 2012, pp. 1-4.

OTERO, V. Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana. [en línea], 2011. pp. 161. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/5325/>.

PALACIO, Walter & JARAMILLO, Nubia. Riqueza florística y forestal de los bosques tropicales húmedos del Ecuador e implicaciones para su manejo. *Recursos Naturales y Ambiente*, 2001, pp. 46-48.

PATIÑO CASTILLO, Blanca Dolores. *Determinación de la biodiversidad microbiana de los bosques nativos Llucud y Palictahua de la provincia de Chimborazo.* Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2018. pp. 1-10.

PEÑA, C; et al. Sistema de Visión Artificial para el Reconocimiento y el Conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC). *Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada*, vol. 1, no. 17, 2011, pp. 9-15.

PÉREZ MATIAS, ZULEMA & MENDOZA CHAMÚ, DAVID. Comportamiento productivo de caprinos suplementados con *Saccharomyces cerevisiae*, con dos fuentes de forraje fibroso. 2019. pp.11-12.

PERILLA, M; et al. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo

en Desarrollo. 2003.p. 19 Recuperado el 25 de noviembre de 2017, de http://www.who.int/drugresistance/infosharing/WHOCDS_CSR_RMD_2003_6_Manual_Laboratorio.pdf

PERALTA, L. Actividad antagónica de bacterias ácido lácticas aisladas de queso fresco artesanal frente a *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. *Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad nacional de San Antonio Abad del Cusco*. 2014.

PINO, F. Características de las bacterias. batnaga, 1.*Rev. Scielo* 2012: p.35

QUIRÓS, Kenner. Composición florística y estructural para el bosque primario del hotel la laguna del Lagarto Lodge, Boca Tapada de Pital, San Carlos, Alajuela, Costa Rica, Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2002, pp.12-14.

QUISPE RÚA, William. Microorganismos eficaces (EM) en el rendimiento de arveja (*Pisum sativum* L.), variedad remate en Canaán a 2750 msnm-Ayacucho. 2010. p.27.

RAMIREZ RAMIREZ, JOSE CARMEN; et al. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *CONACYT*, 2011. pp.1-3.

REYNOSO, María; et al. Manual de microbiología general. Río Cuarto - Argentina: Unirío editora, 2015. ISBN 978-987-688-124-1.

RIVADENEIRA MOYA, D. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. *Tesis* [en línea], 2015. pp. 1-100. DOI 10.20868/UPM.thesis.39079. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>.

RIVERA, C. *EFEECTO DE UNA CEPA DE BACTERIA ACÉTICA NATIVA SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE VINAGRES OBTENIDOS A PARTIR DE VINO BLANCO Y TINTO*. S.l.: UNIVERSIDAD DE CHILE. 2013.

RODRIGUEZ, J. *Muestreo y preparación de la muestra*. S.l.: s.n. 2015.

RODRÍGUEZ, Patricia y ARENAS, Roberto. Hans Christian Gram y su tinción, Dermatología cosmética, médica y quirúrgica, vol. 16, 2018, pp. 166-167.

RUIZ, C. Activación E Identificación Bioquímica De Los Conglomerados De Bacterias Probióticas Abt-5, Aby-3 Y Bc-7 Utilizando El Kit Rápido Api 50 Ch. *Delos*, vol. 5, no. 13, 2012. pp. 16. ISSN 1988-5245.

SALAZAR, L. *Aislamiento y caracterización de microorganismos durante el proceso de fermentación de Theobroma Cacao L. de la variedad «Chuncho» obtenida en Cuzco, Perú.* S.l.:2017. UNIVERSIDAD PERUANA CAYETAHO HEREDIA.

SALTILLO, R.C.P. y TEL, M. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS NATIVAS DE *Dasyliirion* spp CON EL EQUIPO AUTOMATIZADO MICROSCAN. 2006. p.26.

SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, Rufo; et al. Cambios en las propiedades físicas de un suelo arcilloso por aportes de lombricomposto de cachaza y estiércol. *Interciencia*, vol. 30, no 12, 2005, pp. 775-779.

