



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA INGENIERIA QUÍMICA

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS
CON INTERÉS AGROINDUSTRIAL A PARTIR DE MUESTRAS
DE SUELO DE BOSQUES PRIMARIOS DEL CANTÓN COLTA”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO QUÍMICO

AUTOR:

ALEJANDRO GUILLERMO ORELLANA QUINCHUELA

Riobamba – Ecuador

2022



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA INGENIERÍA QUÍMICA

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS
CON INTERÉS AGROINDUSTRIAL A PARTIR DE MUESTRAS
DE SUELO DE BOSQUES PRIMARIOS DEL CANTÓN COLTA”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO QUÍMICO

AUTOR: ALEJANDRO GUILLERMO ORELLANA QUINCHUELA

DIRECTORA: Bqf. MARÍA VERÓNICA GONZÁLEZ CABRERA MSc.

Riobamba - Ecuador

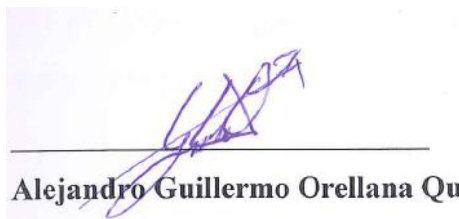
2022

©2022, Alejandro Guillermo Orellana Quinchuela

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, ALEJANDRO GUILLERMO ORELLANA QUINCHUELA, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular 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 autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 22 de noviembre de 2022






Alejandro Guillermo Orellana Quinchuela

C.I. 210054143-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA INGENIERÍA QUÍMICA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación, “**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON INTERÉS AGROINDUSTRIAL A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO DE BOSQUES PRIMARIOS DEL CANTÓN COLTA**”, realizado por el señor: **ALEJANDRO GUILLERMO ORELLANA QUINCHUELA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Lcda. Luz María Orna Puente PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-11-22
Bqf. María Verónica González Cabrera, MSc DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2022-11-22
Ing. Linda Mariuxi Flores Fiallos, MSc. ASESORA DEL TRIBUNAL		2022-11-22

DEDICATORIA

Viene a mi mente la frase “Un poco de Ciencia aleja de Dios, pero mucha Ciencia; devuelve a Él” dicha por Louis Pasteur.

La dedicatoria de este trabajo de Tesis de Grado va dirigida primeramente a Dios por haberme dado la fortaleza, la determinación y la sabiduría en cada paso que he dado durante mi existencia y mi tiempo de educación superior.

A mi madre Dolores, por su cariño, paciencia, sacrificio, apoyo incondicional, confianza y amor infinito que con sus consejos me ha hecho llegar hasta donde he llegado inculcándome valores los cuales me han ayudado a afrontar cada difícil momento que he atravesado en mi vida, estaré siempre a través del tiempo en deuda y agradecido con ella; y doy gracias a Dios por permitirme aún disfrutar, alegrarme y saber que los días son más bellos gracias a su amor y compañía en esta travesía llamada vida.

A mi padre Guillermo, por su comprensión, confianza, cariño y fuente de inspiración para cada día ser un mejor hombre de tener la templanza para afrontar la vida y no dejar de adquirir nuevos conocimientos.

A mi hermana Fernanda por su amistad, cariño, comprensión, e inspiración, por ayudarme en momentos apremiantes y por motivarme a realizar todos mis sueños y aventurarme a salir de mi zona de confort.

Alejandro

AGRADECIMIENTO

Cada etapa de la vida es un gran viaje y como todo viaje uno se lleva los momentos más alegres, y así como hay buenos momentos también hay días un poco grises pero las personas que nos regalan su tiempo que nos hacen ver nuestros errores y nos ayudan cada día a ser mejores.

Este agradecimiento va en primer lugar a Dios por darme luz en días oscuros por mantenerme humilde ante la riqueza por llenarme de esperanzas y de mucha fortaleza.

A mi madre que siempre ha estado apoyándome queriéndome aconsejándome haciendo de mis días más felices evitando que me dé por vencido, cuando me decaigo me levanta por ser el motivo para tener la templanza y un buen sentido del humor a pesar de las incertidumbres de la vida. A mi padre que siempre ha estado presente cuando los momentos apremian, que me ha convertido en una persona más valiente más determinada y más humilde.

A mi hermana que con sus conocimientos y manera de enseñar ha hecho que mi trayecto por esta etapa haya sido para bien, despejando las incertidumbres y curiosidades que uno tiene en los inicios. A mis amigos Jairo, Belén, Carlos y de manera muy especial a Silvia Patricia por brindarme su compañía, confianza, amistad e inspirarme a realizar nuevas investigaciones y siempre buscar una solución a los problemas que se me presentaron, y en los días complicados a través de su buen sentido del humor juntos deducimos nuevas alternativas para poder lograr cumplir esta ansiada meta y a mis docentes de Carrera, de manera especial a mi directora y asesora de tesis de Facultad de Ciencias Pecuarias y de la Facultad de Ciencias respectivamente por darme la oportunidad de desarrollar este tema de tesis además de enseñarme y asistirme en la realización del mismo, durante la parte de campo y experimental y a la vez que me brindaron su apoyo, para poder elaborar el presente trabajo de Tesis

Estas últimas líneas se las quiero dedicar a mi Alma Mater mi querida ESPOCH una hermosa parte de la vida la viví aquí y lo mejor haber conocido a muchas personas, grandes compañeros, grandes docentes, grandes amigos y pasar muchos momentos aprendiendo cosas nuevas desde el primer día en pisar un aula hasta el último día de clases presenciales, desde la última visita a un laboratorio hasta la última clase virtual, siempre estaré feliz y agradecido con esta noble institución.

Alejandro

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
Identificación del Problema.....	1
Justificación de la Investigación.....	2
Objetivos de la Investigación.....	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos.....	3

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1. Marco conceptual o glosario.....	9
1.1.1. <i>Bosques Primarios</i>	9
1.1.2. <i>Suelo</i>	10
1.1.3. <i>Biología del Suelo</i>	13
1.1.4. <i>Sector Agroindustrial</i>	13
1.1.5. <i>Situación actual de la agroindustria nacional</i>	14
1.1.6. <i>Microorganismos utilizados en la Agroindustria</i>	14
1.1.7. <i>Características de microorganismos para la Agroindustria</i>	16
1.1.8. <i>Factores que afectan el desarrollo de los microorganismos</i>	17
1.1.9. <i>Bacterias Ácido acéticas</i>	19
1.1.10. <i>Bacterias Ácido lácticas</i>	19
1.1.11. <i>Levaduras</i>	19
1.1.12. <i>Siembra de microorganismos</i>	20
1.1.13. <i>Crecimiento de microorganismos</i>	22
1.1.14. <i>Métodos de identificación de microorganismos</i>	24
1.1.15. <i>Conservación de microorganismos</i>	28

CAPÍTULO II	29
2. MARCO METODOLÓGICO.....	29
2.1. Hipótesis y variables	29
2.1.1. <i>Hipótesis General</i>	29
2.1.2. <i>Hipótesis Nula</i>	29
2.2. Identificación de Variables	29
2.2.1. <i>Variable Independiente:</i>	29
2.2.2. <i>Variable Dependiente</i>	30
2.3. Operacionalización de variables.....	32
2.4. Matriz de Consistencia.....	36
2.5. Tipo y diseño de investigación	37
2.5.1. <i>Tipo de Investigación</i>	37
2.5.2. <i>Diseño de Investigación</i>	37
2.6. Unidad de Análisis	38
2.7. Población de Estudio	38
2.8. Tamaño de Muestra.....	39
2.9. Selección de la muestra	40
2.10. Localización del trabajo de integración Curricular	40
2.10.1. <i>Localización de la fase de campo</i>	41
2.10.2. <i>Localización De La Fase De Laboratorio</i>	43
2.11. Técnicas de Recolección de datos	44
2.12. Fase de Campo	47
2.12.1. <i>Método de muestreo en campo</i>	48
2.13. <i>Fase de Laboratorio</i>	48
2.13.1. <i>Método de preparar las muestras en laboratorio para el aislamiento</i>	48
2.13.2. <i>Siembra de Bacterias Ácido Lácticas (Medio de Cultivo MRS)</i>	50
2.13.3. <i>Siembra de Levaduras (Medio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose))</i>	50
2.13.4. <i>Siembra de levaduras (Medio De Cultivo Sabouraud)</i>	52
2.13.5. <i>Siembra de bacterias fermentativas</i>	52
2.13.6. <i>Siembra de levaduras en agar YPD, Sabouraud, con etanol</i>	53
2.13.7. <i>Siembra de bacterias en agar acetobacter, con etanol de varias concentraciones...</i>	55
2.13.8. <i>Identificación macroscópica de microorganismos de uso agroindustrial</i>	56
2.13.9. <i>Identificación microscópica de lactobacillus</i>	57
2.13.10. <i>Identificación microscópica de levaduras</i>	57
2.13.11. <i>Identificación microscópica de bacterias fermentativas</i>	58

2.13.12. <i>Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas</i>	58
2.13.13. <i>Aislamiento de levaduras</i>	60
2.13.14. <i>Aislamiento de bacterias fermentativas</i>	61
2.13.15. <i>Identificación bioquímica de los microorganismos</i>	62
2.13.16. <i>Identificación de especies microbiológicas con el software ABIS</i>	72
2.13.17. <i>Medición de la cantidad de humedad en las muestras de suelo</i>	75
2.13.18. <i>Medición de la cantidad de materia orgánica en las muestras de suelo</i>	76
2.13.19. <i>Medición de la cantidad de nitrógeno en las muestras de suelo</i>	77
2.13.20. <i>Medición de la cantidad de potasio en las muestras de suelo</i>	78
2.13.21. <i>Conservación de microorganismos de uso agroindustrial</i>	79
CAPÍTULO III	80
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
3.1. Análisis de resultados	80
3.1.1. <i>Caracterización del suelo de bosque primario del Cantón Colta</i>	80
3.1.2. <i>Obtención de Unidades Formadores de colonias</i>	86
3.1.3. <i>Aislamiento de microorganismos</i>	91
3.1.4. <i>Selección de microorganismos</i>	93
3.1.5. <i>Caracterización de los microorganismos para uso agroindustrial</i>	94
3.2. Identificación de los microorganismos para uso agroindustrial	108
3.3. Proyección y evaluación del potencial de los microorganismos aislados	123
CONCLUSIONES	127
RECOMENDACIONES	128
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Principales nutrientes de estudio del suelo.....	5
Tabla 2-1:	Métodos más utilizados para el aislamiento de microorganismo.....	7
Tabla 3-1:	Principales agentes criaron protectores	8
Tabla 4-1:	Tipos de tamaño de partícula	11
Tabla 5-1:	Capas u horizontes del suelo	12
Tabla 6-1:	Principales microorganismos útiles en la agroindustria de alimentos.....	15
Tabla 7-1:	Tipos de asociaciones entre microorganismos	17
Tabla 8-1:	Metodología de la tinción de Gram.....	26
Tabla 9-1:	Posibles resultados en la fermentación de azúcares	28
Tabla 1-2:	Resumen de identificación de variables	30
Tabla 2-2:	Operacionalización de variables.....	32
Tabla 3-2:	Matriz de Consistencia.....	36
Tabla 4-2:	Formulación del Agar YPD	51
Tabla 5-2:	Preparación de fermentación de azúcares	64
Tabla 6-2:	Preparación del caldo YPD	64
Tabla 7-2:	Preparación de resistencia al alcohol	66
Tabla 8-2:	Componentes fermentación de levaduras.....	68
Tabla 9-2:	Material bacterias fermentativas	70
Tabla 1-3:	pH de las muestras de suelo del bosque primario	80
Tabla 2-3:	Acidez activa del suelo del bosque primario.....	81
Tabla 3-3:	Cálculo de materia orgánica en el suelo en gramos	82
Tabla 4-3:	Cantidad de materia orgánica en el suelo en porcentaje	83
Tabla 5-3:	Cantidad de nitrógeno (N), en las muestras de suelo	84
Tabla 6-3:	Cantidad de Potasio (K) en las muestras de suelo.....	85
Tabla 7-3:	Unidad formadora de colonia de la muestra 001.....	86
Tabla 8-3:	Unidad formadora de colonia de la muestra 002.....	87
Tabla 9-3:	Unidad formadora de colonia de la muestra 003.....	87
Tabla 10-3:	Unidad formadora de colonia de la muestra 006.....	88
Tabla 11-3:	Unidad formadora de colonia de la muestra 007.....	89
Tabla 12-3:	Unidad formadora de colonia de la muestra 009.....	89
Tabla 13-3:	Unidad formadora de colonia de la muestra 011.....	90
Tabla 14-3:	Unidad formadora de colonia de la muestra 012.....	90
Tabla 15-3:	Características de las especies de bacterias lácticas aisladas	91

Tabla 16-3:	Características de las especies de levaduras aisladas	92
Tabla 17-3:	Características de las especies de las bacterias fermentativas.....	92
Tabla 18-3:	Nombres equivalentes utilizados en el laboratorio y en los resultados	94
Tabla 19-3:	Prueba bioquímica de Catalasa	94
Tabla 20-3:	Prueba bioquímica de Oxidasa.....	95
Tabla 21-3:	Prueba bioquímica de Tinción Gram	95
Tabla 22-3:	Prueba bioquímica de KOH	96
Tabla 23-3:	Prueba bioquímica de Movilidad	96
Tabla 24-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Lactosa)	97
Tabla 25-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Fructuosa).....	97
Tabla 26-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Manitol).....	97
Tabla 27-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Glucosa).....	97
Tabla 28-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Galactosa).....	97
Tabla 29-3:	Prueba bioquímica de Catalasa	98
Tabla 30-3:	Prueba bioquímica de Oxidasa.....	99
Tabla 31-3:	Prueba bioquímica de Tinción Wright	99
Tabla 32-3:	Prueba bioquímica de resistencia a alcohol OH.....	100
Tabla 33-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Lactosa)	101
Tabla 34-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Fructuosa).....	101
Tabla 35-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Manitol).....	101
Tabla 36-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Glucosa).....	101
Tabla 37-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Galactosa).....	102
Tabla 38-3:	Prueba de producción de Gas	102
Tabla 39-3:	Prueba de producción ácido sulfhídrico	103
Tabla 40-3:	Prueba bioquímica de Catalasa	103
Tabla 41-3:	Pruebas bioquímicas de Oxidasa.....	104
Tabla 42-3:	Prueba bioquímica de Tinción Gram	104
Tabla 43-3:	Pruebas bioquímicas de resistencia a alcohol	105
Tabla 44-3:	Prueba bioquímica de Movilidad	105
Tabla 45-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Lactosa)	105
Tabla 46-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Fructuosa).....	106
Tabla 47-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (manitol)	106
Tabla 48-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Glucosa).....	106
Tabla 49-3:	Prueba de fermentación de Azúcares (Galactosa).....	106
Tabla 50-3:	Prueba de producción de Gas.....	107
Tabla 51-3:	Producción de ácido sulfhídrico.....	107

Tabla 52-3:	Vista macroscópica muestra H.....	108
Tabla 53-3:	Vista macroscópica muestra I.....	108
Tabla 54-3:	Vista macroscópica muestra J.....	109
Tabla 55-3:	Vista macroscópica muestra K.....	109
Tabla 56-3:	Vista macroscópica muestra L.....	110
Tabla 57-3:	Vista macroscópica muestra AL.....	110
Tabla 58-3:	Vista macroscópica muestra BL.....	110
Tabla 59-3:	Vista macroscópica muestra CL.....	111
Tabla 60-3:	Vista macroscópica muestra DL.....	111
Tabla 61-3:	Vista macroscópica muestra EL.....	112
Tabla 62-3:	Vista macroscópica muestra FL.....	112
Tabla 63-3:	Vista macroscópica muestra GL.....	112
Tabla 64-3:	Vista macroscópica muestra HL.....	113
Tabla 65-3:	Vista macroscópica muestra IF.....	113
Tabla 66-3:	Vista macroscópica muestra JF.....	113
Tabla 67-3:	Vista macroscópica muestra KF.....	114
Tabla 68-3:	Vista macroscópica muestra LF.....	114
Tabla 69-3:	Vista macroscópica muestra MF.....	114
Tabla 70-3:	Vista macroscópica muestra NF.....	115
Tabla 71-3:	Vista macroscópica muestra OF.....	115
Tabla 72-3:	Vista macroscópica muestra PF.....	115
Tabla 73-3:	Vista microscópica muestra H.....	116
Tabla 74-3:	Vista microscópica muestra I.....	116
Tabla 75-3:	Vista microscópica muestra J.....	116
Tabla 76-3:	Vista microscópica muestra K.....	117
Tabla 77-3:	Vista microscópica muestra L.....	117
Tabla 78-3:	Vista microscópica muestra AL.....	118
Tabla 79-3:	Vista microscópica muestra BL.....	118
Tabla 80-3:	Vista microscópica muestra CL.....	118
Tabla 81-3:	Vista microscópica muestra DL.....	119
Tabla 82-3:	Vista microscópica muestra EL.....	119
Tabla 83-3:	Vista microscópica muestra FL.....	120
Tabla 84-3:	Vista microscópica muestra GL.....	120
Tabla 85-3:	Vista microscópica muestra HL.....	120
Tabla 86-3:	Vista microscópica muestra IF.....	121
Tabla 87-3:	Vista microscópica muestra JF.....	121

Tabla 88-3:	Vista microscópica muestra KF	121
Tabla 89-3:	Vista microscópica muestra LF.....	122
Tabla 90-3:	Vista microscópica muestra MF.....	122
Tabla 91-3:	Vista microscópica muestra NF.....	122
Tabla 92-3:	Vista microscópica muestra OF.....	123
Tabla 93-3:	Vista microscópica muestra PF	123
Tabla 94-3:	Muestra 007C1´ la de mejor resistencia	124
Tabla 95-3:	Muestra 001C1	124
Tabla 96-3:	Muestra 001C2 la de mayor fermentación	125
Tabla 97-3:	Análisis estadístico de las levaduras.....	125
Tabla 98-3:	Tabla de hipótesis de levaduras	125
Tabla 99-3:	Análisis Estadístico de las bacterias fermentativas	126
Tabla 100-3:	Tabla de hipótesis de las bacterias fermentativas	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Preparación de soluciones previo para la siembra.....	6
Figura 2-1.	Tipo de bosque por zona ecológica mundial	9
Figura 3-1.	Relación de los constituyentes de la tierra según su textura.....	11
Figura 4-1.	Distribución de la flora y fauna en la rizósfera	12
Figura 5-1.	Principales usos de los microorganismos en la agroindustria	14
Figura 6-1.	Preparación de disoluciones para una siembra	21
Figura 7-1.	Curva de crecimiento de los microorganismos	22
Figura 8-1.	Clasificación de métodos de identificación Bacteriana.....	24
Figura 9-1.	Factores a tomar en cuenta desde el punto de vista bioquímico.....	24
Figura 1-2.	Sitio de muestreo.....	39
Figura 2-2.	Mapa de ecosistemas (provincia de Chimborazo).....	41
Figura 3-2.	Zona A, sitio de muestreo.....	42
Figura 4-2.	Zona en amarillo, área de muestreo.....	42
Figura 5-2.	Área de muestreo, zonas bosque primario.....	43
Figura 6-2.	Localización de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo	44
Figura 7-2.	Aislamiento mediante siembra por estrías.....	60
Figura 8-2.	Página de identificación bioquímica	73
Figura 9-2.	Elección del tipo de microorganismo a investigar.....	73
Figura 10-2.	Elección de las pruebas bioquímicas.....	74
Figura 11-2.	Aproximación de microorganismo estudiado.....	75
Figura 1-3.	pH de las muestras de suelo de bosque primario.....	81
Figura 2-3.	Acidez Activa del suelo de bosque primario	82
Figura 3-3.	Materia orgánica en las muestras de suelo del bosque primario de Cañi	83
Figura 4-3.	Porcentaje de nitrógeno total	84
Figura 5-3.	Nitrógeno Asimilable vs Nitrógeno Total	85
Figura 6-3.	Cantidad de potasio (K) en el bosque primario	86

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: SITIO DE MUESTREO DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO

ANEXO B: ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES DEL SUELO

ANEXO C: SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

ANEXO D: AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

ANEXO E: AISLAMIENTO DE LEVADURAS

ANEXO F: AISLAMIENTO DE BACTERIAS FERMENTATIVAS

ANEXO G: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LOS MICROORGANISMOS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BAA: Bacterias ácido acéticas

BAL: Bacterias ácido lácticas

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura

mL: Mililitro

MRS: Man, Rogose and Sharpe

msnm: Metros sobre el nivel del mar

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)

PDA: Agar papa dextrosa (Potato Dextrose Agar)

ppm: partes por millón

YPD: Agar de levadura peptona y dextrosa (Yeast extract Peptone Dextrose)

UFC: Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue aislar e identificar microorganismos con interés agroindustrial enfocándose en las familias microbiológicas de *lactobacillus*, *saccharomyces*, y *acetobacter* a partir de muestras de suelo de un bosque primario, se utilizó un medio de cultivo selectivo para los tres tipos de microorganismo para purificar a las especies de interés, se obtuvo las unidades formadoras de colonias (UFC) y se sembró por vertido en placa, después una resiembra por estriado, seguido de un aislamiento morfológico ayudado por el microscopio, además se agregó inhibidores de crecimiento para los microorganismos oportunistas, el pH del medio de cultivo fue entre 4,8 y 5,5 en ausencia de oxígeno para el caso de las bacterias ácido lácticas; por otra parte, a las levaduras se las sembró en un pH neutro con abundante fuente de glucosa en ausencia de oxígeno y se comprobó su desarrollo por la fermentación cuando se inoculó en jugo de cítricos, en donde también se liberó dióxido de carbono (CO₂), así también a las bacterias acéticas se las sembró en un medio selectivo con abundante fuente de glucosa con un pH de 7 y en presencia de oxígeno, luego se sometió a una fermentación de jugo de cítricos y se hizo una prueba de liberación de ácido sulfhídrico (H₂S). Para el análisis estadístico se hizo un test T-Student para los valores de pH al inicio y al final del proceso de fermentación, para las levaduras y bacterias acéticas con valores de 12,39 y 7,48 respectivamente, que fueron mayores a 1,76; con lo que se concluyó que los resultados fueron positivos, los cuales fueron evaluados mediante pruebas bioquímicas en donde se presenció liberación de CO₂ en los tres casos y etanol en las levaduras, se recomienda que se utilicen reactivos y equipos de buena calidad.

Palabras clave: <AGROINDUSTRIAS>, <AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS>, <BOSQUE PRIMARIO>, <INHIBIDORES DE CRECIMIENTO>, < UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS UFC>, <PARÁMETROS DE AISLAMIENTO>, <BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS>, <ÁCIDO SULFHÍDRICO H₂S>, <DIÓXIDO DE CARBONO CO₂>.