SÁNCHEZ RIOFRIO, Christian David. *Identificación de microorganismos mediante la captura en dos terrazas agrícolas en el Campus Salache, Latacunga, Cotopaxi.* Tesis de Licenciatura. Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC). 2022.p.11.

SÁNCHEZ, Juan Armando & MADRIÑÁN, Santiago. *Biodiversidad, conservación y desarrollo.* Universidad de los Andes, 2012.

SANZ CERVERA, Susana. *Prácticas de microbiología,* Universidad de la Rioja, 2 da edición, 2011, p.30.

SEPÚLVEDA, J. *Determinación De Nitrato En Suelos Agrícolas Y En Aguas.* 2017.

THIEMAN, W & PALLADINO, M. *Introducción a la biotecnología.* Madrid: Pearson Educación S.A. 2010. pp. 3-4.

TOALOMBO IZA, Rita Maribel. *Evaluación de microorganismos eficientes autóctonos aplicados en el cultivo de cebolla blanca (Allium fistulosum).* Tesis de Licenciatura. 2012. pp.56-67.

TOAPANTA ALBÁN, Cristina Elizabeth. *Diversidad del orden Polyporales en un área de bosque intervenido y un área de bosque primario en la Estación Científica Yasuní.* Tesis de Licenciatura. PUCE. 2014. pp.40-45.

TORO, Daniel Ricardo. *Manual para la introducción al laboratorio de microbiología.* Universidad de Caldas, Colombia.2005. pp.14-17.

TORTORA, G et al., Introducción a la microbiología. Crecimiento microbiano [en línea]. Buenos Aires: s.n., 2017 pp. 159-160. Disponible en: http://redbiblio.unne.edu.ar/pdf/0603-002731_d.pdf.

VALERIO, Juvenal & SALAS, Cynthia. Selección de prácticas silviculturales para bosques tropicales. *Manual técnico. Santa Cruz: El País,* 1998. p.35

VARGAS J. Evaluación microbiológica comparativa del queso de hoja tradicional elaborado en una planta industrial y en una Artesanal de la ciudad de Latacunga [en línea]. (Trabajo de titulación) S.l.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2018. pp. 30-35 Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/8834/1/56T00769.pdf>

VAZQUEZ, SIMON. *Utilizacion de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias acido lacticas en la conservacion de alimentos.* Chile : Revista Chilena , 2009.

VELASCO JIMÉNEZ, Antonio; et al. Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, vol. 38, no 2, 2020, p. 333-345.

VERDURA, MARÍA. *Microorganismos beneficios y amigables con el medio ambiente .* Cuba : MIOD, 2011. p. 64.

VERDEZOTO, C. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao.L*) trinitario y nacional. , 2017. pp. 28.

VOLKE, T., & LILIA, P. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología. México. 2012. p.12.

VIERA-ARROYO, William Fernando. Rol de los microorganismos benéficos en la Agricultura Sustentable. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 2020, vol. 8, no 2, p. 67-68.

WALTEROS, F.M. Caracterización de cepas de levadura colombiana *Saccharomyces cerevisiae* para su potencial uso en la producción de cerveza «Colombian Ale». *instname:Universidad de los Andes* [en línea], 2020. pp. 1-56. Disponible en: <http://hdl.handle.net/1992/44911>.

WAGNER, CRISTIAN. *Las Levaduras y sus productos derivados*. Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmes, 2010.

WAHREN, RICHARD. *Brot und Getreide in der Urgeschichte*. Madrid: Schweizerisches Landesmuseum, 1990. p.174.

WASSENAAR, TOMAS. *Metabolomics in the natural products field- a gateway to novel antibiotics*. New Jersey: Somerset NJ USA, 2015. p. 47.

ZEBALLOS HEREDIA, M.F. Caracterización de microorganismos de montaña (MM) en biofertilizantes artesanales. *Escuela Agrícola Panamericana*, no. Mm, 2017. pp. 4-28.