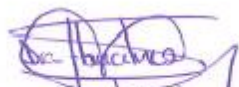


[Handwritten signature]
01/12/2022
2276-DBRA-UPT-2022

ABSTRACT

The objective of this research is to isolate and identify microorganisms with agro-industrial interest focusing on the microbiological families of lactobacillus, saccharomyces, and acetobacter from soil samples of a primary forest. A selective culture medium for the three types of microorganisms was used to purify the species of interest. Colony forming units (CFU) were obtained, seeded by pour plate, then reseeded by streaking, followed by morphological isolation aided by microscopy. In addition, growth inhibitors were added for opportunistic microorganisms. The pH of the culture medium was between 4.8 and 5.5 in the absence of oxygen for lactic acid bacteria; On the other hand, yeasts were grown in a neutral pH with an abundant source of glucose in the absence of oxygen and their development was verified by fermentation when inoculated in citrus juice, where carbon dioxide (CO₂) was also released, acetic acid bacteria were also seeded in a selective medium with an abundant source of glucose with a pH of 7 and in the presence of oxygen, then subjected to a citrus juice fermentation and tested for the release of hydrogen sulfide (H₂S). For the statistical analysis, a T-Student test was performed for the pH values at the beginning and at the end of the fermentation process, for yeasts and acetic bacteria with values of 12.39 and 7.48 respectively, which were greater than 1.76. It is concluded that the results were positive; they were evaluated by biochemical tests where CO₂ release was observed in the three cases and ethanol in the yeasts. It is recommended that good quality reagents and equipment be used.

Key words: <AGROINDUSTRIES>, <ISOLATION OF MICROORGANISMS>, <PRIMARY FOREST>, <GROWTH INHIBITORS>, <COLONY FORMING UNITS (CFU)>, <ISOLATION PARAMETERS>, <ACID LACTIC ACID BACTERIA>, <CO₂ CARBON DIOXIDE>.


Nancy Margarita Inca Chumata
C.I. 0602926719

INTRODUCCIÓN

Identificación del Problema

Los bosques primarios según el Convenio sobre la diversidad Biológica desarrollado y acordado por la FAO y en sus informes señalado según Mackey y otros (2020 pág. 7) que: “Un bosque primario es un bosque que nunca ha sido talado y se ha desarrollado siguiendo perturbaciones naturales y bajo procesos naturales, independientemente de su edad[...]” y además excluye a las perturbaciones que son provocadas por las actividades humanas directas como pueden ser el aprovechamiento de los recursos de flora y fauna o los recursos naturales los cuales modificarlos para el uso o consumo humano. Pero hay que hacer una aclaración que los bosques, que son habitados con estilos de vida tradicionales por comunidades indígenas en zonas alejadas a maneras de tribus o pequeñas comunidades (contactadas o no contactadas), aborígenes; los cuales son utilizados, visitados o explotados sin consecuencias o impactos aparentemente negativos ni generando grandes transformaciones en sus herramientas o estilos de vida también son considerados bosques primarios (MACKEY, y otros, 2020 pág. 7)

La biodiversidad que se encuentra en los bosques primarios es muy rica tanto en especies animales como en especies vegetales y ni hablar de las especies microbianas existentes es por esto que es un ecosistema considerado como uno de los más importante y la vez frágiles según la evaluación de los recursos forestales mundiales (FRA) dirigido por la (FAO) (2020 pág. 10) revela que los ecosistemas como los bosques primarios en la actualidad componen un 30,8% de la superficie terrestre. Pero de la misma manera que más de la mitad de este porcentaje global se hallan distribuidos en cinco países: Rusia, Brasil, Estados Unidos y China y además dos tercios de las tierras que pertenecen a los bosques primarios es decir aproximadamente un 66% le pertenecen a tan sólo 10 países por lo que se puede ver una disparidad en lo que se refiere la distribución de áreas destinadas a salvaguardar la flora y fauna y por consiguiente a la microflora que se encuentran en los suelos primarios (FAO, 2020).

En los suelos primarios al igual que en otros tipos de suelos los microorganismos que habitan en el suelo son de mucha importancia especialmente cuando se cuenta con mucha disponibilidad de nutrientes inorgánicos los cuales son la principal fuente de energía de los microorganismos como las bacterias fijadoras de nitrógeno y también de hongos los cuales son unos buenos descomponedores y utilizan la materia orgánica como principal fuente de energía.

Justificación de la Investigación

La falta de acceso a nuevas tecnologías y métodos de producción de alimentos para poder satisfacer la demanda alimentaria de la población debido a la escasez de recursos económicos de manera especial en las zonas rurales del centro del país de forma especial la provincia de Chimborazo donde la pobreza es muy alta y en la cual la extrema pobreza llega al 18,7% es decir que sobreviven con menos de 47,80 USD al mes (LOMBEIDA, 2020) esto hace que sea importante la búsqueda de nuevas maneras de elaboración de alimentos que sean accesibles al bolsillo de los lugares más desfavorecidos.

Cabe recalcar que el país gracias a que posee diversos climas y también una de las mayores biodiversidades a nivel mundial hace que también exista un sinnúmero de especies microbiológicas beneficiosas las cuales pueden servir para la producción agroindustrial y así ayudar a las poblaciones rurales a mejorar la calidad de vida que ellos requieren gracias a esta iniciativa algo para recalcar es que los pisos climáticos del país poseen mucha riqueza en cuanto se refiere a bacterias levaduras hongos etc, en las zonas rurales es muy común ver zonas en donde no ha intervenido de manera significativa la mano del hombre por lo que es el lugar idóneo en donde se puede hallar alguna variedad microbiológica beneficiosa para las personas de estas zonas poco favorecidas por las actuales tecnología.

Cañi es una parroquia a 1 hora de la ciudad de Riobamba en un bosque primario y cual en donde se puede realizar la investigación pues esta área no ha sido intervenida por el ser humano y aquí es en donde radica la parte importante de la investigación pues con la recolección de muestras de suelos que no han sido intervenidas por el hombre serán utilizadas en el laboratorio de Ciencias Biológicas mediante disoluciones y posterior siembras en diferentes agares nutritivos dependiendo de la necesidad de los microorganismos a su vez que mirando su viabilidad mediante las pruebas bioquímicas y posterior conservación.

El presente trabajo de investigación es parte del proyecto denominado “AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS AGROINDUSTRIAL A PARTIR DE SUELOS DE BOSQUES PRIMARIOS DE LA ZONA 3” el cual es realizado por el grupo de investigación SEALPRA de la Facultad de Ciencias Pecuarias con lo cual por experiencias de anteriores investigaciones en dicho grupo se sabe que es muy probable que existan microorganismos benéficos para uso agroindustrial.

Mediante la realización del trabajo de campo y la experimentación en laboratorio y de obtener resultados positivos esto haría que se obtenga nuevas especies de microorganismos con potencial agroindustrial y ayudar a las poblaciones rurales a mejorar la calidad de vida con la alternativa de que ellos puedan elaborar productos como quesos, yogurt, pan, cerveza, vino o vinagre de su propia mano con un coste menor, además de que estos alimentos son ricos en nutrientes como

vitaminas y minerales además de que son especies autóctonas de la zona y de fácil acceso al contrario de los reactivos y sustratos biológicos que se ocupan tradicionalmente para dichos alimentos que ellos elaboran, gracias a esta iniciativa algo para recalcar es que los pisos climáticos del país poseen mucha riqueza en cuanto se refiere a bacterias levaduras hongos etc, Es probable hallar nuevas especies ya que este es el nicho de muchas especies microbiológicas con lo cual sus resultados pueden darse a conocer a las poblaciones cercanas dentro del Cantón Colta, dentro y fuera de la Provincia de Chimborazo, también como ya se sabe es necesario estudiar nuevas alternativas debido a la crisis sanitaria que se atraviesa debido al confinamiento provocado por la pandemia ha hecho que este trabajo sea relevante para estudiarlo pues los sectores más golpeados en las crisis siempre son los más humildes y se ha visto que existen muchas complicaciones médicas para los pacientes que se contagian con el Covid19, cuando estos poseen un sistema inmune muy débil y la alimentación es un factor muy importante para la buena salud y una buena respuesta inmunológica ante enfermedades o agentes nocivos para el ser humano

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Aislar e identificar microorganismos con interés agroindustrial a partir de muestras de suelo de bosques primarios del cantón Colta

Objetivos Específicos

- Realizar el análisis de caracterización físico químico en muestras de suelos provenientes de bosques primarios
- Aislar microorganismos a partir de las muestras de suelo obtenidas de bosques primarios para evaluar su potencial agroindustrial
- Caracterizar los microorganismos aislados tanto en forma de cepas individuales como en consorcios
- Proyectar el uso potencial de estos microorganismos en la industria

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

Antecedentes de la investigación

Con las investigaciones que estudian los microorganismos del suelo una gran parte busca poder identificar y aislar microorganismos que sean útiles para el óptimo desarrollo de las plantas o de mejorar la calidad microbiana del suelo, pero también se estudian los suelos para poder obtener especies microbianas que ayuden a la elaboración de productos de usos agroindustriales.

De manera muy especial en el campo alimenticio en donde se ve que este va en aumento debido al crecimiento poblacional en el país que rondó el 1,539% para el año 2020 manifiesta (BANCO MUNDIAL, 2021) también otra preocupación es que como es sabido que en la provincia de Chimborazo existe mucha pobreza por encima del 46,8% (CABRERA, y otros, 2016) antes de la pandemia y a nivel nacional luego de la pandemia se situó alrededor del 32,2% al mes de Junio del 2021 como expresa (INEC, 2021)

Dados esos porcentajes se puede decir también que al igual que en el resto del mundo el país también presentaría un aumento en el consumo de recursos especialmente al obtenerlos de la naturaleza es decir explotando recursos naturales de los bosques primarios con lo que la investigación ayudaría a que se dé a conocer que se podría aprovechar los microorganismos propios de la zona a estudiar para elaborar productos alimenticios con un menor coste y de fácil acceso para utilizarlos es así como otras investigaciones como la de (MIRANDA-FREIRE, 2015).

En dicha investigación se puede ver que para el muestreo se lo realiza de forma sistemática en forma de zigzag y de la misma forma a una profundidad de 10 cm con una palilla o palín previamente lavado y desinfectado, lo mismo se vuelve a repetir para las otras muestras se realiza una desinfección de los instrumentos que se ocupa lo cual se busca que esta muestra no se contamine luego de esto se la guarda en una funda tipo ziploc y se las guarda en una hielera y se las etiqueta o se las rotula y se las lleva hacia el lugar en donde se van a hacer las pruebas de laboratorio.

Por otra parte cabe mencionar que luego de la recolección de las muestras de suelo hay que conservarlas rápidamente a la temperatura a la cual estese en el ambiente por lo que es recomendable utilizar una hielera para que se evite el cambio brusco de temperatura ya que esto afecta de manera considerable a los microorganismos especialmente a lo que se refiere a pérdida de carbono mediante la respiración celular, además de que esto puede también afectar el desarrollo microbiano dichas muestras no deben exceder de 12 días desde el campo como señala (YVES, y otros, 2020)

El estudio del suelo es una parte importante pues con esta se logra conocer los componentes de los elementos químicos que posee dicho suelo ya que estos son la fuente de obtención de energía de las plantas, hongos, bacterias, algas, etcétera ya que estos son organismos autótrofos y son la base de la vida en la tierra. Sabiendo los componentes del suelo a nivel químico se puede modificarlo hacerlo óptimo según nuestras necesidades y así obtener una mejor materia prima como son frutas, tallos, hojas, raíces o alcanzar nuestro objetivo según nuestros requerimientos. Para una correcta evaluación de los componentes del suelo especialmente en trabajos de investigación (THURSTON CONSERVATION DISTRICT, 2019) da a conocer que los estudios de laboratorio para saber los niveles de cada nutriente es sumamente importante pues cada microorganismo así como planta tienen necesidades diferentes para un eficiente desarrollo de estos, de esta manera (THURSTON CONSERVATION DISTRICT, 2019) da énfasis en dos estudios diferentes de suelos a nivel de verificar dicho nivel de nutrientes: prueba básica de suelo y la prueba completa de suelo.

Tabla 1-1: Principales nutrientes de estudio del suelo

Estudio de los nutrientes del suelo	
Prueba básica de Suelo	Prueba Completa de Suelo
Materia orgánica	Materia orgánica
Nitrógeno (N)	Nitrógeno (N)
Fósforo (P)	Fósforo (P)
Potasio (K)	Potasio (K)
Calcio (Ca)	Calcio (Ca)
Magnesio (Mg)	Magnesio (Mg)
pH	pH
Azufre (S)	Azufre (S)
	Zinc (Zn)
	Manganeso (Mn)
	Cobre (Cu)
	Hierro (Fe)
	Boro (B)
	Sodio (Na)
	Sales solubles

Fuente: (THURSTON CONSERVATION DISTRICT, 2019)

Realizado por: Orellana A. (2022)

De acuerdo con (ALVAREZ, y otros, 2018) en su investigación expresa que tiene que realizar una muestra madre para a partir de esta se realiza las distintas soluciones en las cuales la muestra de suelos seleccionada se la diluye con agua esterilizada conjuntamente con los materiales y herramientas a utilizar en la parte práctica la esterilización se la realizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y dicha agua debe estar libre de componentes como químicos así mismo que tiene esta

que tener un pH neutro es decir de 7 y antes de realizar, también la temperatura de incubación es importante de unos 32°C.

En los trabajos cuando se trabaja con microorganismo (UDELAR, 2018) declara que en sus trabajos de investigación realizados en la Universidad de la República Uruguay como también en los trabajos de pregrado para ensayos y prácticas de laboratorio se usó en su mayoría disoluciones a partir de una muestra madre en las cuales a partir de la preparación de la muestra madre se la va diluyendo poco a poco con la transferencia de 1mL de la solución madre a un tubo de ensayo de agua esterilizada con pH de 7 y libre agentes químicos que tiene 9mL de agua destilada como se observa en la imagen.

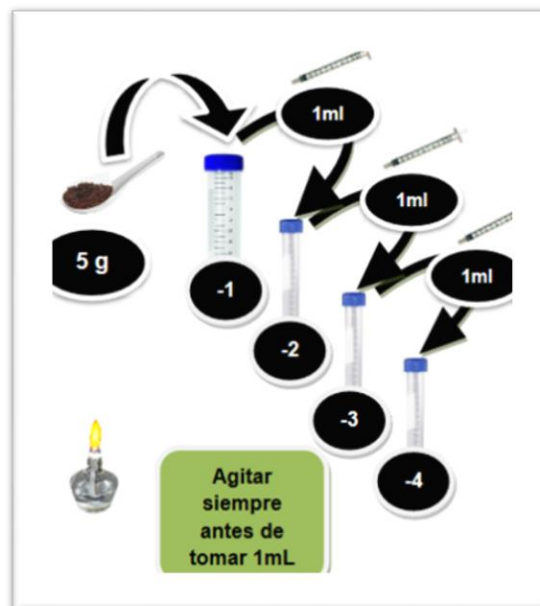


Figura 1-1. Preparación de soluciones previo para la siembra

Fuente: (UDELAR, 2018)

Además de lo que se mencionó anteriormente se realizó homogenizaciones de las muestras en todos los procedimientos en el caso de suelos una homogenización con la retirada de partículas grandes sólidas y material vegetal como raíces y luego se realizó una homogenización de las muestras en agua con la ayuda de un agitador, para preparar disoluciones y que a medida que se fue diluyendo las muestras se lo hace para poder realizar una mejor siembra con el fin de realizar un mejor aislamiento de los microorganismos del suelo o de aguas que se analizaron en las investigaciones de organismo benéficos del suelo.

Como lo hace notar (MÜHLHAUSER, y otros, 2016) dependiendo de los microorganismos que se quiera aislar o identificar tanto en los laboratorio clínicos como en los laboratorios de investigación, se utilizó distintos tipos de medios de cultivos artificiales los cuales en la actualidad

tiene mucha variedad los cuales son los medios solidos o salificados como los agares, medios líquidos como los caldos nutritivos, o también los medios diferenciales, enriquecidos, especializados y selectivos.

En lo que se refiere a las siembras o de la inoculación para un óptimo aislamiento, se vio que en investigaciones pasadas se hablado de algunos tipos de siembra para que a partir de ahí se pueda aislar los diferentes microorganismos de interés, a continuación, se detalla algunos tipos de siembra según (MORENO LÓPEZ, y otros, 2016) la cual nos da a conocer que entre los métodos de aislamiento más utilizados están

Tabla 2-1: Métodos más utilizados para el aislamiento de microorganismo

Tipo de Siembra	Método de acción	Técnica
Diluciones seriadas	Dilución continua de inóculo	Se realiza diluciones graduales de una muestra para sembrar la menor cantidad de colonias
Diseminación de superficies	Extensión múltiple del Inóculo	Se lo hace con una espátula que se la extiende rotando algunas veces en el medio de cultivo
Agotamiento por estrías	Agotamiento progresivo y continuo del inóculo	Se la hace con varios estriados con la ayuda de un haza u otro parecido sobre la superficie la cual se va rayando progresivamente a partir del rayado anterior

Fuente: (MORENO LÓPEZ, y otros, 2016)

Realizado por: Orellana A. (2022)

En la presente investigación se utilizó el método de dilución seriadas pues al ser una muestra de suelo es mucho más conveniente debido a la presencia de muchos microorganismos como lo indican anteriores investigaciones.

Para lo que es el aislamiento se lo realiza en base a la forma, color, estructura, consistencia de las colonias y este procedimiento es repetido de 3 a 5 veces con lo cual el fin de esto es realizar unas réplicas de cada tipo según lo ya mencionado para esto también se los va a sembrar en diferentes tipos de agar entre ellos PDA, MRS, Nutriente, Mc Conkey para ello se lo hace con materiales como: Puntas, Mechero, Micro pipeta, Tubos de Ensayo, Caldos o Nutritivos, Incubadora, luego de obtener los diferentes tipos de colonias se procederá a realizar algunos tipos de pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa citrato), a los microorganismos y a al suelo en cambio pruebas químicas (pH, Acidez, Materia Orgánica) y físicas (Color, Olor) tal como lo dice la investigación de (MIRANDA-FREIRE, 2015).

En el proceso de conservación (GATO CÁRDENAS, 2017) manifiesta que existen factores que se tuvieron en cuenta en su investigación para poder ver la viabilidad de la conservación de los microorganismos como son:

- La temperatura del almacenamiento
- Uso de los agentes crio protectores
- Edad o tiempo de vida de las células
- Velocidad de la congelación y descongelación

Muchas veces la temperatura que se podría utilizar para una conservación puede ser en temperaturas de (-20°C) a (-70°C) pero esta afectará el tiempo de conservación de las especies bacterianas o fúngicas, pero no es muy recomendable si lo que se quiere es conservar a largo plazo. Pero además el agente que protege de las bajas temperaturas es muy importante como señala (GATO CÁRDENAS, 2017) los cuales están:

Tabla 3-1: Principales agentes criaron protectores

Crio protector	Fórmula
Dimetilsulfóxido (DMSO)	CH ₃ SOCH ₃
Glicerol (Glicerina)	C ₃ H ₈ O ₃
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆
Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆
Leche descremada	
Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁

Fuente: (GATO CÁRDENAS, 2017)

Realizado por: Orellana A. (2022)

Para una conservación a largo plazo (GATO CÁRDENAS, 2017) utilizó nitrógeno líquido pero para el caso de microorganismos de la familia fúngica se recomienda nitrógeno en forma de vapor ya que esta alcanza una mayor temperatura (-196°C), en relación al que está en fase líquida que llega a -140°C pero de no ser posible se utiliza con la se tenga más disponibilidad cuando se utilizó este método de conservación se pudo ver que si existe viabilidad además de que esta conservación favorece su estabilidad genética y viabilidad por periodos prolongados por encima de los treinta años.

Teniendo en cuenta a (ACOSTA, 2019 pág. 11) nos indica que la supervivencia de los microorganismos por congelación o en caso específico crio congelación puede ser positiva aplicando unas bajas temperaturas las cuales pueden ser alcanzadas con la utilización de nitrógeno líquido con temperaturas de (-150° a -180°C) o de nitrógeno en fase o forma de vapor (-196°C). Dichas temperaturas usadas logran un prolongado almacenamiento a lo largo del tiempo en las

cuales se pueden recuperar con un rango de 90 a 100% de supervivencia de los microorganismos, esto dependerá también de los periodos de congelación y descongelación.

1.1. Marco conceptual o glosario

1.1.1. Bosques Primarios

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación) considera que los bosques primarios son áreas forestales en la cual existe formas de vida que poseen funciones ecológicas. La diversidad biológica forestal no solo engloba los árboles, sino también la multitud de plantas, animales y microorganismos que habitan en las zonas forestales y la diversidad genética asociada a estos además de ello se reconoce que “La diversidad biológica de los bosques es el resultado de procesos evolutivos de miles e incluso millones de años que, en sí mismos, están impulsados por fuerzas ecológicas como el clima, el fuego, la competencia y las perturbaciones” (FAO, 2020 pág. 15)

Los bosques primarios ocupan un 30,8% de la superficie del mundo ocupando una superficie forestal de una cantidad de 4060 millones de hectáreas, y cabe señalar que según en el Ecuador existe mucha riqueza que corresponde a flora y fauna y esto se debe a que se halla en la zona tropical del planeta por donde pasa la línea equinoccial que beneficia para la abundancia de bosques dentro del todo el territorio nacional la pluviselvas tropicales conjuntamente con bosques húmedo tropical y sistema montañoso tropical son los tipos de bosques que más proliferan en el país como lo hace notar (FAO, 2020 pág. 19).

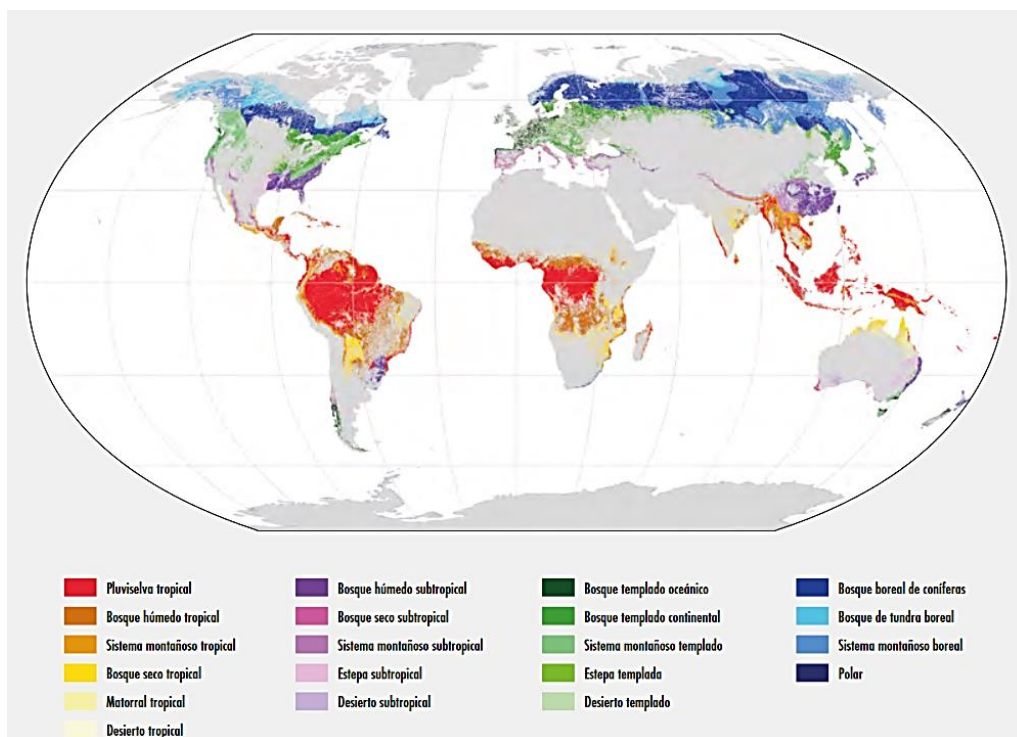


Figura 2-1. Tipo de bosque por zona ecológica mundial

Fuente: (FAO, 2020)

En el Ecuador la actual Constitución de la República protege los a los bosques primarios mediante los Derechos de la Naturaleza como lo indica en su artículo 71, también se habla de la imprescriptibilidad de las acciones legales por daños ambientales y la responsabilidad objetiva, en el artículo 396 además de que se habla del derecho de la población a vivir en un medio ambiente sano y ecológicamente equilibrado en su artículo 14 a juicio de (CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR, 2008)

1.1.2. *Suelo*

Desde el punto de vista de la (FAO (PORTAL DE SUELOS), 2021) los suelos son el hábitat de una inmensidad de microorganismos que son piezas fundamentales para los ecosistemas, ya que son agentes primarios para que se facilite el ciclo de los nutrientes en el suelo, almacenamiento del carbono en el suelo con las emisiones gases de efecto invernaderos con la regulación dinámica en su interior de la materia orgánica, aumentando la cantidad y disponibilidad de nutrientes para la vegetación y una buena salud de la planta cambiando la estructura física del suelo y el almacenamiento de agua, así como la existencia de una alta biodiversidad como lo describe (MONTANARELLA, y otros, 2016) que 10g de suelo posee un aproximado de 10^{10} bacterias en forma de unidades celulares que pertenecen a 10^6 tipos de especies distintas

1.1.2.1. Tipos de suelo según su textura

La textura del suelo se da por el tamaño de partícula del material que se agrupa en una determinada cantidad de volumen de suelo en la cual dependiendo del tamaño existen tres tipos: limo, arcilla, arena (VARGAS, y otros, 2009).

Tabla 4-1: Tipos de tamaño de partícula

Tamaño de partícula	Nombre
2000 μm	Arena muy gruesa
1250 μm	Arena gruesa
630 μm	Arena media
200 μm	Arena fina
125 μm	Arena muy fina
63 μm	Limo grueso
20 μm	Limo fino
$\leq 2 \mu\text{m}$	Arcilla

Fuente: (VARGAS, y otros, 2009 pág. 28)

Realizado por: Orellana A. (2022)

También existe una relación en base a los porcentajes de composición del tipo de suelo que contengan dicho material pétreo que vamos a estudiar.

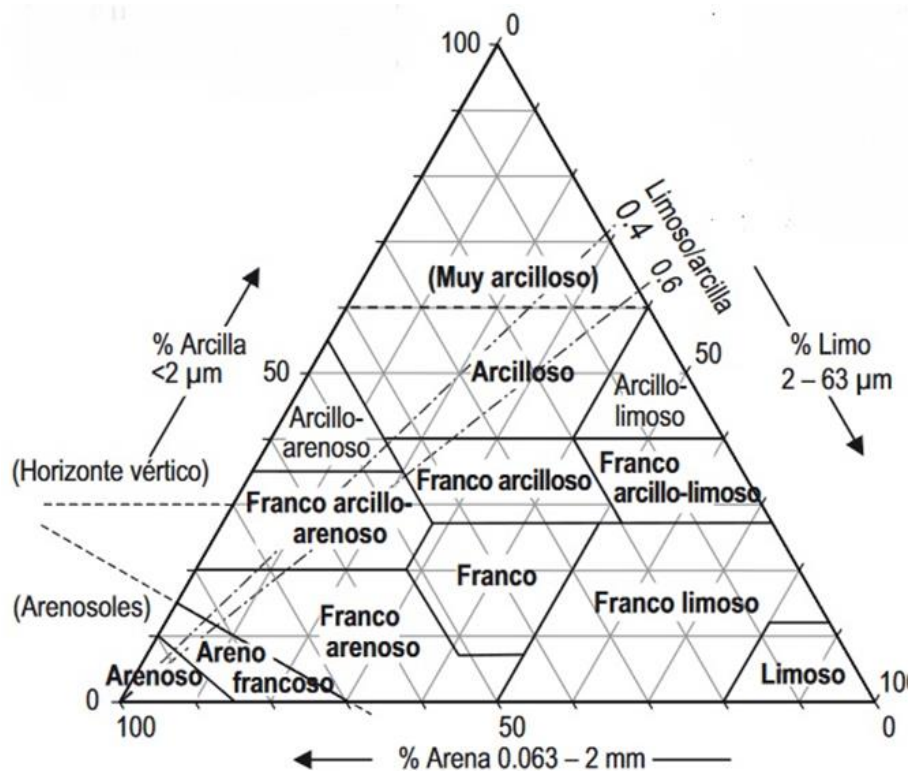


Figura 3-1. Relación de los constituyentes de la tierra según su textura

Fuente: (VARGAS, y otros, 2009 pág. 28)

1.1.2.2. Tipos de suelo según sus capas de suelo u horizontes

En esta clasificación su estudio se lo hace en base a capas o estratos los cuales se ven representados por las letras en mayúsculas (H, O, A, E, B, C, R, I, L, W) estos son los principales, pero también existen otros como lo señala (VARGAS, y otros, 2009).

Tabla 5-1: Capas u horizontes del suelo

Nombre del Horizonte	Descripción
H	capas dominadas por material orgánico formado a partir de acumulaciones de material orgánico no descompuesto o parcialmente descompuesto
O	Capas dominadas por material orgánico que consiste de desechos intactos y parcialmente descompuestos, no se encuentran saturados con agua por periodos prolongados
A	Estos son horizontes minerales que se formaron en la superficie del suelo o por debajo de un horizonte O, en el que toda o parte de la estructura de la roca original ha sido desintegrada
E	Son horizontes minerales donde el rasgo principal es la pérdida de arcilla silicatada, hierro, aluminio, o la combinación de estos, dejando una concentración de arena y partículas de limo, y en el que la mayor parte de la estructura rocosa original ha sido completamente desintegrada.
B	Son fueron originalmente horizontes sub-superficiales. Incluidos como horizontes B se encuentran las capas de concentración iluvial de carbonatos, yeso o sílice que son resultado de procesos pedogenéticos (estas capas o estratos pueden o no estar cementados).
C	Son horizontes o capas, excluyendo la roca madre dura, que han sido afectados por los procesos pedogenéticos de manera mínima y no poseen las propiedades de los horizontes H, O, A, E o B. La m
R	Estos consisten de lechos de roca dura que subyacen al suelo. Ejemplos son: granito, basalto, cuarcita y caliza endureada. Cualquier trozo de un estrato R que sea introducido en agua, nunca se saturara dentro de 24 horas.
I	Estos son cristales y cuñas de hielo que contienen al menos 75% de hielo (por volumen) y que separan distintivamente las capas orgánicas o minerales en el suelo, el hielo va y viene en suelos afectados por permafrost.
L	Estos son sedimentos depositados en cuerpos de agua (sub-acuoso) compuesto de materiales orgánicos e inorgánicos, también conocidos como material límnico.
W	Estas son capas de agua en los suelos o el agua sumergiendo suelos, ya sea permanente o cíclicamente dentro el periodo de tiempo de 24 horas, algunos suelos orgánicos flotan sobre el agua.

Fuente: (VARGAS, y otros, 2009 págs. 69-73)

Realizado por: Orellana A. (2022)

1.1.3. *Biología del Suelo*

La vida animal en la tierra se sustenta notablemente de las plantas ya que estas son la fuente de alimentación, fibra, medicina y oxígeno además que muchas de ellas son la residencia de dichos organismos, debido a que las plantas son autótrofos absorbiendo sus propios nutrientes directamente del suelo a través del sistema radicular y es justo que gracias a esto existe una interacción y relación bastante estrecha entre el suelo y la raíz, durante millones de años esta relación simbiótica ha hecho que hayan dos zonas muy diferenciadas denominadas rizósfera externa también llamada ectorrizósfera y una rizósfera interna también llamada endorizósfera citando a (VIJAY, y otros, 2017 pág. 5)

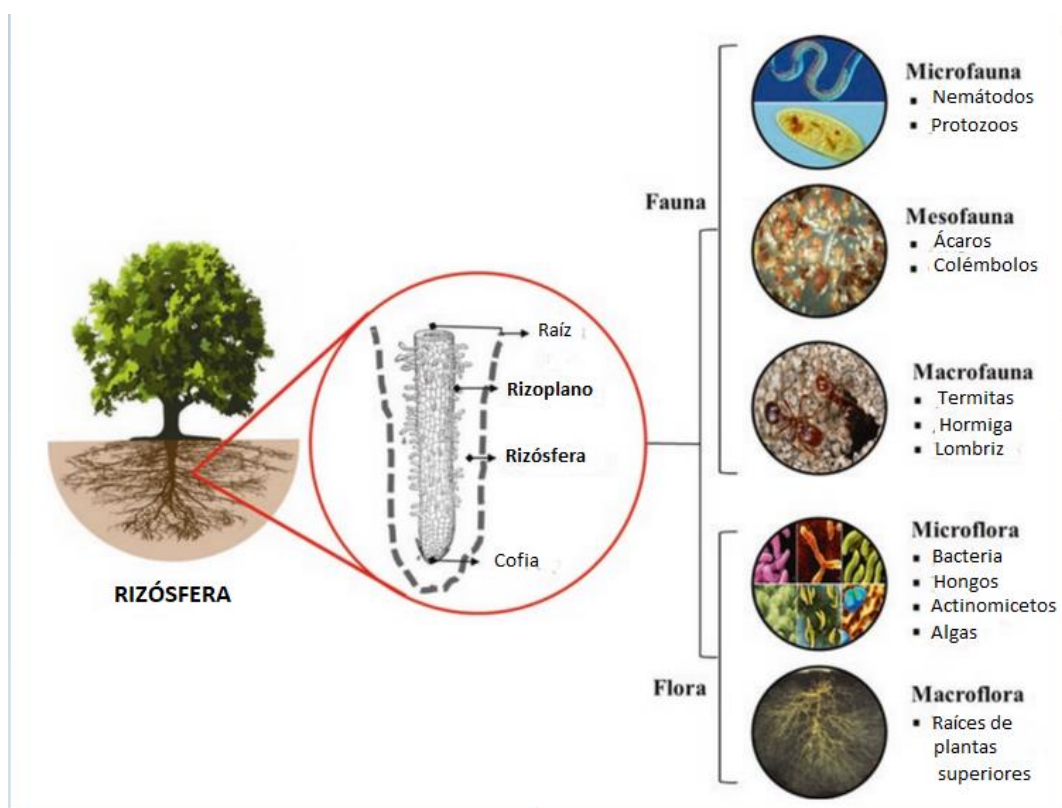


Figura 4-1. Distribución de la flora y fauna en la rizósfera

Fuente: (VIJAY, y otros, 2017 pág. 5)

Traducido por: Orellana A. (2022)

1.1.4. *Sector Agroindustrial*

La agroindustria se constituye como la rama que tiene por medio el estudio de la transformación de las materias primas agrícolas en productos con un valor añadido produciendo ingresos y oportunidades de empleo con lo que contribuye al desarrollo económico global en los países

desarrollados, así como también en los países en vías de desarrollo como lo señala la (FAO (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA), 2020). El sector agroindustrial es de mucha importancia para el mundo ya que través de sus actividad genera el desarrollo de cadenas de valor alimentarias sostenibles y sistemas de mercado inclusivos que busca promover oportunidades comerciales para las poblaciones rurales y urbanas fortaleciendo los mercados para mejorar los vínculos industriales y las transformaciones económicas como lo hace notar (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL DESARROLLO INDUSTRIAL, 2021) , es por ello que debido a la última pandemia registrada por el Covid-19 se vio que ha subido la cantidad de personas desnutridas debido al desabastecimiento.

El sector agroindustrial actualmente posee una gran relevancia en la sociedad pues se halla directamente relacionado con la obtención de nuevos productos y recursos además de la fuente de energía en forma de calorías de los animales y del ser humano y esto radica en los cambios presentes en su cadena de proceso que se inicia con la producción, la transformación y finalmente la distribución desde lo acuicultura lo pecuario y lo agrícola que se da entre los productores vendedores y el consumidor final esto ha hecho que exista una amalgama entre las organizaciones portadoras de las cadenas de valor agregado enfatiza (GOMEZ-RODRÍGUEZ, y otros, 2021 pág. 1707) Por esto destaca (GOMEZ-RODRÍGUEZ, y otros, 2021 pág. 1702) que la agroindustria concentra el poder mediante el apoyo gubernamental, mayor dominio de nuevas tecnologías la búsqueda incesante de reducción de costos y mayor producción, con lo que se ha logrado una mayor distribución de los procesos productivos que se han visto potenciados por los nuevos lineamientos como son: la Agroindustria 4.0, la Bioeconomía y la Biotecnología.

1.1.5. *Situación actual de la agroindustria nacional*

La producción de alimentos versus al crecimiento de la población y el índice de cosecha muestran una correlación escasa inversa frente al crecimiento de la población con un valor de 0,36 y 0,03 respectivamente, lo que hace notar que el Ecuador debe tomar ajustes o medidas para evitar la futura escasez de alimento, por lo que a pesar de que el índice de la producción de alimentos tuvo un crecimiento del 11% entre los años 2007 y 2016, se prevé que no es suficiente para satisfacer su demanda en las próximas décadas como expresa (MERCHAN, y otros, 2017)

1.1.6. *Microorganismos utilizados en la Agroindustria*

Dentro de la agroindustria se utiliza con mucha frecuencia a los microorganismos y a veces con la ayuda de la biotecnología se puede hacer que dichos microorganismos puedan resolver algunos de los problemas que enfrentan las personas a diario como son biodegradación de materia orgánica,

control de plagas, afectación por infecciones, falta de combustibles, falta de pigmentos de origen orgánico, escasez de alimentos y muchos otros problemas, es decir que gracias a los microorganismos se puede tener sus aplicaciones en: elaboración de materiales, combustibles, farmacología, industria química, la agricultura y la industria alimentaria como plantea (OSTOS, y otros, 2018 pág. 132)

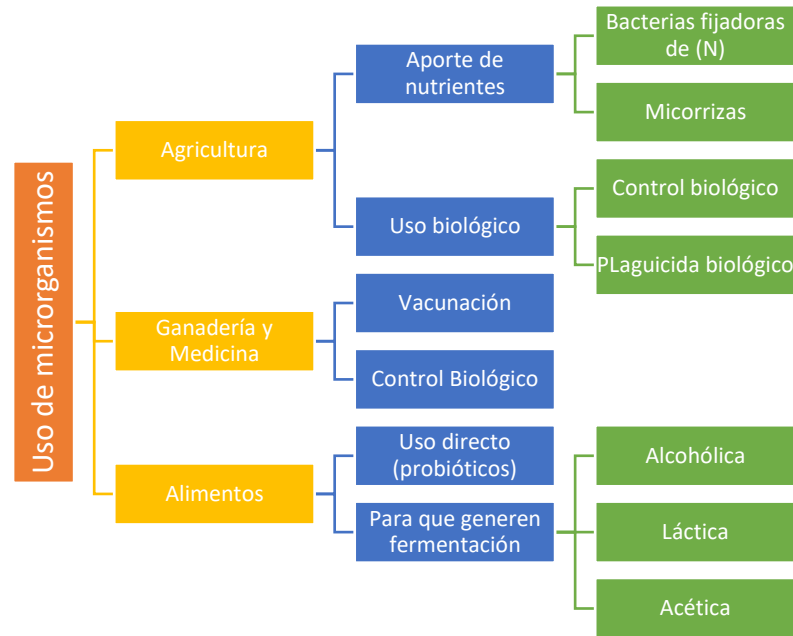


Figura 5-1. Principales usos de los microorganismos en la agroindustria

Fuente: (LAURENTIN, 2019)

Realizado por: Orellana A. (2022)

En el sector de alimentación existen un sinnúmero de aplicaciones obteniendo muchos productos que se pueden consumir y que atravesaron procesos bioquímicos específicos entre los principales tenemos

Tabla 6-1: Principales microorganismos útiles en la agroindustria de alimentos

Fermentación		Subproducto	Microorganismo(s) encargado	Utilizado en
Acética		Ácido acético	<i>Acetobacter</i> / <i>Aspergillus wentii</i> / <i>Aspergillus clavatus</i> / <i>Mucor piriformis</i> / <i>Citromyces</i>	Vinagre
Alcohólica		Alcohol etílico (etanol)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / <i>Zymomonas mobilis</i> / <i>Pichia stipitis</i>	Vino, pan, cerveza
Ácido láctico		Ácido láctico	<i>Lactobacillus pentosus</i> / <i>Lactobacillus</i>	Leche, yogurt, queso, requesón

			<i>delbrueckii</i> / <i>Lactobacillus brevis</i> Fungi: <i>Rhizopus sp.</i>	
Butírica		Ácido butírico	<i>Clostridial species (Clostridium tyrobutyricum)</i>	Degradación de materia orgánica
Fermentación de azúcar		Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i> / <i>Penicillium luteum</i> <i>Penicillium citrinum</i> / <i>Aspergillus wentii</i> <i>Aspergillus clavatus</i> / <i>Mucor piriformis</i> , <i>Citromyces pfefferianus</i> / <i>Paecilomyces divaricatum</i> / <i>Trichoderma viride</i> / <i>Yarrowia lipolytica</i> / <i>Candida guilliermondii</i>	Aditivo alimenticio

Fuente: (CHATZIPAVLIDIS, y otros, 2013 pág. 20)

Realizado por: Orellana A. (2022)

1.1.7. Características de microorganismos para la Agroindustria

Las bacterias ácido lácticas según (HERNÁNDEZ-URZÚA, 2016 pág. 150) son parte importante de la agroindustria muchas veces pueden llegar a ser indicadores de la calidad en lo que se refiere a alimentos de manera negativa cuando llegan a ser agentes de alteraciones de alimentos como por ejemplo bacterias como: *Lactobacillus lindneri*, *Pediococcus Damnosus*, *Lactobacillus brevis*, las cuales alteran los alimentos mediante la liberación de diacetilo o de ácido sulfhídrico H₂S que es nocivo para la salud

Continuando con otras características es que las bacterias ácido lácticas en el caso de la familia de los *Lactobacillus bulgaricus* pueden proliferar en condiciones anaerobias por lo que son capaces realizar la fermentación la cual es utilizada en elaboración de derivados fermentados de lácteos y aparte también tienen un potencial positivo para ser considerados como probióticos desde el punto de vista de (HERNÁNDEZ-URZÚA, 2016 pág. 151)

Las levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae* en la agroindustria también son de mucha importancia cuando no existe la suficiente cantidad de sustrato es decir fuentes ricas de glucosa como son las frutas (fructuosa) estas pueden degradar materia orgánica como la celulosa de los vegetales acelerando su proceso de degradación que será utilizado por las plantas además que también se utilizan para la generación de etanol para utilizarlo en biocombustibles y también la ya conocida fermentación de bebidas citando a (CHATZIPAVLIDIS, y otros, 2013 pág. 29)

Las bacterias ácido acéticas de la familia de las *Acetobacter* en la agroindustria también se llegan a utilizar como degradadoras de materia vegetal específicamente de hidrolizados de lignocelulosa los cuales gracias a la fermentación llegan a ser más asimilables para plantas hongos y otras

bacterias con lo que se acorta el tiempo de descomposición agrega (CHATZIPAVLIDIS, y otros, 2013 pág. 20)

1.1.8. *Factores que afectan el desarrollo de los microorganismos*

1.1.8.1. *Factores que implica a los propios microorganismos*

- Adaptación al sustrato: Es la característica propia de que posee cada microorganismo y que ha desarrollado debido a la selección natural al pasar las generaciones de sus antecesores para resolver las adversidades y lograr la supervivencia y reproducirse para transmitir dichas habilidades a su progenie.
- Estado fisiológico: hace referencia a las condiciones de funcionalidad del microorganismo a lo largo de la etapa de su vida, la buena o mala condición dependerá de los efectos que sufre por agentes físicos químicos o biológicos como puede ser las siembras y resiembras en sus medios de cultivos, adición o aplicación de inhibidores de crecimiento, aplicación de agentes crió conservadores, competencia con otros microorganismos por nutrientes
- Velocidad de Crecimiento: es la velocidad de desarrollo que tiene un microorganismo para poder proliferar en un medio aumentando su número de células esto se debe a que tan rápido sea la eficacia de utilización de los nutrientes limitantes también se puede hablar de otra habilidad que es el control genético pues este determinará la cantidad de tiempo de su fase de latencia, la generación y producción de sus células.
- Asociaciones microbianas: Son las interacciones o relaciones de distintos microorganismos que se hallan compartiendo un determinado espacio o medio de cultivo y se puede dar de tres formas: (HERNÁNDEZ-URZÚA, 2016)

Tabla 7-1: Tipos de asociaciones entre microorganismos

Asociación	Descripción
Sinergismo (Positiva)	En esta relación la actividad de un microorganismo beneficia el accionar del otro
Antagonismo (negativa)	En esta relación el desarrollo de un microorganismo no favorece el accionar del otro
Neutra	En esta relación la actividad y el desarrollo de dos o más microorganismos que comparten un espacio no se ve afectada

Fuente: (HERNÁNDEZ-URZÚA, 2016 pág. 48)

Realizado por: Orellana A. (2022)

1.1.8.2. *Factores intrínsecos del medio*

- Potencial de hidrógeno (pH): El pH va de una escala de 0 a 14 en la que se define como el logaritmo negativo de concentración molar de iones hidrogeniones también se puede hablar de la capacidad de las sustancias para aceptar o donar electrones
- Potencial de oxido reducción (Eh): Se define como la capacidad de un sustrato para perder o ganar electrones que se da debido a una reacción en donde ocurre una migración o flujo de electrones entre las sustancias que interaccionan
- Sustancias inhibidoras de crecimiento (sustancias antimicrobianas): Son aquellas sustancias que atacan y destruyen a los microorganismos evitando su desarrollo y reproducción como por ejemplo los bactericidas, antibióticos, antimicóticos, existen tres tipos de inhibidores de crecimiento que son: Adicionales, Naturales y Residuales.
- Actividad de Agua (Aw): Es la relación que existe entre la presión de vapor del medio de cultivo o alimento (p) y la presión de vapor del agua pura (po) dicho de otras palabras es el grado de aprovechamiento por los microorganismos del agua del medio de cultivo o alimento.
- Nutrientes requeridos: Son los elementos o productos químicos que necesitan las células de un microorganismo para sus funciones vitales
- Integridad: Es la cualidad que posee del medio de cultivo para estar lo más asimilable posibles es decir libre de alguna alteración morfológica o química en su contenido.