ANEXOS

ANEXO A: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR MRS.

Composición		Instrucciones
Proteasa peptona N.º 3	10,0g	1. Suspender 70 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C.
Extracto de carne	10,0g	
Extracto de levadura	5,0g	
Dextrosa	20,0 g	
Citrato de amonio	2,0 g	
Polisorbato 80	1,0 g	
Acetato de sodio	5,0g	
Citrato de amonio	2,0g	
Sulfato de magnesio	0,1g	
Sulfato de manganeso	0,05g	
Agar	15,0g	
pH final: 6.5 ± 0.2		

ANEXO B: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO MRS.

Composición		Instrucciones
Proteasa peptona	10,0g	1. Suspender 55,15 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C.
Extracto de carne	10,0g	
Extracto de levadura	5,0g	
Dextrosa	20,0 g	
Dipotasio de fosfato	2,0 g	
Tween 80	1,0 g	
Acetato de sodio	5,0g	
Citrato de amonio	2,0g	
Sulfato de magnesio	0,1g	
Sulfato de manganeso	0,05g	
pH final: 6.5 ± 0.2		

ANEXO C: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR ACETOBACTER GLUCOSA.

Composición		Instrucciones
Extracto de levadura	10,0g	1. Suspender 38 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C.
Glucosa	3,0 g	
Citrato de amonio	2,0 g	
Carbonato de calcio	10,0g	
Agar	15,0g	
pH final: 7.4 ± 0.2		

ANEXO D: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR SABORAU DEXTROSA.

Composición		Instrucciones
mezcla de peptona y triptona	10,0g	1. Suspender 65 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C. Poner en las cajas Petri a una temperatura de 45-50°C
Dextrosa	40,0 g	
Agar	15,0g	
pH final: 5.6 ± 0.2		

ANEXO E: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR POTATO DEXTROSA.

Composición		Instrucciones
Infusión de papa	4,0g	1. Suspender 39 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C.
Dextrosa	20,0 g	
Agar	15,0g	
pH final: 5.6 ± 0.2		

ANEXO F: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO POTATO DEXTROSA BROTH.

Composición		Instrucciones
Infusión de patatas	200,0g	1. Suspender 70 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C.
Dextrosa	20,0 g	
Agar	15,0g	
pH final: 5.1±0.2		

ANEXO G: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO YPD.

Composición		Instrucciones
Extracto de levadura	10,0g	1. Suspender 70 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C.
Dextrosa	20,0 g	
Peptona	20,0 g	
Cloranfenicol	0.5 g	

ANEXO H: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA pH DEL SUELO BOSQUE PRIMARIO.

<i>pH</i>	
Media	6,518
Error típico	0,152750029
Mediana	6,66
Moda	6,83
Desviación estándar	0,591598319
Varianza de la muestra	0,349988571
Curtosis	3,175699902
Coefficiente de asimetría	-1,922565557
Rango	2,11
Mínimo	5
Máximo	7,11
Suma	97,77
Cuenta	15

ANEXO I: ESTADISTICA DESCRIPTIVA HUMEDAD DEL SUELO BOSQUE PRIMARIO.

<i>%HUMEDAD</i>	
Media	42,10152994
Error típico	2,117142764
Mediana	39,03245488
Moda	#N/D
Desviación estándar	8,199658666
Varianza de la muestra	67,23440225
Curtosis	-0,408002176
Coefficiente de asimetría	0,994723864
Rango	23,55681464
Mínimo	33,72246393
Máximo	57,27927857
Suma	631,522949
Cuenta	15
Nivel de confianza (95,0%)	4,540819617

ANEXO J: ESTADISTICA DESCRIPTIVA CENIZAS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.

<i>% C</i>	
Media	50,75033573
Error típico	6,119601184
Mediana	54,22715941
Moda	#N/D
Desviación estándar	23,70111347
Varianza de la muestra	561,7427798
Curtosis	-0,812827503
Coefficiente de asimetría	-0,445151978
Rango	74,22964994
Mínimo	8,746759632
Máximo	82,97640957
Suma	761,255036
Cuenta	15
Nivel de confianza (95,0%)	13,12523916

ANEXO K: ESTADISTICA DESCRIPTIVA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.