Como expresa (HERNÁNDEZ-URZÚA, 2016 pág. 44)

1.1.8.3. *Factores extrínsecos*

- Temperatura: Es la medida de flujo de calor las reacciones bioquímicas fundamentales dependen de la temperatura, por lo que determinan el desarrollo y la viabilidad de los microorganismos. Las temperaturas altas afectan los componentes estructurales de las células y también logran inactivar las enzimas que utilizan las células en sus reacciones en cambio las bajas temperaturas extienden las fases logarítmicas el crecimiento y desarrollo del microorganismo se da por encima de (-8°C) con un máximo de 100°C
- Atmósfera: Es la mezcla gaseosa (aire) en el caso de condiciones aerobias y ausencia de oxígeno en condiciones anaerobias, que está en contacto con los microorganismos pues estas afectan debido al tipo y concentración de gases que entran en contacto con los microorganismos

- **Humedad Relativa:** Es la cantidad de vapor de agua que existe en el aire que rodea a los microorganismos, la humedad en el ambiente acelera la actividad microbiana en el medio de cultivo. (HERNÁNDEZ-URZÚA, 2016 pág. 50)

1.1.9. **Bacterias Ácido acéticas**

Las bacterias ácido acéticas abreviadas (BAA) son bacterias gran negativas es decir coloración rosa o roja bacilares y estrictamente aerobias existen dos géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* se las distingue de que posean o no la habilidad de oxidar el acetato, las bacterias ácido acéticas oxidan alcoholes, ácido pirúvico o láctico la prueba de catalasa da positiva y cabe mencionar que no pueden oxidar completamente los sustratos da a conocer (PARÉS, y otros, 2012 pág. 55)

En la siguiente ecuación (1) tenemos la reacción global de la fermentación acética:



1.1.10. **Bacterias Ácido lácticas**

Son bacterias las cuales componen un grupo heterogéneo muy diverso pero los más característicos de estas bacterias son los cocos o bacilos gran positivos es decir coloración azul o violeta tienen una característica común entre todos ellos la cual es la de producir ácido láctico como catabolito único o mayoritario cuando realizan la fermentación de azúcares, en la prueba de catalasa da negativo describe (PARÉS, y otros, 2012 pág. 74)

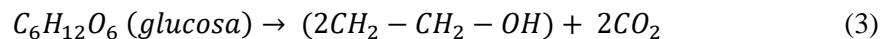
En la ecuación (2) se puede observar la reacción resumida de la fermentación ácido láctica.



1.1.11. **Levaduras**

Son microorganismos pertenecientes a la familia fungi más conocidos como hongos pero la denominación levadura es para los que tienen características de ser unicelulares su reproducción se da por ascosporas pero en su mayoría lo hace por gemación, las levaduras tienen poca diversidad si se la llega a comparar con otros microorganismos, son organismos eucariotas, a nivel microscópico se las diferencia de las algas porque no tienen pigmentación verdosa, de los protozoos por tener una pared más rígida y no poseer movilidad, y de las bacterias se las diferencia por tener un tamaño superior manifiesta (PARÉS, y otros, 2012 pág. 40)

En la ecuación (3) se tiene la reacción resumida de la fermentación alcohólica.



1.1.12. *Siembra de microorganismos*

Para realizar el aislamiento o también unas separaciones de microorganismos que se encuentran en una muestra de (agua, suelo, materias primas o alimentos etc.) se utiliza los diferentes tipos de siembras además que se puede hacer uso de inhibidores de crecimiento o también medios de cultivos selectivos para lograr el objetivo destaca (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 39)

La siembra es la acción más utilizada en el laboratorio de microbiología en el cual se realiza la transferencia de microorganismos de un ambiente a otro con el objetivo de cultivarlos y esto se da posterior a haber preparado el medio de cultivo de donde los microorganismos obtengan los nutrientes necesarios para su desarrollo y luego se procede a inocularlos postula (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 39).

En la siembra en la que se utiliza el asa de siembra se debe esterilizarla además de todo el material que se va a utilizar y el lugar en donde se va a realizar la siembra también se debe mantener completamente esterilizado para evitar contaminaciones por otros microorganismos y para esto existe una serie de pasos que se sigue para la siembra los cuales son:

- Se flamea el asa de siembra en un mechero hasta que la punta del asa llegue a estar incandescente
- Se sujeta el tapón del tubo con los dedos anular y meñique
- Se llamear la boca del tubo en la llama del mechero
- Se introducir el asa en el interior del tubo y luego se inicia la siembra
- Luego se siembra ya sea por estrías es decir agitando el asa en la superficie del medio de cultivo o según el tipo de siembra que se vaya a realizar. (REYNOSO, y otros, 2015)

1.1.12.1. *Siembra por estrías*

Se toma las colonias o los microorganismos con el asa en anillo y se siembra en estría agitando zigzagueando en un tubo que contiene agar pico de flauta o agar inclinado, respetando las indicaciones. Luego se va introducir el asa en el interior del tubo y proceder a sembrar analiza (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 41)

1.1.12.2. *Siembra por agotamiento en estrías*

Se inicia con el asa en anillo cargada de los microorganismos o agrupaciones de estos y se realiza una serie de estrías paralelas no superpuestas, sobre una tercera parte de la superficie de la caja de Petri conteniendo el medio de cultivo luego se esteriliza el asa de siembra y se efectúan una serie de estrías en dirección perpendicular a hacia el anterior, comenzando en la zona donde termina la última estría y finalmente este procedimiento se repite varias veces argumenta (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 41)

1.1.12.3. *Siembra e punción o en picadura*

Se procede a introducir el asa en punta con el inóculo en un tubo conteniendo agar en columna, sin tocar las paredes del tubo y en forma paralela asegurándose que el inóculo quede distribuido a lo largo de toda la punción sostiene (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 41)

1.1.12.4. *Siembra con espátula de Drigalsky*

Se procede a pipetea un volumen de inóculo (generalmente 0,1 ml) y se deposita sobre la superficie de la placa de Petri que contiene el medio de cultivo solidificado, con una espátula de Drigalsky estéril (previamente empapada en alcohol), luego la muestra se pasa por toda la superficie y se efectúa movimientos de rotación hasta que se disipe declara (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 42)

1.1.12.5. *Siembra con hisopo*

Se procede a empapar el hisopo de algodón estéril en un tubo el cual contiene un cultivo líquido previamente homogeneizado. Se elimina el exceso de inóculo presionando el hisopo contra las paredes internas del tubo y se disemina el inóculo por toda la superficie de la placa conteniendo el medio de cultivo sólido enfatiza (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 42)

1.1.12.6. *Siembra por vertido de placa*

Se toma un volumen de inóculo (de manera general se trabaja con 1 ml) a un tubo que contiene agar fundido y se vierte el contenido en una caja de Petri vacía y estéril, luego se homogeneiza el contenido de la placa efectuando movimientos afirma (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 43). Además, cabe decir que para esto se necesita realizar las disoluciones en las cuales se debe tener una solución madre de la cual se parte en la cual se utiliza en una proporción de 1:9 exactamente

A partir de esta solución madre se toma 1 mL y se pasa a un primer tubo de ensayo el cual va a tener una disolución de 1:10 y es la disolución 10^{-1} después se toma 1mL de este tubo de ensayo y se va a pasar a un segundo tubo de ensayo el cual va a tener una proporción de 1:1000 y este va a ser la disolución 10^{-2} y así sucesivamente además que esta técnica se considera una ventaja ya que esta mide el número de células viables (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 57)

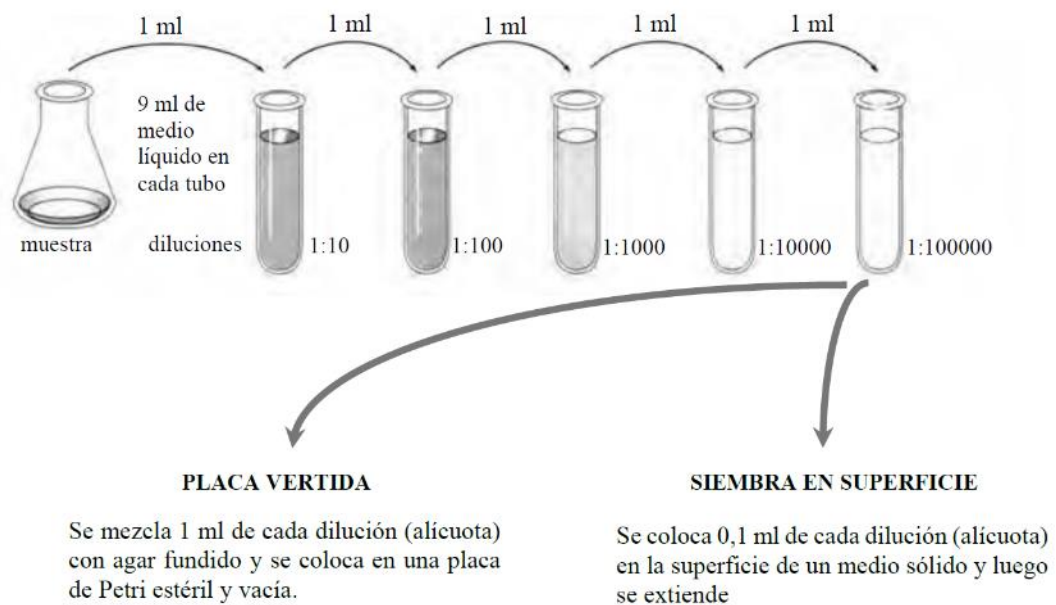


Figura 6-1. Preparación de disoluciones para una siembra

Fuente: (REYNOSO, y otros, 2015)

1.1.12.7. Siembra en medios líquidos

Se toma a los microorganismos con asa de anillo o pipeta a un recipiente (vaso de precipitación, matraz Erlenmeyer o tubo) conteniendo el medio de cultivo líquido de forma general este tipo de siembra se utiliza para aumentar el número de microorganismos agrega (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 43)

1.1.13. *Crecimiento de microorganismos*

El crecimiento y desarrollo de los microorganismos señala (CERRA, y otros, 2013 pág. 7) que se da cuando este encuentra y existen factores favorables adecuados de crecimiento como son factores los factores extrínsecos intrínsecos y los que son propios de cada microorganismo con lo cual este atraviesa algunas fases desde su inoculación o siembra hasta su muerte lo que este se puede expresar como una curva de crecimiento como lo indica la siguiente imagen:

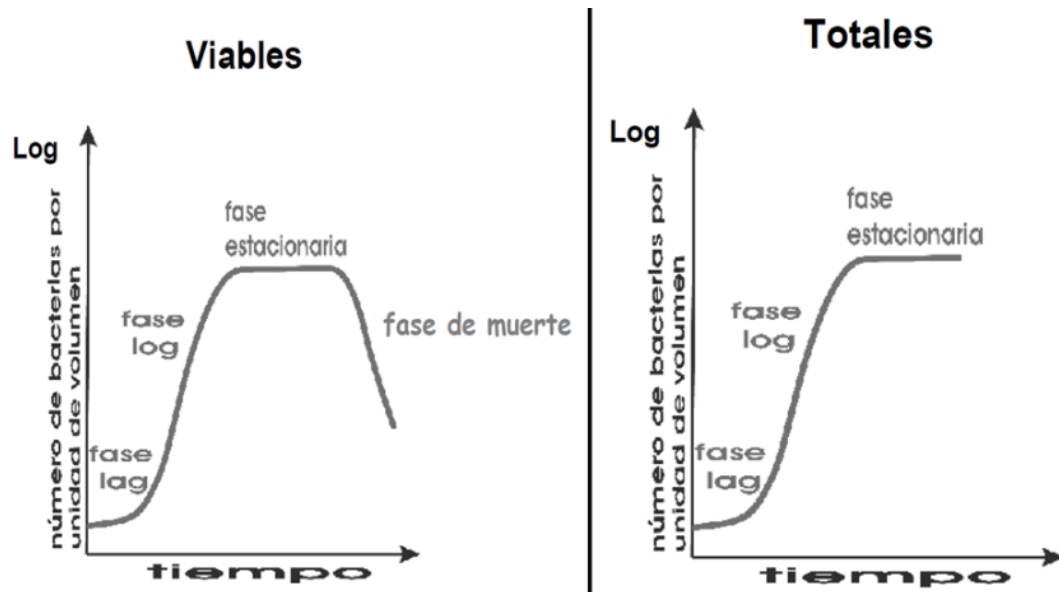


Figura 7-1. Curva de crecimiento de los microorganismos

Fuente: (CERRA, y otros, 2013 pág. 7)

Cuando se habla de las fases son las siguientes:

- Fase de letargo, de adaptación o fase lag: en esta etapa los microorganismos se adaptan a las condiciones del medio de cultivo cabe mencionar que en esta no se observa aumento de su número
- Fase de crecimiento logarítmico o exponencial: aquí los microorganismos son capaces de duplicar su masa y se empieza a dividirse en intervalos regulares y el crecimiento es constante y máximo aquí la ecuación del crecimiento exponencial se explica a continuación:

Se puede observar la ecuación del crecimiento exponencial o logarítmico:

$$N_t = N_0 \times 2^n \quad (4)$$

Donde:

N_t = número de bacteria al tiempo t

N_0 = número inicial de bacteria al tiempo (tiempo 0)

n = número de generaciones

La ecuación (5) muestra la ecuación del número de generaciones:

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2} \quad (5)$$

- Fase estacionaria máxima: en esta etapa el crecimiento del cultivo es cerrado en el cual no existe aporte de nuevos nutrientes ni hay salida de productos del metabolismo, aquí existe la denominada cosecha máxima y esto dependerá del tipo de microorganismo y la composición que exista en el medio además de las condiciones de incubación.
- Fase de muerte: desde el punto de vista biológica se denomina a la pérdida o falta de la capacidad de multiplicación en la que se logra diferenciar los microorganismos viables que las que aún tienen la capacidad de reproducción y los microorganismos no viables los cuales son los que perdieron la capacidad de multiplicarse. (CERRA, y otros, 2013). Según (MADIGAN, y otros, 2015 págs. 162-163) Cuando se da el crecimiento de los microorganismos se debe realizar un recuento de células viables que no es mas que la capacidad del microorganismo de dividirse y dejar descendencia, el recuento de células viables se lo hace por dos métodos: método de siembra por extensión, en donde se utiliza un asa de vidrio o material de vidrio estéril para dispersar la muestra y el método de siembra por vertido en placa, en el que se pipetea a la muestra en una caja Petri estéril, el recuento de células viables para fines estadísticos se lo hace con el número de colonias entre 30 y 300 para el cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC) = Recuento × Factor dilución.

1.1.14. *Métodos de identificación de microorganismos*

La identificación de microorganismos es sumamente para poder determinar qué tipo de especies podemos encontrar en un determinado tiempo de estudio de laboratorio para lo cual se basa en dos características:

- Características fenotípicas
- Características genotípicas

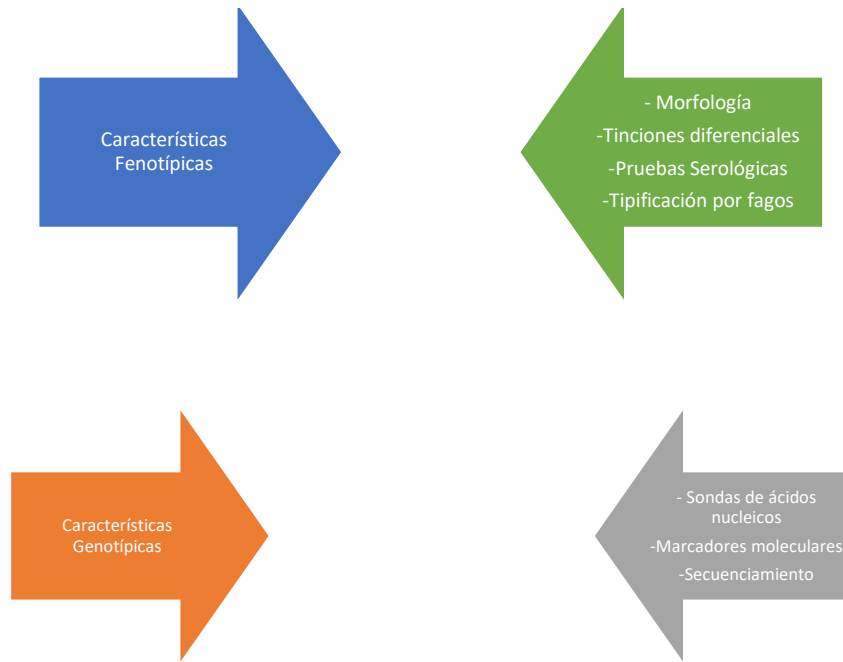


Figura 8-1. Clasificación de métodos de identificación Bacteriana

Fuente: (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 72)

Realizado por: Orellana A. (2022)

Además de lo que se ha mencionado también se puede tomar en cuenta algunos parámetros a cuando se vayan a realizar una identificación desde el punto de vista bioquímico:

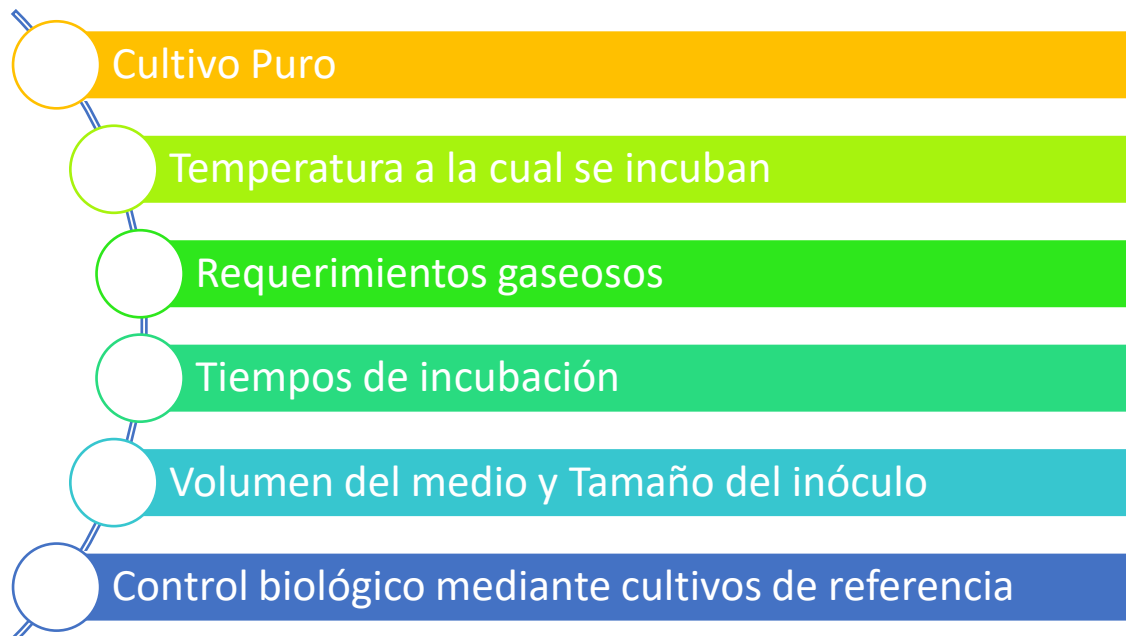


Figura 9-1. Factores a tomar en cuenta desde el punto de vista bioquímico

Fuente: (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 74)

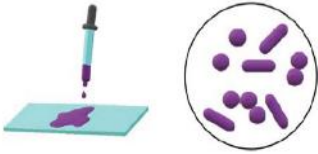
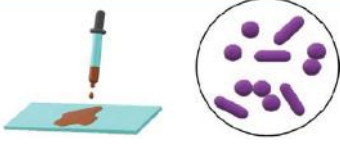
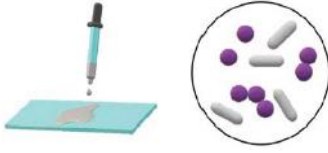
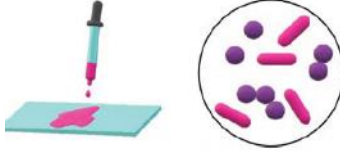
Realizado por: Orellana A. (2022)

1.1.14.1. Tinción de Gram

Es una técnica de tinción la más reconocida y utilizada, la cual divide a los microorganismos en dos grandes grupos, Gram positivos de coloración azul o violetas y Gram negativos de coloración rojos o rosas, según estos retengan o no el cristal violeta utilizado en la tinción, se puede ver que existen diferencias en la composición de las paredes de las células.

Gram positivas, que contienen una capa gruesa de peptidoglucano con numerosos enlaces cruzados de ácido teicoico, y las paredes de las células Gram negativas, en las que la capa de peptidoglucano es más delgada, explican las diferencias de tinción de Gram entre estos dos grupos principales de bacterias (GONZÁLEZ, y otros, 2020 pág. 83)

Tabla 8-1: Metodología de la tinción de Gram

Nombre	Procedimiento	Tiempo de fijación	Imagen
Cristal violeta (Colorante primario)	Se tiñe las bacterias en la placa después de realizar el frotis da un color azul-violeta	1 minuto	
Lugol (Mordente)	Se tiñe y se permanece en color azul violeta	1 minuto	
Alcohol cetona (decolorante)	Las Gram negativas se decoloran, las Gram positivas permaneces de azul-violeta	30 segundos	
Safranina (Colorante de contraste)	Gram negativas dan una coloración rojo-rosa, las Gram positivas permanecen en azul-violeta	1 minuto	

Fuente: (GONZÁLEZ, y otros, 2020 pág. 85)

Realizado por: Orellana A. (2022)

1.1.14.2. Prueba de catalasa

La prueba de la catalasa es importante para poder determinar el mecanismo de eliminación del H_2O_2 dentro de las células en la cual la proteína catalasa en los seres vivos protege a las especies

aerobias o reactivas al oxígeno que termina siendo un residuo en las pruebas negativas no existe un burbujeo lo cual se da en las especies anaerobias (HARVEY, y otros, 2007 pág. 43)

1.1.14.3. *Prueba de oxidasa*

Es la prueba que determina la existencia de la enzima oxidasa que se da por reacción con el citocromo oxidasa en la cual se ve activado este debido a la presencia de oxígeno, las bacterias aerobias serán las que den positivas generando un producto oscuro y las anaerobias darán negativo plantea (HARVEY, y otros, 2007 pág. 43)

1.1.14.4. *Prueba de Movilidad*

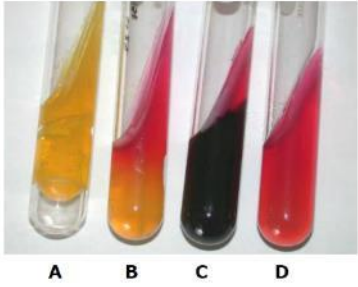
Esta prueba permite, permite saber si algunas especies poseen flagelos, esta prueba se verifica si existen zonas difusas dispersas lo que da a conocer que ha existido un crecimiento que se va ensanchando en la línea de cultivo, cuando existe presencia de crecimiento fuera de la línea de siembra esta prueba es positiva, y es negativo cuando el cultivo se mantiene dentro de la línea de cultivo (RAMIREZ, y otros, 2018 pág. 63)

1.1.14.5. *Prueba de fermentación de azúcares como glucosa lactosa y sacarosa*

Para esta prueba se puede utilizar el agar TSI (Three Sugar Iron) en la cual el medio contiene una pequeña cantidad de glucosa y una gran cantidad de lactosa y sacarosa. Los microorganismos capaces de fermentar cualquiera de estos compuestos darán lugar a la formación de ácidos que bajan el pH del medio por debajo de 7, como consecuencia el rojo fenol vira a amarillo o amarillo intenso con esta prueba se puede determinar:

- Que los microorganismos obtienen su fuente de carbonan y logran acidificar el medio de cultivo
- Los microorganismos pueden utilizar peptonas como fuente de energía, pero en caso de aerobiosis y el color cambia de rojo a amarillo
- Liberación de gas (CO₂) en forma de burbujas los cuales se pueden observar formando espacios la reacción catalizada por el formiato liasa a partir del ácido fórmico
- Producción de ácido sulfhídrico (SH₂) el cual se llega a detectar por la formación de sulfuro de hierro que queda al fondo y con una tonalidad oscura Fuente: (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 83)

Tabla 9-1: Posibles resultados en la fermentación de azúcares

Interpretación de resultados	
	A: producción de gas
	B: A: fermentación de los tres azúcares
	C: producción de SH ₂
	D: muestra sin cambios

Fuente: (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 83)

Realizado por: Orellana A. (2022)

1.1.15. Conservación de microorganismos

La supervivencia de los microorganismos por congelación o en caso específico crio congelación puede ser positiva aplicando unas bajas temperaturas las cuales pueden ser alcanzadas con la utilización de nitrógeno líquido con temperaturas de (-150° a -180°C) o de nitrógeno en fase o forma de vapor (-196°C). Estas temperaturas deseadas se logran un prolongado almacenamiento a lo largo del tiempo en las cuales se pueden recuperar con un rango de 90 a 100% de supervivencia de los microorganismos, esto dependerá también de los periodos de congelación y descongelación, la preparación de los microorganismos se la hace realizando una mezcla de glicerol con agua destilada esterilizada en la cual va a tener una concentración de glicerol del 25 al 30% y luego esta disolución se la va a mezclar y homogeneizar con la muestra que deseamos conservar en estado líquido en una proporción de 50:50 (ACOSTA, 2019 pág. 11)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Hipótesis y variables

2.1.1. *Hipótesis General*

Se espera que en las muestras de suelos de bosques primarios de la Parroquia Cañi, del Cantón Colta haya microorganismos que sean de interés para un el uso agroindustrial

$$H_a = T_{Cañi} \quad (6)$$

2.1.2. *Hipótesis Nula*

Que en los suelos de las muestras de suelos de bosques primarios de la Parroquia Cañi, del Cantón Colta no podría haber microorganismos que sean de interés para el uso agroindustrial

$$H_a \neq T_{Cañi} \quad (7)$$

2.2. Identificación de Variables

Para la identificación de las variables a estudiar se toma en cuenta lo siguiente:

2.2.1. *Variable Independiente:*

- Cantidad de muestra del suelo
- Disoluciones de la muestra
- Anaerobiosis
- Temperatura de incubación
- pH del medio de cultivo
- Concentración de alcohol etílico en el agar
- Tiempo de fermentación
- Tipo de agar utilizado

2.2.2. *Variable Dependiente*

- Crecimiento microorganismos
- Presencia de microorganismos
- Viabilidad de microorganismos para el uso agroindustrial

Tabla 1-2: Resumen de identificación de variables

Etapas del proceso	Variables independientes	Variables dependientes
Aislamiento de microorganismos	<ul style="list-style-type: none">• Cantidad de muestra• Disoluciones de la muestra• Tipo y composición del agar	<ul style="list-style-type: none">• Viabilidad de microorganismos para el uso a largo plazo
Caracterización de las colonias y muestra de suelo	<ul style="list-style-type: none">• Temperatura• pH del medio• Concentración de alcohol del medio	<ul style="list-style-type: none">• Crecimiento de las colonias
Pruebas bioquímicas	<ul style="list-style-type: none">• Anaerobiosis• Tiempo de Fermentación	<ul style="list-style-type: none">• Presencia de microorganismos que usan las rutas metabólicas fermentativas

Realizado por: Orellana A. (2022)

2.3. Operacionalización de variables

Tabla 2-2: Operacionalización de variables

Variable	Tipo de Variable	Definición operacional	Categorización	Indicadores	Instrumentos de medición	Valor
Cantidad de muestra	Independiente	La porción de suelo de donde se aísla los microorganismos	-	Peso (g)	Balanza analítica	10g (microorganismos) 5g (pruebas f-q)
Disoluciones de la muestra	Independiente	El volumen de la disolución en agua estéril para la siembra de los microorganismos	-	Volumen (mL)	Pipetas y micropipetas	1mL (muestra) 10mL (disolución muestra)
Tipo y Composición del agar	Independiente	Necesidades específicas de nutrientes requeridos por los microorganismos	-	Tipos de Agar (g) (MRS) (Sabouraud) (PDA) (YPD) (Acetobacter Agar)	Balanza analítica	MRS: 70g x litro Sabouraud: 65g x litro PDA: 39g x litro YPD: 65 g x litro Acetobacter agar: 60g x litro o según el fabricante

Temperatura	Independiente	Magnitud física que mide la cantidad de calor o energía térmica de un sistema.	Temperatura de incubación de los microorganismos	Calor	Incubadora Kenton DNP-series (LCD)	30 – 40 °C
			Temperatura para los análisis químicos de la muestra de suelo	Calor	Estufa, incinerador, mufla y equipo Kjeldahl	100-550 °C
pH del medio de cultivo	Independiente	Cantidad de iones H ⁺ que posee una sustancia	pH ácido (bacterias ácido lácticas)	pH	Potenciómetro (pH metro)	pH = 4.8 – 5.2
			pH neutro (bacterias fermentativas y levaduras)	pH	Potenciómetro (pH metro)	pH = 7
Concentración de alcohol en el medio	Independiente	Cantidad de alcohol en agua en relación volumen/volumen	Concentración al 3 5 y 8% de alcohol	Cantidad de alcohol en agua destilada relación volumen/volumen	Pipetas graduadas	3mL, 5mL, 8mL de alcohol (pureza 100%) en 97mL, 95mL y 92mL de agua destilada

Anaerobiosis	Independiente	Ausencia de oxígeno (aire) dentro de un espacio	Ausencia de oxígeno para las rutas fermentativas	Liberación de CO ₂ y Vapor de Agua	-	-
Tiempo de Fermentación	Independiente	Lapso de tiempo entre la inoculación de los microorganismos aislados en un medio que sea fuente de glucosa, y cuando se reconoce la fermentación, mínimo 1 mes y medio	Tiempo de Fermentación de bacterias fermentativas y levaduras	Liberación de CO ₂ en forma de burbujas efervescentes y desprendimiento de olor a alcohol etílico	Potenciómetro o papel indicador de pH	Un pH ácido (<6)
Cantidad de microorganismos de uso agroindustrial	Dependiente	Unidades Formadoras de Colonias	<ul style="list-style-type: none"> • UFC (bacterias ácido lácticas) • UFC (bacterias fermentativas) • UFC (levaduras) 	Número de agentes microbianos formando colonias	Cuentacolonias	Líquido: (UFC/mL) Sólido: (UFC/g)
Presencia microorganismos de uso agroindustrial	Dependiente	Proliferación y Formación de colonias dentro del agar o del caldo nutritivo	-	Vista macroscópica y microscópica	Lupa, Cuentacolonias y microscopio	-
					Cuentacolonias	-

Viabilidad microorganismos de uso agroindustrial	Dependiente	Microrganismos que sobrevivieron al proceso de fermentación, anaerobiosis y que proliferaron en medio ácido de pH (4.8 – 5.2)	Viabilidad de bacterias ácido lácticas	Crecimiento en medio de cultivo ácido pH (4.8 – 5.2) y en ausencia de oxígeno		
		Microrganismos que sobrevivieron al proceso de fermentación, anaerobiosis, inhibidores de crecimiento y que proliferaron en medio neutro de Ph	Viabilidad de bacterias fermentativas y levaduras	Liberación de CO ₂ en forma de burbujas y olor a etanol dentro de un medio rico en glucosa (zumo de cítricos)	Potenciómetro	pH ácido (<6)

Realizado por: Orellana A. (2022)

2.4. Matriz de Consistencia

Tabla 3-2: Matriz de Consistencia

	Problema General	Objetivo General	Hipótesis General	
Aspectos Generales	La sobreexplotación de recursos naturales especialmente de bosques primarios y áreas protegidas	Aislar e Identificar Microorganismos con Interés Agroindustrial a partir de muestras de Suelo de Bosques Primarios del Cantón Colta	Los microorganismos de las muestras de suelos de bosques primarios de la Parroquia Cañi serán de interés para un el uso agroindustrial, al manipular parámetros como el pH, temperatura, tipo de agar requerido, resistencia a inhibidores de crecimiento y pasar las pruebas bioquímicas y pruebas fermentativas	
	Problema Específico	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas	Técnicas de Recolección de Datos
Aspectos Específicos	La creciente expansión de las zonas urbanas debido a la invasión de zonas vírgenes	Realizar el análisis de caracterización físico químico en muestras de suelos provenientes de bosques primarios	H1: Se podrá saber la cantidad de Nitrógeno, Potasio, Materia orgánica y minerales totales que poseen el suelo del bosque primario	Muestreo de suelo utilizando la (forma sistemática) de forma de zigzag con el material limpio, desinfectado y esterilizado

	La falta de acceso a reactivos y sustratos biológicos más baratos para la elaboración de alimentos de base agroindustrial	Aislar microorganismos a partir de las muestras de suelo obtenidas de bosques primarios para evaluar su potencial agroindustrial	H2: El potencial de las especies aisladas será positivo cuando a este lo evaluara mediante la verificación de la mayor liberación de CO ₂ y de pasar las pruebas de Fermentación en el caso de Levaduras, Bacterias Fermentativas y una mayor proliferación en medio MRS en condiciones anaeróbicas, pH ácido además de manera organoléptica con una mayor presencia del característico olor de pan o leche en polvo	Realización de diluciones a partir de solución madre de 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷ y 10 ⁻¹¹ y utilización de agar específicos con inhibidores de crecimiento
	La contaminación de los suelos debido a los desechos generados por el ser humano	Caracterizar los microorganismos aislados tanto en forma de cepas individuales como en consorcios	H3 La caracterización de los microorganismos mediante la evaluación de UFC y en base a su forma, tamaño, color, apariencia brindará una mejor interpretación del tipo de microorganismo comparándolo con los que se hallan en bibliografía	Siembra e incubación en agar MRS, PDA, Sabouraud y la utilización del cuentacolonias

	<p>La creciente demanda de alimentos por parte de las personas debido al aumento del número de habitantes</p>	<p>Proyectar el uso potencial de estos microorganismos en la industria</p>	<p>H4: Mediante la proyección del potencial de estos microorganismos en especial de los que sean más eficientes y más resistentes a las condiciones manipuladas serán de una buena ayuda para dar a conocer nuevas alternativas para la elaboración de alimentos como leche fermentada, yogurt, pan, cerveza, vino o vinagre</p>	<p>Selección de las especies purificadas que más liberaron CO₂ y (CO₂ + Etanol en el caso de levaduras y de bacterias fermentativas) que pasaron las pruebas bioquímicas, fermentativas</p>
--	---	--	--	---

Realizado por: Orellana A. (2022)

2.5. Tipo y diseño de investigación

2.5.1. Tipo de Investigación

- *Descriptiva*

El presente trabajo de Investigación es de tipo Descriptiva ya que tenemos un problema el cuál queremos atenuar para lo cual nos enfocamos en tratar de hallar microorganismos de interés para el uso agroindustrial, pero a su vez como se lo dijo anteriormente

2.5.2. Diseño de Investigación

- *Método Cuantitativo*

Se va a estudiar de manera cuantitativa los parámetros químicos y físicos como pH, estructura, altitud del suelo en el suelo a estudiar para ver a que se debe o no la presencia de dichos microorganismos, además que mediante la experimentación con varias soluciones como son de 1×10^{-3} 1×10^{-5} 1×10^{-7} y 1×10^{-11} vamos a ver cuántas colonias de microorganismos existen a medida que se vaya diluyendo la muestra inicial de cada muestra de los suelos según también a lo que se dice en referencia a la investigación de (CERDA MOROCHO, y otros, 2020)

- *Método Cualitativo*

Esta vía es a lo mínima utilizable, pero va a ser de mucha ayuda al momento que se requiera saber un tiempo relativo en la parte del proceso de fermentación mediante la percepción de aroma a alcohol y de leche en polvo

- *Método Inductivo*

Con la ayuda de este método mediante la observación macroscópica y microscópica se pudo realizar luego mediante el trabajo de laboratorio las pruebas de fermentación en las cuales se podría ver y registrar datos con los cuales se podría elaborar una medición de pH a través del tiempo en la cual iba bajando acidificándose ya esta es específica dependiendo del tipo de microorganismo

- *Método Deductivo*

A través del método inductivo al momento de ir a realizar los aislamientos por bibliografía se sabe que las bacterias ácido lácticas poseen un olor parecido a leche en polvo o a pan horneado por otro lado las levaduras y las bacterias fermentativas por bibliografía se sabe que el olor que desprenden es a alcohol etílico y/o a vinagre ya que se sabe que existe una simbiosis entre estos dos tipos de microorganismos con lo cual se supondría que los resultados serían positivos para la investigación

2.6. **Unidad de Análisis**

Se va a estudiar las diferentes cantidades y tipos de colonias de microorganismos existentes en el suelo ya que estos pueden ser bacterias, hongos, actinomicetos etc.

2.7. **Población de Estudio**

Este trabajo de investigación forma parte del proyecto de investigación de la Facultad de Ciencias Pecuarias acerca del Estudio de Microorganismos de los Suelos de Bosques Nativos de la Provincia de Chimborazo, es por ello que trata de dar a conocer a los investigadores, docentes, y técnicos docentes la Facultad de Ciencias Pecuarias.

Los diferentes tipos de microorganismos que existen en la provincia, además que con este estudio se espera impulsar a las personas del Cantón Colta, así como a los pobladores de la parroquia Cañi perteneciente a dicho cantón de la importancia de los suelos de bosques primarios y de las aplicaciones que se les puede dar en un futuro.

El bosque primario de donde se recolecto las muestras de suelo está categorizado como bosque neblina de montano. Se encuentra en la provincia de Chimborazo, cantón Colta, Parroquia de Cañi en las coordenadas $01^{\circ}45'42''S$, $78^{\circ}55'26''W$; el bosque se encuentra 3400m.s.n.m



Figura 1-2. Sitio de muestreo

Fuente: Google Maps

2.8. Tamaño de Muestra

- Se la realizará la toma de muestras de suelo de varias áreas del bosque primario de la parroquia Cañi La cantidad de suelo utilizado para análisis de rutina es 0.25 kg de suelo, pero es preferible llevar 0.5 kg al laboratorio, empacado en una bolsa plástica debidamente identificada con tinta permanente, o en un recipiente hermético. Para asegurar la calidad de la muestra, no se debe mezclar un suelo arenoso de un lugar con uno arcilloso de otro lugar.
Asimismo, no se debe tomar muestras en áreas recién fertilizadas, sitios próximos a viviendas, galpones, corrales, cercas, caminos, lugares pantanosos o erosionados, áreas quemadas, lugares con acumulaciones de estiércol, fertilizantes, cal u otras sustancias que pueden contaminar la muestra. No hay que fumar durante la recolección de muestras, para evitar contaminarlas con las cenizas del cigarro, ricas en potasio. Para los cálculos de suelo a unidades volumétricas, se requiere medir la densidad aparente y la humedad
- Para realizar el aislamiento se lo realizará a partir de 5 muestras obtenidas al inicio de suelo y se preparará una solución madre de cada una de estas 5 soluciones, la cual contiene 10g de muestra de suelo en 90mL de Agua Destilada para poder hacer la aislación e identificación

2.9. Selección de la muestra

- Para selección de las muestras en el área se establecerá el lugar de interés en conjunto con visitas de campo preliminares, que sirvieron para analizar brevemente las áreas de muestreo, recolectar toda la información ambiental del área, y así iniciar el proceso metodológico del estudio. Se tomaron en cuenta los siguientes criterios para la determinación del área de estudio.
- Tipo de zona agroecológica. Disponibilidad de información histórica. Características generales del área: Ubicación, clima, precipitación, rango altitudinal. Accesibilidad. Disponibilidad de información cartográfica donde se pueda contrastar y comparar el impacto del cambio de uso en coberturas de bosque.
- Para la toma de muestras no existe un método único el recorrido de toma de muestras se realizará en diagonal tomando un punto central el cual debe contener abundante materia orgánica en el suelo. Luego de que se establecieran las áreas de muestreo, se procede a obtener una muestra de cada una de ellas. Ésta muestra (conjunto) estará compuesta por varias submuestras (muestras parciales).
- Cuanto mayor es la cantidad de submuestras que se tomen, más representativa será la muestra total. Para el suelo la muestra se tratará que sea lo más representativa para lo cual se la va a realizar de forma sistemática, cada muestra puede estar compuesta de 4 submuestras, para un 80% de precisión. La cantidad de suelo utilizado para análisis de rutina es 0.25 kg de suelo, pero es preferible llevar 0.5 kg al laboratorio cabe mencionar que antes de los 30 cm de profundidad aquí es en donde se retira la capa de materia orgánica existente (horizonte O) y se tomará el suelo de la rizosfera (horizonte A).
- Después de que se establecieran las áreas de muestreo, se procede a obtener una muestra de cada una de ellas, dicha muestra (conjunto de ellas) estará conformada por varias submuestras (muestras parciales), es decir, cuanto mayor sea la cantidad de submuestras que se tomen, más representativa será la muestra total y se las guardará en una hielera previamente etiquetadas y rotulada, la cantidad de suelo utilizado para análisis de rutina es 0.25 kg de suelo, pero es preferible llevar 0.5 kg al laboratorio.

2.10. Localización del trabajo de integración Curricular

El presente trabajo de investigación se lo realizó en dos etapas una que fue el trabajo de campo que fue en la parroquia de Cañi en un bosque primario y la otra etapa fue la de laboratorio la cual se realizó en el laboratorio de Ciencias Biológicas de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.10.1. Localización de la fase de campo

La toma de muestras se la hizo a partir de un suelo de un bosque primario “Aña Chaupiloma Moyocancha” en el cantón Colta de la parroquia Cañi perteneciente a la provincia de Chimborazo, dicho bosque se caracteriza por ser bosque de montaña con neblina cuyas coordenadas son 01°45'42''S, 78°55'26''W con una altitud de 3400 m.s.n.m.

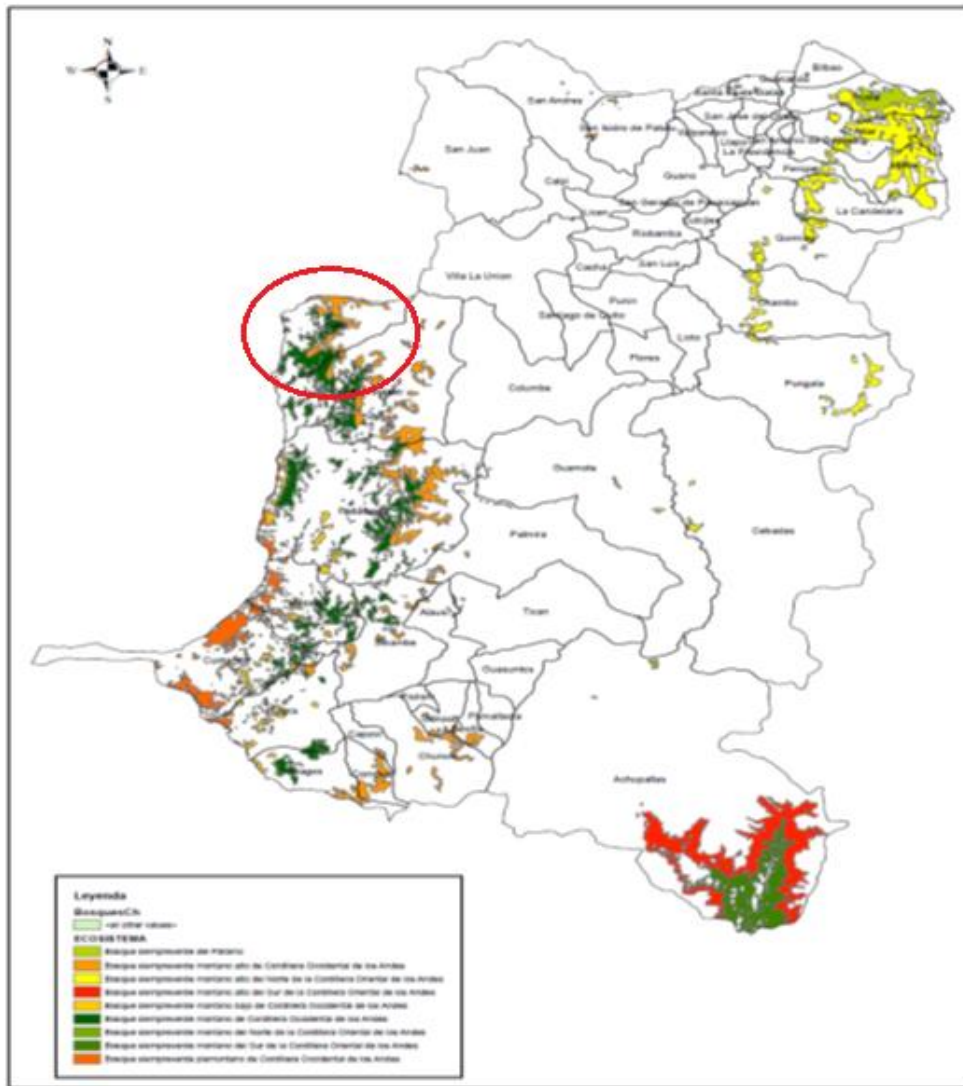


Figura 2-2. Mapa de ecosistemas (provincia de Chimborazo)