<i>%MO</i>	
Media	48,6244532
Error típico	2,92384824
Mediana	47,1856714
Moda	#N/D
Desviación estándar	11,3240156
Varianza de la muestra	128,233328
Curtosis	-0,4909408
Coefficiente de asimetría	-0,39349941
Rango	38,5587832
Mínimo	27,5142434
Máximo	66,0730267
Suma	729,366798
Cuenta	15

ANEXO L: ESTADISTICA DESCRIPTIVA NITROGENO DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.

<i>% N</i>	
Media	0,22927356
Error típico	0,01946161
Mediana	0,21515063
Moda	#N/D
Desviación estándar	0,07537449
Varianza de la muestra	0,00568131
Curtosis	-0,20144936
Coefficiente de asimetría	0,80304818
Rango	0,24070781
Mínimo	0,1316773
Máximo	0,37238511
Suma	3,43910338
Cuenta	15
Nivel de confianza (95,0%)	0,041741

ANEXO M: ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE NITRATOS EN EL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.

<i>NITRATO Mg/L</i>	
Media	10,18666667
Error típico	1,320168339
Mediana	9,6
Moda	#N/D
Desviación estándar	5,112989993
Varianza de la muestra	26,14266667
Curtosis	-0,778044438
Coefficiente de asimetría	0,505790763
Rango	16,2
Mínimo	3,8
Máximo	20
Suma	152,8
Cuenta	15

ANEXO N: ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE POTASIO EN EL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.

<i>POTASIO K mg/L</i>	
Media	7,84
Error típico	1,005688582
Mediana	6,1
Moda	6,1
Desviación estándar	3,895015129
Varianza de la muestra	15,17114286
Curtosis	0,901986027
Coefficiente de asimetría	1,130615251
Rango	13,5
Mínimo	3,8
Máximo	17,3
Suma	117,6
Cuenta	15
Nivel de confianza (95,0%)	2,156987483

ANEXO O: ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE MAGNESIO DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.

<i>Mg (mg/L)</i>	
Media	9,2
Error típico	1,656732297
Mediana	8
Moda	4
Desviación estándar	6,416496596
Varianza de la muestra	41,17142857
Curtosis	-0,333352621
Coefficiente de asimetría	0,795248057
Rango	20
Mínimo	2
Máximo	22
Suma	138
Cuenta	15

ANEXO P: LUGAR Y REALIZACIÓN DEL MUESTREO.



ANEXO Q: PESAJE DE LAS MUESTRAS Y ESTERILIZACIÓN.

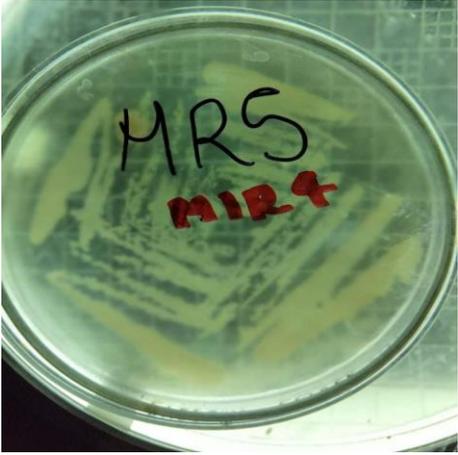
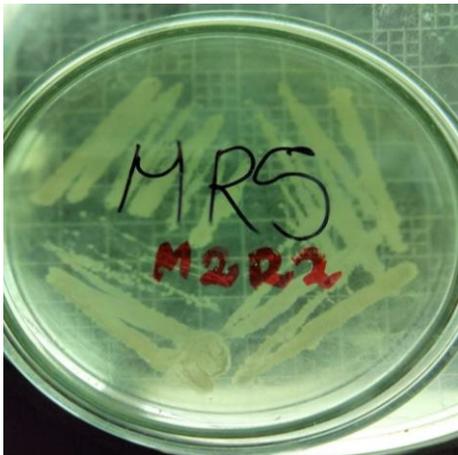


ANEXO R: SIEMBRA LOS MICROORGANISMOS EN LOS AGARES ESPECÍFICOS.