Fuente: Grupo de investigación SEALPRA



Figura 3-2. Zona A, sitio de muestreo

Fuente: Grupo de investigación SEALPRA

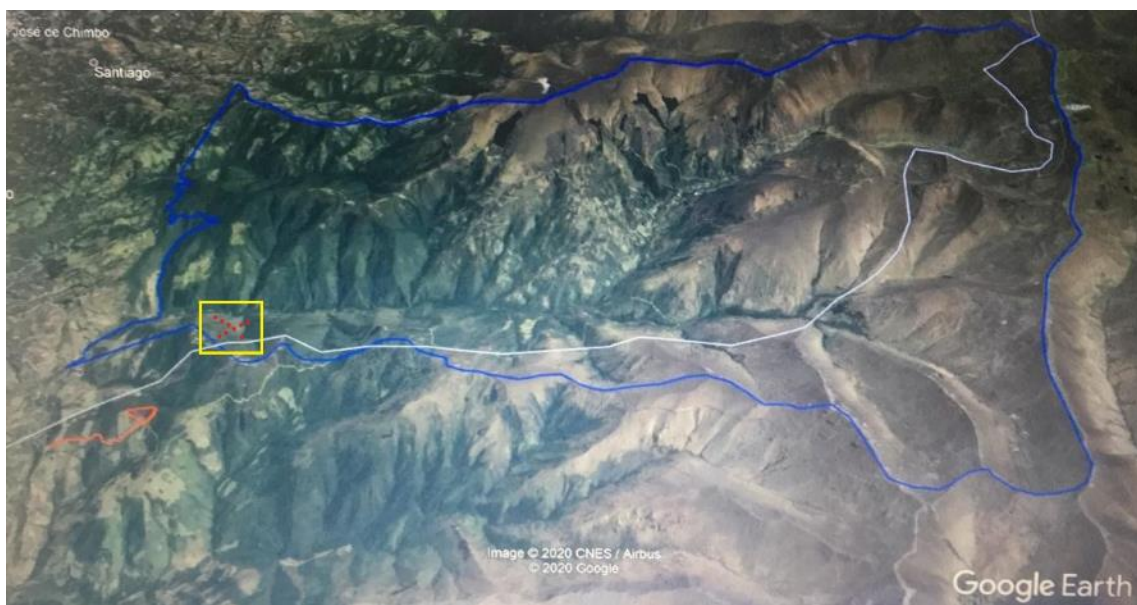


Figura 4-2. Zona en amarillo, área de muestreo

Fuente: Grupo de investigación SEALPRA

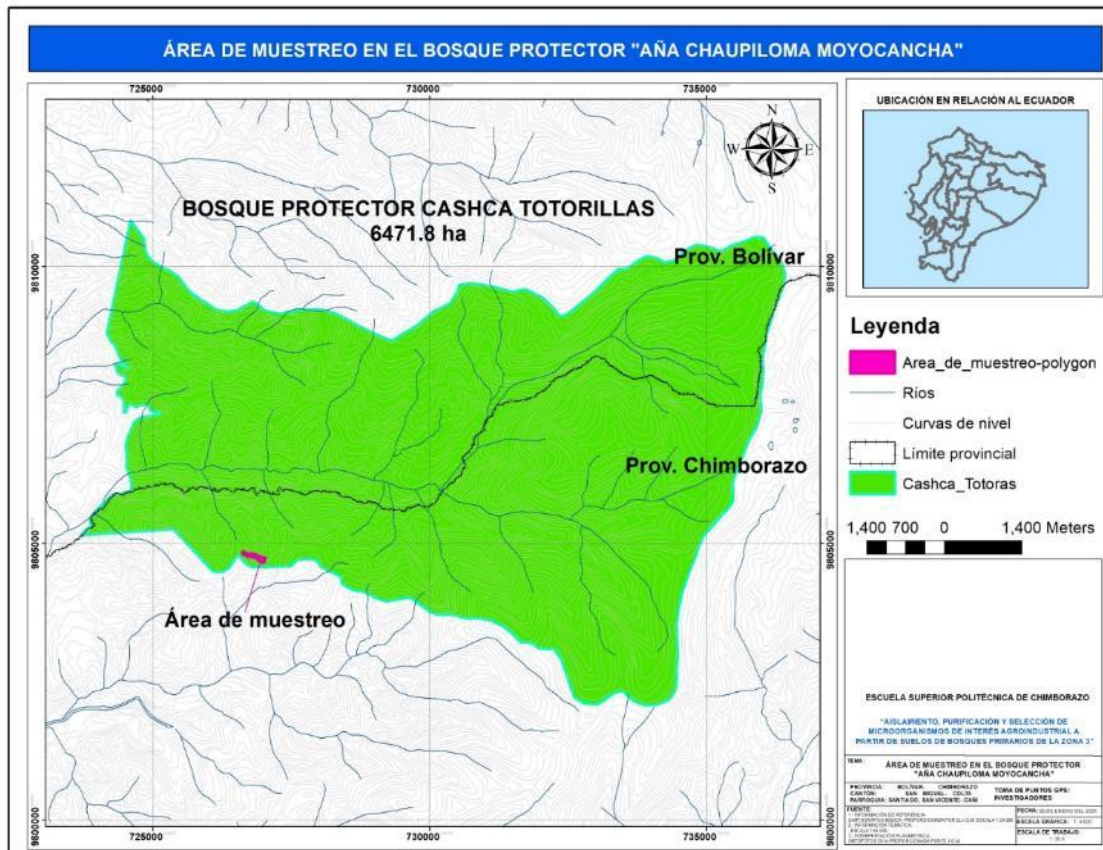


Figura 5-2. Área de muestreo, zonas bosque primario

Fuente: Grupo de investigación SEALPRA

2.10.2. Localización De La Fase De Laboratorio

El estudio de laboratorio del presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en región central de la serranía ecuatoriana en la provincia de Chimborazo, en la ciudad de Riobamba; en la Panamericana Sur km 1 ½ cuyas coordenadas son 78°40'59" de longitud oeste y 01°38'51" de latitud sur y 2850 m.s.n.m. de altitud (TIUPUL, y otros, 2020).

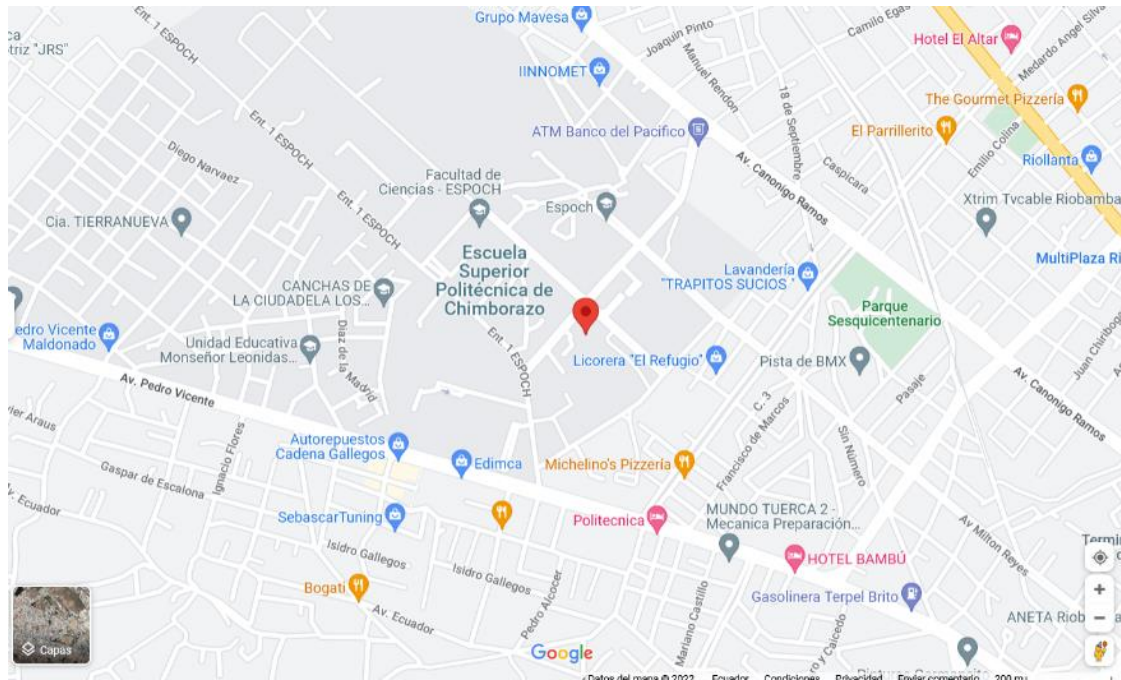


Figura 6-2. Localización de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Fuente: (GOOGLE EARTH, 2022)

2.11. Técnicas de Recolección de datos

- *Materiales, equipos, reactivos e instalaciones*
- *Materiales y Reactivos de Campo:*

Materiales y reactivos de campo

- Barreno o pala de mano
- Funda plástica tipo ziploc
- Hielera (cooler)
- Guantes de latex (blancos si se va a trabajar con muestras biológicas)
- Guantes de acetato negros o azules (para trabajar con sustancias químicas irritantes)
- Espátula
- Agua destilada
- Papel Absorbente
- GPS

- *Materiales, Equipos, Reactivos e Instalaciones de Laboratorio*

Materiales de laboratorio

- Algodón
- Asa de siembra microbiológica
- Atomizadores
- Botellas plásticas de 350 mL
- Cápsulas de porcelana
- Cajas Petri
- Colador, tamiz o cedazo
- Cuchillo
- Desecador
- Espátulas
- Estilete
- Frasco de reactivo de borosilicato (autoclavable)
- Gasas
- Guantes de Vinilo y de látex
- Gradillas
- Gotero
- Lupa de mano
- Malla de asbesto
- Marcador permanente (rotulador)
- Matraces
- Mecheros de alcohol
- Mecheros Bunsen
- Parafilm (plástico film)
- Papel absorbente
- Papel aluminio
- Papel indicador de pH
- Papel filtro
- Pinzas de mano
- Pipetas graduadas
- Pipetas Pasteur
- Piseta

- Probetas Graduadas
- Puntas de micropipetas
- Succionador o pera de succión
- Tijera
- Tiras de Oxidasa
- Tubos de ensayo
- Tubos Durham
- Tubos Eppendorf
- Varilla de agitación
- Vasos de Precipitación
- Vasos plásticos de 50mL
- Vidrios porta y cubre objetos

Reactivos de laboratorio

- Acetato de plomo
- Aceite de inmersión
- Ácido sulfúrico
- Ácido bórico
- Azul de Metileno
- Agar Bacteriológico
- Agar MRS
- Agar Sabouraud
- Agar YPD (Agar Bacteriológico, Peptona, Dextrosa, extracto de levadura)
- Agua Destilada
- Agua de peptona
- Caldo MRS
- Caldo Rojo fenol
- Caldo YPD (Peptona, Dextrosa, extracto de levadura)
- Cloranfenicol (antibiótico)
- Colorante Wright
- Etanol (70%)
- Extracto de Levadura
- Glicerol
- Hidróxido de Potasio

- Jugo natural (zumo) de naranja y mandarina
- Medio SIM
- Peróxido de hidrógeno al 3 %
- Reactivos de tinción Gram

Equipos

- Agitador (vórtex)
- Agitador magnético
- Autoclave
- Balanza
- Balanza analítica
- Balones
- Baño maría
- Brixómetro
- Buretas
- Cámara de flujo laminar
- Cuenta colonias
- Espectrómetro atómico de gases
- Estufa
- Incubadora y refrigeradora
- Luz UV
- Microscopio
- Mufla
- pH metro (potenciómetro)

Instalaciones

Las instalaciones en donde se realizó los estudios experimentales fueron en los laboratorios de Ciencias Biológicas y el de Cromatografía de la facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicada en el Km 1 ½ de la panamericana Sur en la ciudad de Riobamba en la provincia de Chimborazo (TIUPUL, y otros, 2020).

2.12. Fase de Campo

2.12.1. Método de muestreo en campo

Procedimiento:

- Para el suelo la muestra se tratará que sea lo más representativa para lo cual se la va a realizar de forma sistemática, cada muestra puede estar compuesta de 4 submuestras, para un 80% de precisión. La cantidad de suelo utilizado para análisis de rutina es 0.25 kg de suelo, pero es preferible llevar de 0.5 kg a 1kg al laboratorio cabe mencionar que antes de los 30 cm de profundidad aquí es en donde se retira la capa de materia orgánica existente (horizonte O) y se tomará el suelo de la rizosfera (horizonte A) es importante que sea de la zona cerca de las raíces esto lo corrobora (CHEN, y otros, 2005) ya que aquí existe mayor densidad microbiana si se lo compara con un suelo en donde existen
- Después de que se establecieron las áreas de muestreo, se procede a obtener una muestra de cada una de ellas, dicha muestra (conjunto de ellas) estará conformada por varias submuestras (muestras parciales), es decir, cuanto mayor sea la cantidad de submuestras que se tomen, más representativa será la muestra total y se las guardará en bolsa plástica y se las ubicará en una hielera previamente etiquetadas y rotulada, la cantidad de suelo utilizado para análisis de rutina es 0.25 kg de suelo, pero es preferible llevar mas de 0.5 kg al laboratorio como ya se lo mencionó.
- Para las pruebas físicas y químicas se va obtener 5g para las pruebas físicas y 5g para las químicas y se las va a poner en un colador para que tenga una estructura uniforme.
- Para el aislamiento de los microorganismos se lo realizará utilizando 5 muestras de suelo de entre las que se haya recogido, las cuales se las cieren en un colador (tamiz) muy fino de la cual se va obtener 10g de cada una de las 5 muestras y se va a mezclar los 10g tamizados de cada una de las 5 muestras con agua destilada unos 90mL del agua destilada que se utilizará, y se va a realizar la mezcla en 5 matraces Erlenmeyer diferentes y esta será la solución madre.
- Para la Identificación macroscópica se lo va a hacer en base a la forma, tamaño, color, estructura, consistencia de las colonias y se va a proceder con las pruebas bioquímicas.

Fuente: (UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA, 2015)

Realizado por: Orellana A. (2022)

2.13. Fase de Laboratorio

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

Procedimiento:

- Para las pruebas físicas y químicas se va tomar 5g para las pruebas físicas y 5g para las químicas y se las reservará para va a poner en un colador para que tenga una estructura uniforme y más homogénea.
- Para la siembra y el aislamiento de los microorganismos se lo realizó utilizando 5 muestras de suelo de entre las que se haya recogido en la fase de campo, las cuales se las cierce en un colador (tamiz) muy fino de la cual se va obtener 10g de cada una de las 5 muestras y se va a mezclar cada uno de los 10g tamizados de cada una de las 5 muestras con agua destilada unos 90mL del agua destilada se utilizará, en 5 matraces Erlenmeyer diferentes con lo cual esta fue nuestra solución madre.
- Luego se procedió a diluir la solución madre en los tubos de ensayo con varias disoluciones como son de 1×10^{-2} 1×10^{-3} 1×10^{-4} 1×10^{-5} 1×10^{-6} 1×10^{-7} 1×10^{-8} 1×10^{-9} 1×10^{-10} y 1×10^{-11} las cuales se consigue haciendo pasar 1mL de la solución madre hacia el siguiente tubo de ensayo con 9mL de agua destilada esterilizada en su interior, con lo que se obtiene la solución 1×10^{-1} de esta concentración se toma 1mL y se lo pasó al siguiente tubo de ensayo con 9mL de agua destilada esterilizada en su interior, con lo que se obtuvo la solución 1×10^{-2} y así sucesivamente, cuando se realiza el pase de las soluciones al siguiente tubo de ensayo. Todo el procedimiento se lo debe de hacer con pipetas esterilizadas o puntas de micropipetas estériles al igual que los tubos de ensayo y el material que se utilizó.
- Con las soluciones preparadas en los tubos de ensayo a partir de la solución madre desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-11} se procedió a sembrar por vertido en placa las disoluciones de 1×10^{-3} 1×10^{-5} 1×10^{-7} y 1×10^{-9} con 3 repeticiones por cada una de estas y se incubó por 48 horas todo este procedimiento es sólo para una muestra de suelo es por ello que este procedimiento se tuvo que repetir con las otras 4 muestras de suelo para estudiar a todas las 5 muestras de microorganismo a obtener en dichas muestras de suelo.
- Esperado el tiempo de incubación se procedió a realizar el conteo con el equipo cuenta colonias en la cual se va a obtener las unidades formadoras de colonias las cual se va a seleccionar en base al número de colonias que crecieron en las cajas Petri de cada una de las disoluciones sembradas anteriormente, el número de nuestra unidad formadora de colonia tiene que estar entre un número de colonias de 30 a 300 colonias desarrolladas (MADIGAN, y otros, 2015).
- Una vez que se supo cuál es la concentración más idónea para la siembra mediante la unidad formadora de colonia o UFC se procedió a realizar las siembras para encontrar nuestras colonias primarias y posteriormente aislarlas.

Fuente: (MORENO LÓPEZ, y otros, 2016)

Realizado por: Orellana A. (2022)

2.13.2. *Siembra de Bacterias Ácido Lácticas (Medio de Cultivo MRS)*

Procedimiento:

- Luego de obtener la concentración de 1×10^{-5} en el tubo de ensayo a partir de la muestra madre se realizó lo siguiente:
- A partir del agar MRS se tomó 7 gramos del mismo y se disolvió en 100mL porque se usa 5 muestras por duplicado de agua destilada ya que cada caja Petri lleva 10mL, esta agua tiene que estar previamente en un pH ácido entre 4.8 a 5.2 aproximadamente.

$$\text{Gramos de Agar MRS que se necesita} = \frac{70g \times 100\text{mL}}{1000\text{mL}} = 7g \text{ de agar MRS}$$

- La mezcla anterior de agar MRS y agua destilada se autoclavó a (120°C por 15 min) con las cajas Petri con las pipetas o puntas de micropipeta etc.
- Se esterilizó la cámara de flujo laminar con alcohol al 96% y con la luz UV para luego proceder a la siembra de la muestra de concentración del del tubo de ensayo de concentración 1×10^{-5} que se obtuvo a partir de la muestra madre en las cajas Petri ya esterilizadas.
- Se realizó la siembra en la cámara de flujo laminar en la que se coloca 1mL del del tubo de ensayo de concentración 1×10^{-5} que se obtuvo a partir de la muestra madre, en cada caja Petri y se dispersa la solución por toda la caja Petri.
- Se procede a colocar las cajas Petri ya sembradas en un desecador o en una cámara de incubación que no permita el paso de oxígeno del exterior.
- Si se utiliza un desecador a este se le enciende el fuego en su interior (vela) y se procede a colocarlo dentro de la incubadora 37°C por 48 horas.
- Se debe realizar la supervisión a las 24 y 48 horas observando el desarrollo de las colonias.

Fuente: (MORENO LÓPEZ, y otros, 2016)

Realizado por: Orellana A. (2022)

2.13.3. *Siembra de Levaduras (Medio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose))*

Procedimiento:

- Este agar se lo puede adquirir en las casas comerciales de reactivos de laboratorio o también se lo puede realizar en el laboratorio o en el lugar en donde se vaya a realizar el trabajo experimental este agar tiene la siguiente formulación

Tabla 4-2: Formulación del Agar YPD

Ingrediente	Cantidad
Peptona	20 g
Agar Bacteriológico	15 g
Dextrosa	20 g
(Cloranfenicol)*	0.05 g
Extracto de Levadura	10 g

Fuente: (CONDALAB, 2021)

Realizado por: Orellana A. (2022)

*Es opcional agregarle según el uso con y sin antibiótico, según se quiera usar exclusivamente levaduras eliminando a bacterias interferentes (NTE INEN 1529-10:2013, 2017)

- El extracto de Levadura se prepara con 454,5 gramos de levadura activa seca y se la mezcla con 600mL de agua y a esta mezcla se la deja por 24 horas a una temperatura de 50°C.
- (Después de obtener la concentración del tubo de ensayo de concentración 1×10^{-5} que se obtuvo a partir de la muestra madre y se a realizó lo siguiente)
- Se parte del agar YPD y se toma 6,5 gramos del mismo y se disuelve en 100mL de agua destilada ya que cada caja Petri lleva 10mL porque se usa 5 muestras por duplicado, esta agua tiene que estar previamente en un pH ácido entre 4.8 a 5.2 aproximadamente.

$$\text{Gramos de Agar YPD requeridos} = \frac{65g \times 100mL}{1000mL} = 6,5g \text{ de agar YPD}$$

- La mezcla anterior del agar YPD con el agua destilada se procede a autoclavar a (120°C por 15 min) con las cajas Petri con las pipetas o puntas de micropipeta etc.
- Se esterilizó la cámara de flujo laminar con alcohol al 96% y con la luz UV para luego proceder a la siembra de la muestra con la concentración 1×10^{-5} a partir de la muestra madre en las cajas Petri ya autoclavadas.

- Se procedió a realizar la siembra en la cámara de flujo laminar en la que se coloca 1mL de 1×10^{-5} a partir de la muestra madre, en cada caja Petri y se dispersa la solución por toda la caja Petri.
- Se procede a colocar las cajas Petri ya sembradas dentro de la incubadora a 30°C por 48 horas.

Fuente: (MORENO LÓPEZ, y otros, 2016)

Realizado por: Orellana A. (2022)

2.13.4. *Siembra de levaduras (Medio De Cultivo Sabouraud)*

Procedimiento:

- Después de obtener la concentración de 1×10^{-5} en el tubo de ensayo a partir de la muestra madre se procede a realizar lo siguiente:
- Se parte del agar Sabouraud y se toma 6,5 gramos del mismo y se disuelve en 100mL de agua destilada ya que cada caja Petri lleva 10mL porque se usa 5 muestras por duplicado, esta agua tiene que estar previamente en un pH ácido entre 4.8 a 5.2

$$\text{Gramos de Agar Sabouraud} = \frac{65g \times 100mL}{1000mL} = 6,5g \text{ de agar Sabouraud}$$

- La mezcla anterior del agar Sabouraud con el agua destilada se la procedió autoclavar a (120°C por 15 min) con las cajas Petri con las pipetas o puntas de micropipeta.
- Se esterilizó la cámara de flujo laminar con alcohol al 96% y con la luz UV para luego proceder a la siembra de la muestra de concentración 1×10^{-5} a partir de la muestra madre en las cajas Petri ya autoclavadas.
- Se realizó la siembra en la cámara de flujo laminar en la que se coloca 1mL del tubo de concentración 1×10^{-5} a partir de la muestra madre, en cada caja Petri y se dispersa la solución por toda la caja Petri.
- Se procede a colocar las cajas Petri ya sembradas dentro de la incubadora a 30°C por 48 horas.

Fuente: (MORENO LÓPEZ, y otros, 2016)

Realizado por: Orellana A. (2022)

2.13.5. *Siembra de bacterias fermentativas*

Procedimiento:

- Después de obtener la concentración de 1×10^{-5} en el tubo de ensayo a partir de la muestra madre se procede a realizar lo siguiente:
- Se inicia utilizando el agar Acetobacter y se toma 3,8 gramos del mismo y se disuelve en 100mL de agua destilada ya que cada caja Petri lleva 10mL porque se usa 5 muestras por duplicado, esta agua tiene que estar previamente en un pH ácido entre 4.8 a 5.2

$$\text{Gramos de Agar Acetobacter} = \frac{38g \times 100mL}{1000mL} = 3,8g \text{ de agar Acetobacter}$$

- La mezcla anterior del agar Acetobacter con el agua destilada se la procedió a autoclavar a (120°C por 15 min) con las cajas Petri con las pipetas o puntas de micropipeta.
- Se esterilizó la cámara de flujo laminar con alcohol al 96% y con la luz UV para luego proceder a la siembra de la muestra de concentración del tubo de ensayo de concentración 1×10^{-5} que se obtuvo a partir de la muestra madre en las cajas Petri ya autoclavadas.
- Se procedió a realizar la siembra en la cámara de flujo laminar en la que se coloca 1mL del tubo de ensayo de concentración 1×10^{-5} que se obtuvo a partir de la muestra madre, en cada caja Petri y se dispersa la solución por toda la caja Petri.
- Se colocó las cajas Petri ya sembradas dentro de la incubadora a 30°C por 72 horas.

FUENTE: (MORENO LÓPEZ, y otros, 2016)

Realizado por: Orellana A. (2022)

2.13.6. *Siembra de levaduras en agar YPD, Sabouraud, con etanol*

Procedimiento:

- Si se va a utilizar agar Sabouraud a este se le debe adicionar) 20 gramos de dextrosa antes de proceder a autoclavar.
- Se debe calcular la cantidad de alcohol y de agua que se va a utilizar para llegar a la concentración requerida en la presente investigación se trabajó con concentraciones de alcohol al 3% 6% y al 8% para lo cual se utiliza la ecuación de $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ se trabaja con 8 muestras, pero se realiza una muestra de más total se trabajó con relación a 9 muestras (90mL).
- Cálculo para concentración de alcohol al 3%

$$3\% \times 90mL = 70\% \times V_2 \quad (8)$$

$$V_2 = \frac{3\% \times 90\text{mL}}{70\%} = 3,86\text{mL de alcohol} \quad (9)$$

$$90\text{mL Agua destilada} - 3,86\text{mL C}_2\text{H}_5\text{OH} = 86,14\text{mL de agua} \quad (10)$$

- Cálculo para concentración de alcohol al 6%

$$6\% \times 90\text{mL} = 70\% \times V_2 \quad (11)$$

$$V_2 = \frac{6\% \times 90\text{mL}}{70\%} = 7,71\text{mL de alcohol} \quad (12)$$

$$90\text{mL Agua destilada} - 7,71\text{mL C}_2\text{H}_5\text{OH} = 82,29\text{mL de agua} \quad (13)$$

- Cálculo para concentración de alcohol al 8%

$$8\% \times 90\text{mL} = 70\% \times V_2 \quad (14)$$

$$V_2 = \frac{8\% \times 90\text{mL}}{70\%} = 10,29\text{mL de alcohol} \quad (15)$$

$$90\text{mL Agua destilada} - 10,29\text{mL C}_2\text{H}_5\text{OH} = 79,71\text{mL de agua} \quad (16)$$

Nota: Esto quiere decir que se mezcla en un frasco de borosilicato para autoclavar 79,71mL de agua destilada con el agar correspondiente y luego de que ya este autoclavado al momento de ir a poner en las cajas Petri ahí se le pone los 10,29mL para completar los 90mL que se necesita de alcohol debido a que este es volátil y lo mismo se haría para el volumen para las concentraciones de 3% y 6% además que el valor de 70% es el grado del alcohol comercial que se va a adicionar hasta llegar a la concentración que requirió.

- Se procedió a hacer la relación del agar Sabouraud se utiliza 65g por litro debido a que son 8 muestras y una extra como testigo se realiza el cálculo para 9 muestras, pero como las concentraciones son al 3% 6% y al 8% se lo hace por triplicado que nos da 270mL de agua destilada con agar Sabouraud además a este agar se le adiciona dextrosa la dextrosa en un agar YPD o Sabouraud de 20 gramos por litro con lo cual:

$$\text{Gramos de dextrosa} = \frac{20\text{g} \times 270\text{mL}}{1000\text{mL}} = 5,4\text{g de dextrosa} \quad (17)$$

$$\text{Gramos Agar Sabouraud} = \frac{65\text{g} \times 270\text{mL}}{1000\text{mL}} = 17,55\text{g de agar Sabouraud} \quad (18)$$

$$5,4\text{g dextrosa} + 17,55\text{g A. Sabouraud} = 22,95\text{ g Mezcla en } 270\text{mL Agua} \quad (19)$$

2.13.7. *Siembra de bacterias en agar acetobacter, con etanol de varias concentraciones*

Procedimiento:

- Si se va a utilizar agar Acetobacter a este se le debe adicionar) 20 gramos de dextrosa antes de proceder a autoclavar.
- Se debe calcular la cantidad de alcohol y de agua que se va a utilizar para llegar a la concentración requerida en la presente investigación se trabajó con concentraciones de alcohol al 3% 6% y al 8% para lo cual se utiliza la ecuación de $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ se trabajó con 8 muestras, pero se realiza una muestra de más, total se trabajó con relación a 9 muestras (90mL).
- Cálculo para concentración de alcohol al 3%

$$3\% \times 90\text{mL} = 70\% \times V_2 \quad (20)$$

$$V_2 = \frac{3\% \times 90\text{mL}}{70\%} = 3,86\text{mL de alcohol} \quad (21)$$

$$90\text{mL Agua destilada} - 3,86\text{mL } C_2H_5OH = 86,14\text{mL de agua} \quad (22)$$

- Cálculo para concentración de alcohol al 6%

$$6\% \times 90\text{mL} = 70\% \times V_2 \quad (23)$$

$$V_2 = \frac{6\% \times 90\text{mL}}{70\%} = 7,71\text{mL de alcohol} \quad (24)$$

$$90\text{mL Agua destilada} - 7,71\text{mL } C_2H_5OH = 82,29\text{mL de agua} \quad (25)$$

- Cálculo para concentración de alcohol al 8%

$$8\% \times 90\text{mL} = 70\% \times V_2 \quad (26)$$

$$V_2 = \frac{8\% \times 90\text{mL}}{70\%} = 10,29\text{mL de alcohol} \quad (27)$$

$$90\text{mL Agua destilada} - 10,29\text{mL } C_2H_5OH = 79,71\text{mL de agua} \quad (28)$$

Nota: Esto quiere decir que se mezcla en un frasco de borosilicato para autoclavar 79,71mL de agua destilada con el agar correspondiente y luego de que ya estese autoclavado al momento de ir a poner en las cajas Petri ahí se le pone los 10,29mL para completar los 90mL que se necesita de alcohol debido a que este es volátil y lo mismo se haría para el volumen para las concentraciones de 3% y 6% además que el valor de 70% es el grado del alcohol comercial que se va a adicionar hasta llegar a la concentración que requirió.

- Se procedió a hacer la relación del agar Acetobacter se utiliza 38g por litro debido a que son 8 muestras y una extra como testigo se realiza el cálculo para 9 muestras, pero como las concentraciones son al 3% 6% y al 8% se lo hace por triplicado que nos da 270mL de agua destilada con agar Sabouraud además a este agar se le adiciona dextrosa la dextrosa en un agar YPD es de 20 gramos por litro con lo cual:

$$\text{Gramos de dextrosa} = \frac{20\text{g} \times 270\text{mL}}{1000\text{mL}} = 5,4\text{g de dextrosa} \quad (29)$$

$$\text{Gramos Agar Acetobacter} = \frac{38\text{g} \times 270\text{mL}}{1000\text{mL}} = 10,26\text{g Agar Acetobacter} \quad (30)$$

$$5,4\text{g dextrosa} + 10,26\text{g A. Acetobacter} = 15,66\text{ g Mezcla en } 270\text{mL } H_2O \quad (31)$$

2.13.8. *Identificación macroscópica de microorganismos de uso agroindustrial*

Procedimiento:

- Se debe analizar las cantidades de colonias con la ayuda de la cuenta colonias existentes en las cajas Petri luego de 48 horas de ser sembradas e incubadas a una temperatura de 31°C.
- Se debe analizar las cantidades de colonias con la ayuda de la cuenta colonias existentes en las cajas Petri luego de 48 horas de ser sembradas e incubadas a una temperatura de 31°C.
- Se procedió a observar en el equipo cuenta colonias características morfológicas como tamaño, color, forma, y apariencia además se debe tener en cuenta el olor que desprende.

- Luego de realizar la evaluación macroscópica de las colonias encontradas se comparó las colonias que se observan en el laboratorio con colonias de microorganismos consultados bibliográficamente no olvidando de diferenciar muy bien bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias fermentativas como las de la familia *lactobacillus*, *saccharomyces* y *acetobacter* (CERDA MOROCHO, y otros, 2020).

2.13.9. Identificación microscópica de lactobacillus

Procedimiento:

- Se debe limpiar y esterilizar el material que se va a utilizar como es el vidrio portaobjetos y el microscopio, así como el lugar en donde se vaya a hacerlo.
- Al vidrio portaobjetos se le adiciona una gota de agua destilada y se toma un poco de la muestra con el asa de siembra previamente flameada al rojo vivo en el mechero y se realiza un frotis en el portaobjetos.
- Se la fija la muestra del microorganismo en el portaobjetos con la ayuda de la flama del mechero con mucho cuidado y se espera a que estese a una temperatura ambiente el portaobjetos.
- A la muestra del microorganismo fijada se le realiza la tinción Gram, luego de esto se le adiciona el aceite de inmersión y se observa en el microscopio con el lente de 100X.
- Luego de obtener una imagen adecuada y bien enfocada se toma capturas fotográficas de estas muestras de varios lugares del portaobjetos.
- Finalmente se debe realizar una evaluación de las colonias de estudio al microscopio que se obtuvo y se la compara con otras imágenes que existan bibliográficamente (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 7).

2.13.10. Identificación microscópica de levaduras

Procedimiento:

- Se debe limpiar y esterilizar el material que se va a utilizar como es el vidrio portaobjetos y el microscopio, así como el mesón en donde se lo haga.
- Al vidrio portaobjetos se le adiciona una gota de agua destilada y se toma un poco de la muestra con el asa de siembra previamente flameada al rojo vivo en el mechero y se realiza un frotis en el portaobjetos.

- Se la fija la muestra del microorganismo en el vidrio portaobjetos con la ayuda de la flama del mechero con mucho cuidado y se espera a que estese a una temperatura ambiente el portaobjetos.
- A la muestra del microorganismo fijada se le realiza la tinción con azul de metileno o colorante de Wright, luego de esto se le adiciona el aceite de inmersión y se observa en el microscopio con el lente de 100X.
- Luego de obtener una imagen adecuada y bien enfocada se toma capturas fotográficas de estas muestras de varios lugares del portaobjetos.
- Finalmente se debe realizar una evaluación de las colonias de estudio al microscopio que se obtuvo y se la compara con otras imágenes que existan en otras investigaciones bibliográficamente (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 73).

2.13.11. Identificación microscópica de bacterias fermentativas

Procedimiento:

- Se debe limpiar y esterilizar el material que se va a utilizar como es el vidrio portaobjetos y el microscopio así también como el sitio en donde se vaya a trabajar tiene que estar esteril.
- Al vidrio portaobjetos se le adiciona una gota de agua destilada y se toma un poco de la muestra con el asa de siembra previamente flameada al rojo vivo en el mechero y se realiza un frotis en el portaobjetos.
- Se la fija la muestra del microorganismo en el portaobjetos con la ayuda de la flama del mechero con mucho cuidado y se espera a que estese a una temperatura ambiente el portaobjetos.
- A la muestra del microorganismo fijada se le realiza la tinción Gram, luego de esto se le adiciona el aceite de inmersión y se observa en el microscopio con el lente de 100X.
- Luego de obtener una imagen adecuada y bien enfocada se toma capturas fotográficas de estas muestras de varios lugares del portaobjetos.
- Finalmente se debe realizar una evaluación de las colonias de estudio al microscopio que se obtuvo y se la compara con otras imágenes que existan bibliográficamente (HERNÁNDEZ-URZÚA, 2016 pág. 7)

2.13.12. Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas

El aislamiento de bacterias ácido lácticas se lo realizó por vertido en placa para obtener las colonias primarias y posteriormente por agotamiento por estrías en nuevas cajas Petri con agar MRS a condiciones de 37°C y un pH entre 4.8 a 5.2 e los dos procedimientos

Procedimiento:

- A partir de la colonia primaria que era de concentración 1×10^{-5} que se la hizo por vertido en placa se observa cuales poseen características morfológicas macroscópicas con parámetros como tamaño, apariencia, color, forma, olor y se las compara con las características de bacterias ácido lácticas que se consulte bibliográficamente y se selecciona las que tengan un mayor parecido
- Se flameó el asa de siembra al rojo vivo y se tomó una colonia la cual en la nueva caja se procedió a hacer un estriado.
- A partir de un extremo del primer estriado se realizó otro estriado a 90 grados sin levantar el asa de siembra evitando sobre pasar el primer estriado y se hace el segundo estriado.
- Al final del borde de donde se realizó el segundo estriado sin levantar se hace otro estriado con el asa de siembra tratando de que este nuevo estriado no se sobreponga al segundo.
- Se envolvió muestras sembradas con Parafilm y se las colocó en un ambiente de anaerobiosis a 37°C con pH entre 4.8 a 5.2 por 48 horas. (HERNÁNDEZ-URZÚA, 2016)
- Pasadas 48 horas se verificó que haya habido desarrollo de estas colonias secundarias, y se examina con el equipo cuenta colonias al estriado y se diferencia de forma macroscópica por características como tamaño, apariencia, color, forma, olor que existan colonias mixtas es decir que existan dos posibles especies diferentes.
- Dependiendo del número de colonias que exista se va a volver a seleccionar a estas, y estas son más fáciles de obtenerlas de la última parte del estriado en donde se hallan las colonias menos concentradas.
- Se va a realizar una nueva siembra dependiendo del número de colonias halladas a partir de las cajas Petri con las colonias secundarias, la siembra se la realiza por estriado de la misma manera que se hizo con las colonias secundarias.
- Se espera 48 horas a partir de la siembra realizada y pasado este tiempo tenemos a nuestras colonias terciarias se tiene que analizar en el equipo cuenta colonias si es que existen mas de dos tipos de colonias diferentes en base a características como tamaño, apariencia, color, forma, olor se tiene que volver a repetir el proceso anterior que es volver a sembrar las colonias de forma independiente en unas nuevas cajas Petri.
- Si es que se observa una homogeneidad con el equipo cuenta colonias en base a características como como tamaño, apariencia, color, forma, olor a las colonias terciarias ya se tendrá un cultivo puro

- Una vez que se tenga un solo tipo de microorganismo en la caja Petri se procede a elegir una muestra y se la pone bajo el microscopio para verificar que exista un solo tipo de microorganismo en la muestra

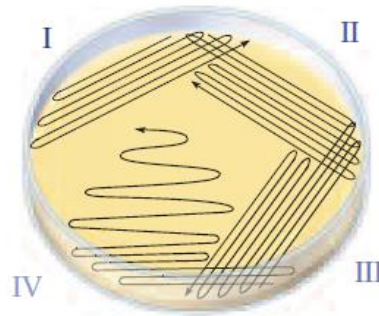


Figura 7-2. Aislamiento mediante siembra por estrías

Fuente: (LEBOFFE, y otros, 2011)

2.13.13. Aislamiento de levaduras

Procedimiento

- Se empezó por autoclavar y todo el material además del lugar que se vaya a utilizar las nuevas cajas Petri con el Agar Sabouraud
- Para un mejor aislamiento se seleccionó a las colonias que resistieron a la concentración de alcohol de 5% a partir del 8% la concentración de alcohol comienza a ser un inhibidor de crecimiento (Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol, 2016) y se los siembra en nuevas cajas Petri con agar Sabouraud más dextrosa y las cuales provienen de la de concentración 1×10^{-5} que se la hizo por vertido en placa.
- Se procedió a utilizar el asa de siembra al rojo vivo flameada y se tomó una colonia la cual en la nueva caja se procedió a hacer un estriado
- A partir de un extremo del primer estriado se realizó otro estriado a 90 grados sin levantar el asa de siembra evitando sobre pasar el primer estriado y se hace el segundo estriado.
- Al final del borde de donde se realizó el segundo estriado sin levantar se hace otro estriado con el asa de siembra tratando de que este nuevo estriado no se sobreponga al segundo.
- Se puso las cajas Petri en incubación por 48 horas a una temperatura de 25°C a 30 °C y en condiciones aerobias (CHATZIPAVLIDIS, y otros, 2013).
- Pasadas 48 horas se verificó que haya habido desarrollo de estas colonias secundarias, y se examina con el equipo cuenta colonias al estriado y se diferencia de forma macroscópica por características como tamaño, apariencia, color, forma, olor que existan colonias mixtas es decir que existan dos posibles especies diferentes.

- Dependiendo del número de colonias que exista se va a volver a seleccionar a estas, y estas son más fáciles de obtenerlas de la última parte del estriado en donde se hallan las colonias menos concentradas.
- Se va a realizar una nueva siembra dependiendo del número de colonias halladas a partir de las cajas Petri con las primeras colonias, la siembra se la realiza por estriado de la misma manera que se hizo con las colonias anteriores.
- Se espera 48 horas a partir de la siembra realizada y pasado este tiempo tenemos a nuestras colonias nuevas, se tiene que analizar en el equipo cuenta colonias si es que existen más de dos tipos de colonias diferentes en base a características como tamaño, apariencia, color, forma, olor se tiene que volver a repetir el proceso anterior que es volver a sembrar las colonias de forma independiente en unas nuevas cajas Petri.
- Si es que se observa una homogeneidad con el equipo cuenta colonias en base a características como tamaño, apariencia, color, forma, olor a las colonias terciarias ya se tendrá un cultivo puro.
- Una vez que se tenga un solo tipo de microorganismo en la caja Petri se procede a elegir una muestra y se la pone bajo el microscopio para verificar que exista un solo tipo de microorganismo en la muestra

2.13.14. Aislamiento de bacterias fermentativas

Al utilizar el agar Acetobacter este lleva carbonato cálcico con lo cual aquellas colonias que presentan un halo transparente a su alrededor son las que están produciendo ácido con lo que son seleccionadas para el aislamiento además de que se debe utilizar a las colonias que tuvieron mayor tolerancia al etanol de concentración mayor para este trabajo de investigación fue la que contenía la concentración del 5% u 8% de alcohol.

Procedimiento:

- Se inició por autoclavar y todo el material además del lugar que se vaya a utilizar las nuevas cajas Petri con el Agar Sabouraud
- Para un mejor aislamiento se seleccionó a las colonias que resistieron a la concentración de alcohol de 8% ya que a partir del 8% la concentración de alcohol comienza a ser un inhibidor de crecimiento (Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol, 2016) y se los siembra en nuevas cajas Petri con agar Acetobacter y las cuales provienen de la de concentración 1×10^{-5} que se la hizo por vertido en placa.
- Se procedió a utilizar el asa de siembra al rojo vivo flameada y se tomó una colonia la cual en la nueva caja se procedió a hacer un estriado

- A partir de un extremo del primer estriado se realizó otro estriado a 90 grados sin levantar el asa de siembra evitando sobre pasar el primer estriado y se hace el segundo estriado.
- Al final del borde de donde se realizó el segundo estriado sin levantar se hace otro estriado con el asa de siembra tratando de que este nuevo estriado no se sobreponga al segundo.
- Se puso las cajas Petri en incubación por 48 horas a una temperatura de 25°C a 30 °C y en condiciones aerobias (CHATZIPAVLIDIS, y otros, 2013).
- Pasadas 48 horas se verificó que haya habido desarrollo de estas colonias secundarias, y se examina con el equipo cuenta colonias al estriado y se diferencia de forma macroscópica por características como tamaño, apariencia, color, forma, olor que existan colonias mixtas es decir que existan dos posibles especies diferentes.
- Dependiendo del número de colonias que exista se va a volver a seleccionar a estas, y estas son más fáciles de obtenerlas de la última parte del estriado en donde se hallan las colonias menos concentradas.
- Se va a realizar una nueva siembra dependiendo del número de colonias halladas a partir de las cajas Petri con las primeras colonias, la siembra se la realiza por estriado de la misma manera que se hizo con las colonias anteriores.
- Se espera 48 horas a partir de la siembra realizada y pasado este tiempo tenemos a nuestras colonias nuevas, se tiene que analizar en el equipo cuenta colonias si es que existen más de dos tipos de colonias diferentes en base a características como tamaño, apariencia, color, forma, olor se tiene que volver a repetir el proceso anterior que es volver a sembrar las colonias de forma independiente en unas nuevas cajas Petri.
- Si es que se observa una homogeneidad con el equipo cuenta colonias en base a características como como tamaño, apariencia, color, forma, olor a las colonias terciarias ya se tendrá un cultivo puro.
- Una vez que se tenga un solo tipo de microorganismo en la caja Petri se procede a elegir una muestra y se la pone bajo el microscopio para verificar que exista un solo tipo de microorganismo en la muestra.

2.13.15. Identificación bioquímica de los microorganismos

Prueba de Tinción Gram

La técnica de la tinción de Gram fue desarrollada en 1884, por el bacteriólogo danés, Christian Gram, esta técnica permite separar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram-positivas y Gram-negativas, basados en si retienen o no, el colorante primario (cristal violeta) luego del proceso de coloración.

Los organismos que retienen el color violeta se designan como Gram-positivas y aquellos que pierden el color violeta después de la decoloración con alcohol (acetona), y se tiñen con el siguiente colorante (safranina) y aparecen como rojos, se denominan Gram-negativas. Una reacción positiva o negativa a la Tinción de Gram es realmente importante, ya que nos puede dar una idea clara de una primera clasificación de las bacterias en estudio. (GONZÁLEZ, y otros, 2020)

Después de 72 horas en la incubadora a 37°C, se observa notablemente el crecimiento de cada una de las cepas en los diferentes pH, por lo que fue necesario realizar una Tinción de Gram y observar en un microscopio, para comprobar o diferenciar cada una de las cepas. (GONZÁLEZ, y otros, 2020)

Prueba KOH

Esta prueba es un método rápido de confirmación de la tinción Gram.

La ausencia de formación de hilo mucoide nos informa de la resistencia de la pared bacteriana a la solución alcalina, de modo que si la prueba KOH nos da resultado negativo (no hay hilo mucoide), la bacteria será Gram positiva, y viceversa.

El método utilizado es similar al de la catalasa. Se recoge por raspado una colonia de la placa de agar con la cepa crecida y se lleva a un portaobjetos. Se le añade una gota de KOH al 3% y se observa la aparición de hilo mucoide, (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 77)

Prueba de movilidad

Con la aguja de inoculación se toma una cepa fresca de un medio de cultivo sólido. Sembrar en línea recta por punción profunda en medio Sim, tratando de abarcar 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h, en aerobiosis.

Las cepas móviles producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra, mientras que en las cepas inmóviles el crecimiento se observa solamente en la línea de siembra. (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 77)

Prueba de fermentación de azúcares

Procedimiento:

- En esta prueba luego del aislamiento o purificación se procede a enriquecer las muestras que se aisló en agua de peptona
- Se las deja por 24 o 48 horas, luego se prepara el caldo rojo fenol con glucosa
- Luego se va a agregar los azúcares que fermentan la familia de las acetobacterias el caldo rojo fenol más glucosa se prepara de esta forma:

Reactivos	Cantidad
Peptona	20 g
Glucosa	20 g
Sorbato de potasio*	0.5 g
Extracto de Levadura	10 g

Tabla 5-2: Preparación de fermentación de azúcares

Fuente: (REYNOSO, y otros, 2015)
Realizado por: Orellana A. (2022)

- Por lo que se utiliza más la glucosa para hacer el caldo y se lo coloca en tubos de ensayo y se lo esteriliza en el autoclave posteriormente se agrega 1mL de la muestra enriquecida y se deposita dentro de los tubos con el caldo rojo fenol más glucosa estéril de color naranja y este al cabo de 24 o 48 horas el tono del caldo se torna amarillo quiere decir que existe fermentación es decir resultado positivo si el tubo con el caldo rojo fenol más glucosa si no cambió de color y se mantiene naranjado quiere decir que dio negativo a fermentación (REYNOSO, y otros, 2015)

Calculo

- Se debe calcular la cantidad de caldo que se vaya a utilizar antes
- Se debe reportar de manera cualitativa cosas como la liberación de CO₂
- Se debe tener en cuenta la medición de pH y anotar esto (REYNOSO, y otros, 2015)
- Cabe mencionar que se debe utilizar otros azúcares en vez de la glucosa y especialmente el azúcar lactosa ya que este las bacterias ácido lácticas lo degradan con mucha más facilidad que los otros azúcares como fructuosa, manitol, galactosa, manosa etc.