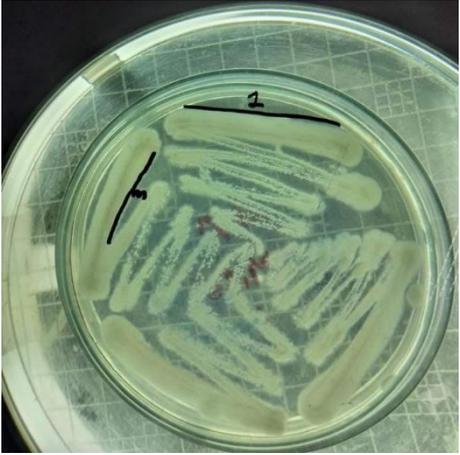


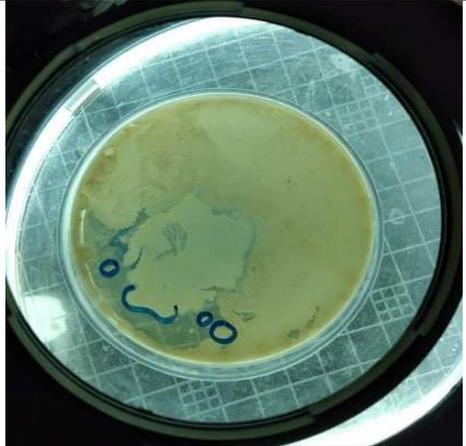
ANEXO S: SELECCIÓN DE CEPAS MÁS TINCIÓN GRAM.

MUESTRA	DILUCIÓN	DESCRIPCIÓN	IMAGEN
M1R1	10 ⁻¹	Agar: MRS Color: Crema Apariencia: Translucida Forma :irregular	

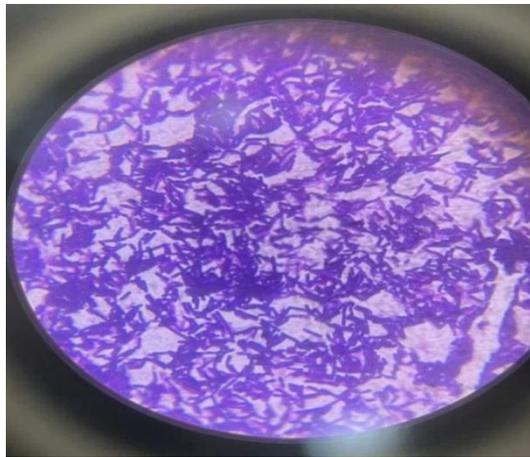
M1R4	10 ⁻⁴	<p>Agar: MRS Color: Crema Apariencia: Translucida Forma :irregular</p>	 <p>A photograph of a petri dish containing a yellowish, translucent agar medium. The dish is labeled 'MRS' in black marker and 'M1R4' in red marker. The agar shows irregular, streak-like growth patterns.</p>
M2R1	10 ⁻¹	<p>Agar: MRS Color: Crema Apariencia: Translucida Forma :irregular</p>	 <p>A photograph of a petri dish containing a yellowish, translucent agar medium. The dish is labeled 'MRS' in black marker and 'M2R1' in red marker. The agar shows irregular, streak-like growth patterns.</p>
M2R2	10 ⁻²	<p>Agar: MRS Color: Crema Apariencia: Translucida Forma :irregular</p>	 <p>A photograph of a petri dish containing a yellowish, translucent agar medium. The dish is labeled 'MRS' in black marker and 'M2R2' in red marker. The agar shows irregular, streak-like growth patterns.</p>

M4R3	10 ⁻³	Agar: MRS Color: Crema Apariencia: Translucida Forma :irregular	
M4R5	10 ⁻⁵	Agar: MRS Color: Crema Apariencia: Translucida Forma :irregular	
M5R5	10 ⁻⁵	Agar: MRS Color: Crema Apariencia: Translucida Forma :irregular	

M2R1	10 ⁻¹	<p>Agar: Sabouraud Color: Crema Apariencia: Translucida Forma :Circular</p>	
M1R5	10 ⁻⁵	<p>Agar: Sabouraud Color: Crema Apariencia: Translucida Forma :Irregular</p>	
M2R2	10 ⁻²	<p>Agar: Acetobacter (glucosa) Color: Crema Apariencia: Translucida Forma :Ovalada</p>	

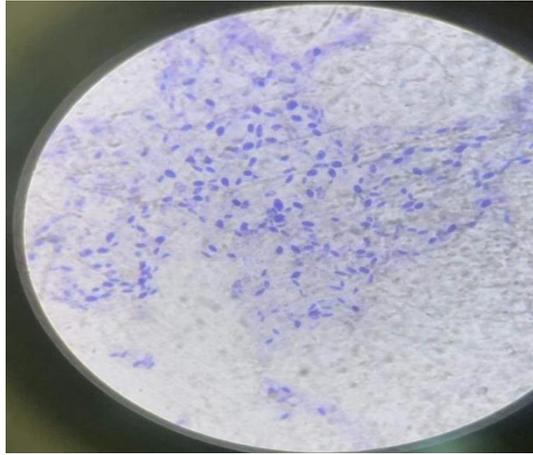
M5R5	10 ⁻⁵	Agar: Acetobacter (glucosa) Color: Crema Apariencia: Translúcida Forma :Ovalada	
------	------------------	---	--

ANEXO T: RESULTADOS DE TINCIÓN GRAM DE MRS.

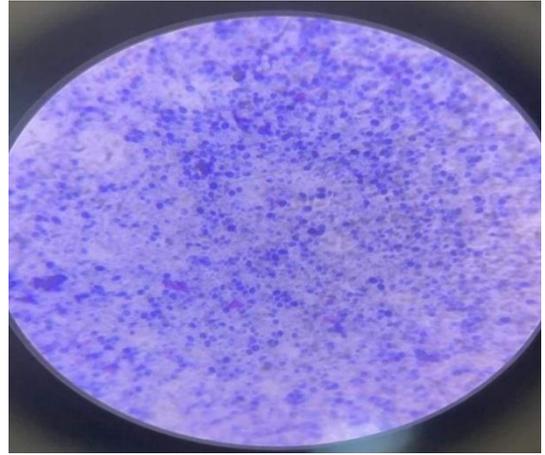


Código de la muestra:M2R1
Agar: MRS
Dilución: 10⁻¹
Lente: 100X
Descripción: Bacilos gram positivos

ANEXO U: PRUEBA DE TINCIÓN DE GRAM SABOURAUD.



Código de la muestra:M2R1
Agar: Sabouraud
Dilución: 10^{-1}
Lente: 100X
Descripción: Coccus gram positivos



Código de la muestra:M1R5
Agar: Sabouraud
Dilución: 10^{-5}
Lente: 100X
Descripción: Coccus gram positivos



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 11 / 05 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)

Nombres – Apellidos: Silvia Azucena Delgado Caizaguano

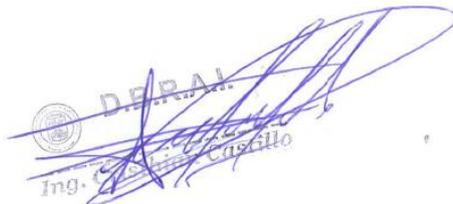
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL

Facultad: Ciencias Pecuarias

Carrera: Ingeniería en Industrias Pecuarias

Título a optar: Ingeniera en Industrias Pecuarias

f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz


Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



0664-DBRA-UTP-2023