Prueba de fermentación de Levadura

Las colonias que fueron aisladas se las recoge y se las enriquece en caldo de peptona en tubos de ensayo por 24 o 48 horas, luego se procede a agregar en caldo YPD con agua en tubos de ensayo con un pH de 7.0 el cuál se compone de:

Tabla 6-2: Preparación del caldo YPD

Reactivos	Cantidad
-----------	----------

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

Fuente: (REYNOSO, y otros, 2015)

Realizado por: Orellana A. (2022)

Es opcional agregarle según el uso con y sin antibiótico, según se quiera usar exclusivamente levaduras o con bacterias fermentativas

- Luego se le adiciona el indicador de Rojo Fenol hasta obtener una coloración correspondiente a un pH 7.5 el cual tiene un tono naranja correspondiente a la siguiente gráfica
- Pasadas 24 o 36 horas en incubación a 31°C se realiza la observación en la cual mediante el cambio de color se puede determinar que:
- Que si se es que las muestras en los tubos de ensayo se vuelven de un tono amarillo intenso el resultado es positivo para producción de ácido.
- Si por el contrario la tonalidad permanece en la tonalidad inicial o si cambia a un tono rosado o violeta es un resultado negativo a la producción de ácido (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 83)

Prueba de producción de CO₂

Las muestras que fueron aisladas de la resistencia al alcohol y el inhibidor de crecimiento de bacterias fermentativas (antibiótico):

Procedimiento:

- Se las procede a enriquecer por 24 o 48 horas en agua de peptona en tubos de ensayo, después se prepara caldo YPD en tubos de ensayo y a estos se les introduce tubos Durham sin dejar ninguna burbuja de aire y se procede a autoclavar luego con el asa de siembra.
- Se recoge un poco de las muestras enriquecidas en agua de peptona y se las inocula dentro de los tubos con el caldo YPD y se procede a incubar, luego de 24 a 48 horas se realiza la observación
- en las cuales si se observa que existe burbujas de gas dentro de los tubos Durham quiere decir que dicha muestra dio positiva a producción de gas (CO₂) la cual es producto de una fermentación (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 82)

Prueba de resistencia al alcohol

Si se va a utilizar agar Sabouraud a este se le debe adicionar) 20 gramos de dextrosa antes de proceder a autoclavar) también se puede hacerlo en caldo YPD el cual tiene esta formulación (PARÉS, y otros, 2012 pág. 45)

Tabla 7-2: Preparación de resistencia al alcohol

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

Fuente: (PARÉS, y otros, 2012 pág. 45)

Realizado por: Orellana A. (2022)

Es opcional agregarle según el uso con y sin antibiótico, según se quiera usar exclusivamente levaduras o con bacterias fermentativas

Se debe calcular la cantidad de alcohol y de agua que se va a utilizar para llegar a la concentración requerida en la presente investigación se trabajó con concentraciones de alcohol al 8% para elegir la resistencia para lo cual se utiliza la ecuación de $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ por ejemplo si se trabaja con 8 muestras, pero se realiza una muestra de más total se trabajó con relación a 9 muestras (90mL) en cada tubo de ensayo 10mL se procede a hacer el cálculo para concentración de alcohol al 8%

$$8\% \times 90\text{mL} = 70\% \times V_2 \quad (33)$$

$$V_2 = \frac{8\% \times 90\text{mL}}{70\%} = 10,29\text{mL de alcohol} \quad (34)$$

$$90\text{mL Agua destilada} - 10,29\text{mL} = 79,71\text{mL de agua} \quad (35)$$

Nota:

Esto quiere decir que se mezcla en un frasco de borosilicato para autoclavar 79,71mL de agua destilada con el agar correspondiente y luego de que ya estese autoclavado al momento de ir a poner en las cajas Petri ahí se le pone los 10,29mL para completar los 90mL que se necesita de

alcohol debido a que este es volátil y lo mismo se haría para el volumen para otras concentraciones de alcohol según se lo requiera

Se procede a hacer la relación del agar Sabouraud se utiliza 65g por litro se siembra en cajas Petri o de caldo YPD que se utiliza 50g por litro este se lo hace en tubos de ensayo debido a que se puso de ejemplo que fueran 8 muestras y una extra como testigo se realiza el cálculo para 9 muestras, pero como las concentraciones 8% nos da 90mL de agua destilada con agar Sabouraud o en tubos de ensayo con caldo YPD además a este agar se le adiciona dextrosa en el agar YPD es de 20 gramos por litro con lo cual

$$\text{Gramos de dextrosa} = \frac{20\text{g} \times 270\text{mL}}{1000\text{mL}} = 5,4\text{g de dextrosa} \quad (36)$$

Para agar Sabouraud

$$\text{Gramos Agar Sabouraud} = \frac{65\text{g} \times 270\text{mL}}{1000\text{mL}} = 17,55\text{g de agar Sabouraud} \quad (37)$$

$$5,4\text{g dextrosa} + 17,55\text{g A. Sabouraud} = 22,95 \text{ g Mezcla en } 270\text{mL Agua} \quad (38)$$

Para caldo YPD

$$\text{Gramos Caldo YPD} = \frac{50\text{g} \times 270\text{mL}}{1000\text{mL}} = 13,5\text{g de caldo YPD} \quad (39)$$

$$5,4\text{g dextrosa} + 17,55\text{g A. Sabouraud} = 22,95 \text{ g Mezcla en } 270\text{mL Agua} \quad (40)$$

Las muestras dan positivo si se observa turbidez al cabo de 24 o 48 horas si no existe turbidez y ningún cambio quiere decir que la prueba es negativa (PARÉS, y otros, 2012 pág. 45)

Fermentación de bacterias Ácido Lácticas

Como es sabido las bacterias ácido lácticas degradan con mayor facilidad la lactosa la cual es el azúcar de la leche, pero además este tipo de bacterias se les dificulta un poco más en degradar otros azúcares.

Antes de realizar la inoculación de los bacterias ácido lácticas en leche se debe hacer un enriquecimiento de estas en peptona o caldo MRS un día antes de relizar la inoculación en la leche.

Procedimiento:

- Se esteriliza el material que se vaya a esterilizar como son pipetas, vaso de precipitación, probetas y también un recipiente de preferencia de plástico de unos 500mL
- Se esteriliza además el recipiente en el cual se va a colocar la leche y también se hace una pasteurización a la leche o por el contrario se puede utilizar una leche ya esteril y pasteurizada
- La leche pasteurizada se la lleva a los recipientes plásticos previamente esterilizados y herméticos aproximadamente unos 250 o 300mL se coloca en el recipiente.
- De las muestras que fueron enriquecidas se toma 1mL y se la inocula en el recipiente con la leche y se espera 48 horas
- Luego de haber dejado pasar las 48 horas se procede a observar los recipientes con la leche.
- Debido a que la leche tiene lactosa esta tuvo que haberse venido a degradar dando una apariencia de leche cortada en la cual se puede determinar que las bacterias están metabolizando la lactosa siendo esto un resultado positivo a la fermentación.

Fermentación de levaduras

Este proceso nos permite saber la viabilidad de las levaduras por lo que es un proceso un poco largo ya que se centra en el plano biológico por interacción antagónica

Tabla 8-2: Componentes fermentación de levaduras

Materiales y reactivos
-Muestra previamente enriquecida
-Estufa
-Cucharas
-Vaso de Precipitación (500mL)
-Jugo de cítricos
-Azúcar
-Baño maría
-Botellas de plástico de 500mL
-Agua esterilizada
-Guantes, cofia
-Pipetas (micropipeta)
-Pera de succión
-Trípode metálico
-Malla de asbesto

Realizado por: Orellana A. (2022)

Procedimiento:

- Se procede a esterilizar los recipientes y los utensilios en donde se va a realizar el sustrato como pueda ser la olla las cucharas las pinzas y las botellas de plástico y la superficie de trabajo.
- Luego se mezcla agua con azúcar en una proporción 2:1 y se mezcla muy lentamente hasta que se disuelva por completo el azúcar y se reserva.
- Se va a calentar el jugo de naranja muy lentamente hasta que llegue a una temperatura de entre 70 – 80°C por unos 5 a 10 minutos simulando a una pasteurización.
- Luego se mezcla el almíbar con el zumo del cítrico calentado y pasteurizado.
- Se va a llenar aproximadamente unos 350mL de la mezcla zumo almíbar en las botellas plásticas se toma una pequeña muestra para medir su pH o grados brix.
- Se va a tomar 1mL con la micropipeta o la pipeta estéril de la muestra, de las levaduras las cuales se tienen que haber enriquecido en un caldo nutritivo 24 o 48 horas antes de inocularlo y se lo va a colocar dentro de las botellas con el almíbar.
- Se lleva las botellas plásticas inoculadas a una incubadora a unos 30°C y cerradas luego de 24 horas se procede a verificarlas si es que existe actividad biológica en forma de burbujas hay que proceder a dejar liberar el gas y proceder a cerrar de nuevo.
- Todos los días hay que repetir este proceso y evitar que las botellas se queden con demasiado gas en su interior.
- La medición de pH se puede hacerlo cada semana o cada 3 días o según como se quiera obtener datos más precisos para esto se tomará 1mL con una pipeta estéril dentro de la cámara de flujo laminar y se procederá a hacer la medición de pH o grados brix según se requiera, hay que tener en cuenta que dependiendo del dispositivo medidor de pH va a ser la cantidad que se dé sustrato que se debe prepara ya que una vez hecha la medición se debe evitar regresar este zumo de nuevo a las botellas para evitar la contaminación microbiana
- A partir de los primeros 7 días se empieza a percibir un olor a alcohol con esto se sabe que existe una fermentación alcohólica y se tiene que esperar un tiempo mínimo de 1 mes y este es el tiempo mínimo para que las levaduras que se inocularon hayan podido eliminar a bacterias patógenas las mismas que se hallan compitiendo por los nutrientes antes de dicho tiempo
- Se puede hacer la comprobación del proceso tomando 1 gota del sumo y hacer un frotis con tinción Gram y llevarlo al microscopio para verificar la presencia de los microorganismos

Nota: hay que tener en cuenta la cantidad de zumo a preparar dependiendo de cuantas veces se vaya a sacar el zumo para a ver la medida de pH y además hay que ser muy cuidadoso de que todo sea inocuo y estéril en todo momento para la realización del proceso

Fermentación de bacterias fermentativas no lácticas

Este proceso nos permite saber la viabilidad de las bacterias fermentativa como serían las acetobacterias por lo que es un proceso un poco largo ya que se centra en el plano biológico por interacción antagónica (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 83)

Tabla 9-2: Material bacterias fermentativas

Materiales y reactivos
-Estufa
-Cucharas
-Vaso de Precipitación (500mL)
-Jugo de cítricos
-Azúcar
-Baño maría
-Botellas de plástico de 500mL
-Agua esterilizada
-Guantes, cofia
-Pipetas (micropipeta)
-Pera de succión

Realizado por: Orellana A. (2022)

Procedimiento:

- Se procede a esterilizar los recipientes y los utensilios en donde se va a realizar el sustrato como pueda ser la olla las cucharas las pinzas y las botellas de plástico y la superficie de trabajo
- Luego se mezcla agua con azúcar en una proporción 2:1 y se mezcla muy lentamente hasta que se disuelva por completo el azúcar y se reserva.
- Se va a calentar el jugo de naranja muy lentamente hasta que llegue a una temperatura de entre 70 – 80°C por unos 5 a 10 minutos simulando a una pasteurización.
- Luego se mezcla el almíbar con el zumo del cítrico calentado y pasteurizado previamente.
- Se va a llenar aproximadamente unos 350mL de la mezcla zumo almíbar en las botellas plásticas se toma una pequeña muestra para medir su pH o grados brix.

- Se va a tomar 1mL con la micropipeta o la pipeta estéril de la muestra, de las bacterias acéticas las cuales se tienen que haber enriquecido en un caldo nutritivo 24 o 48 horas antes de inocularlo y se lo va a colocar dentro de las botellas con el almíbar
- Se lleva las botellas plásticas inoculadas a una incubadora a unos 30°C y no cerrarlas completamente, puesto que las bacterias fermentativas como las acéticas sobreviven muy bien en presencia de oxígeno, luego de 24 horas se procede a verificarlas si es que existe actividad biológica en forma de burbujas hay que proceder a dejar liberar el gas y proceder a tratar de no cerrarlas porque tiene que existir la entrada de aire, pero evitando que queden no queden muy expuestas por una posible contaminación.
- Todos los días hay verificar la actividad de las acetobacterias viendo si existe la liberación de dióxido de carbono, esto se verifica por la existencia de un burbujeo.
- La medición de pH se puede hacerlo cada semana o cada 3 días o según como se quiera obtener datos más precisos para esto se tomará 1mL con una pipeta estéril dentro de la cámara de flujo laminar y se procederá a hacer la medición de pH o grados brix según se requiera, hay que tener en cuenta que dependiendo del dispositivo medidor de pH va a ser la cantidad que se de sustrato que se debe prepara ya que una vez hecha la medición se debe evitar regresar este zumo de nuevo a las botellas para evitar la contaminación microbiana.
- A partir de 1 mes se empieza a percibir un olor a alcohol y ahí es el tiempo mínimo para que las bacterias fermentativas que se inocularon hayan podido eliminar a bacterias patógenas las cuales se hallan compitiendo por los nutrientes en los primeros días.
- Se puede hacer la comprobación del proceso tomando 1 gota del sumo y hacer un frotis con tinción Gram y llevarlo al microscopio para verificar la presencia de los microorganismos.

Nota: hay que tener en cuenta la cantidad de zumo a preparar dependiendo de cuantas veces se vaya a sacar el zumo para a ver la medida de pH y además hay que ser muy cuidadoso de que todo sea inocuo y estéril en todo momento para la realización del proceso

Medición de pH de las muestras a fermentación

El pH se puede proceder a medir con un potenciómetro para lo cual se va a esterilizar las puntas de micropipetas o pipetas, luego se va a tomar una muestra de 5mL o 10mL y se va a proceder a ubicarlo en un vaso de precipitación.

Luego se toma potenciómetro se lo lava muy bien con agua destilada y se va a proceder a ubicarlo dentro del vaso con el zumo y observar su pH cabe mencionar que el potenciómetro tiene que

estar bien calibrado para evitar errores de lectura, la medición del pH se lo debe hacer con mucho cautela y no dejando esperar mucho tiempo, pero eso depende del tiempo de fermentación que se use, en la presente investigación se dejó pasar un tiempo de más de 30 días para poder ver el cambio hasta el proceso de fermentación.

Prueba de Producción de ácido sulfhídrico

Esta prueba se la realiza para ver si aparte de la producción de CO₂ producto de la fermentación también existe desprendimiento de ácido sulfhídrico el cual es nocivo para el ser humano, esta prueba se la realiza luego de que se somete a fermentación a las distintas colonias de acetobacterias, levaduras o bacterias lácticas a estudiar se procede a preparar la solución de acetato de plomo.

Si se lo tiene en estado sólido se toma 1g de acetato de plomo y se lo mezcla con 10mL de agua destilada, otra de forma de preparar la solución de acetato de plomo es adicionando 1mL de ácido acético glacial a 100mL de una solución de acetato de plomo que haya sido preparada al 5% es decir que se añade una parte de solución del acetato de plomo con una parte en 5% de volumen (NTE INEN 790:2012, 2016 pág. 1).

Si el trozo de papel se vuelve de un tono oscuro significa que la prueba es positiva con lo cual estas levaduras no se deben usar para fines agroindustriales si por el contrario el papel queda del mismo color es decir no existe un cambio en el color del papel esto significa que la prueba es negativa con lo cual estas bacterias fermentativas si son aptas para un uso agroindustrial o alimentario. (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 83)

2.13.16. Identificación de especies microbiológicas con el software ABIS

Se utilizó el programa Abis online bacterial identification de la página de identificación bacteriana con la que gracias a su base de datos se puede saber un poco más de que especie se puede estar encontrando el enlace de la página es la siguiente

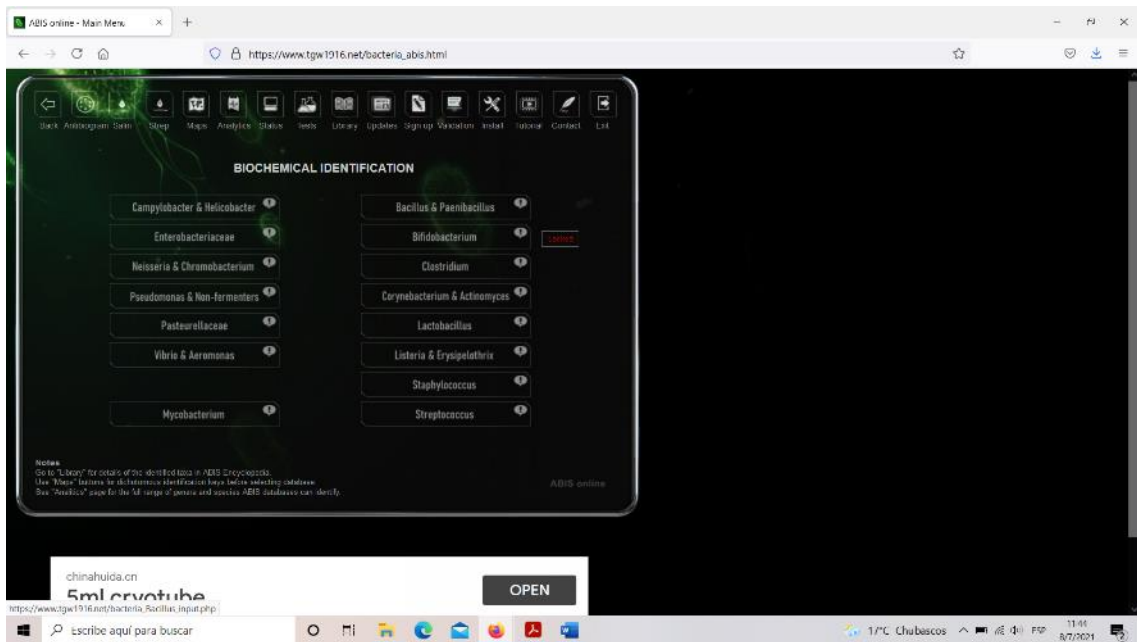


Figura 8-2. Página de identificación bioquímica

Fuente: (ABIS ONLINE BIOCHEMICAL IDENTIFICATION, 2021)

Con los resultados y sabiendo que queremos encontrar se selecciona el tipo de microorganismo que se desea investigar y se lo selecciona

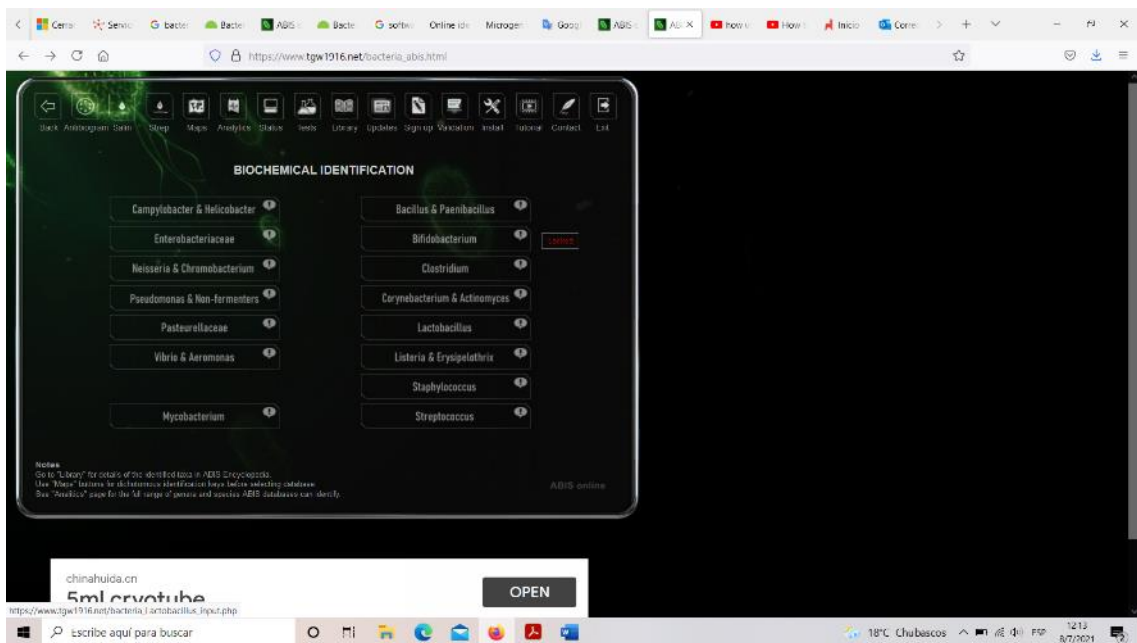


Figura 9-2. Elección del tipo de microorganismo a investigar

Fuente: (ABIS ONLINE BIOCHEMICAL IDENTIFICATION, 2021)

A esta mediante los resultados de laboratorio según las tablas arriba descritas y llenando las bases de dato del software

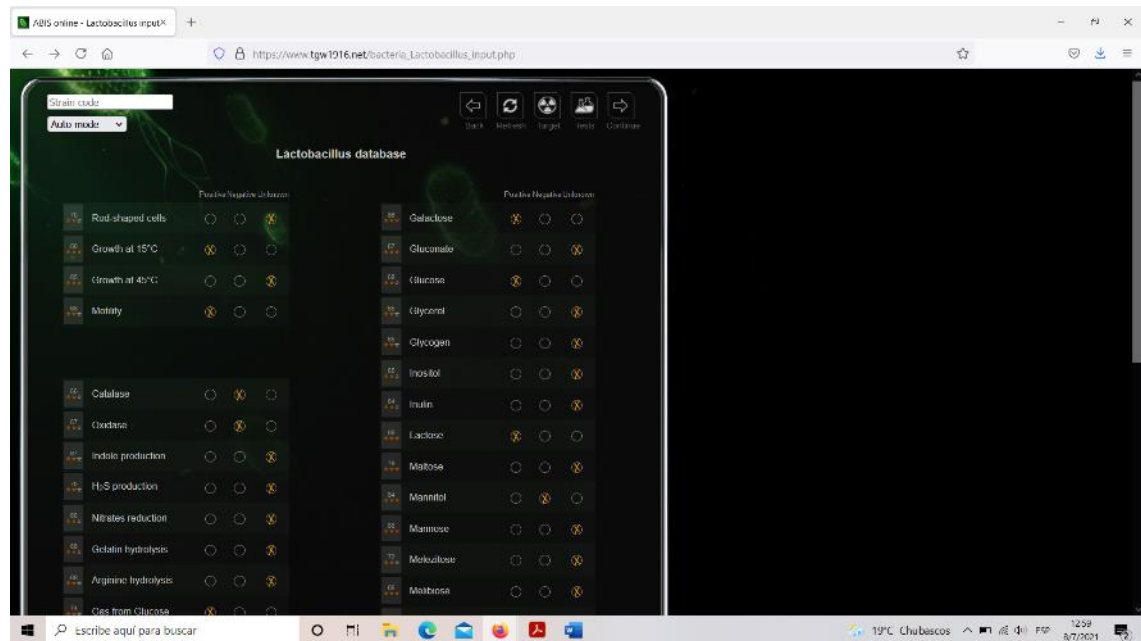


Figura 10-2. Elección de las pruebas bioquímicas

Fuente: (ABIS ONLINE BIOCHEMICAL IDENTIFICATION, 2021)

Con los resultados que se obtuvieron en las pruebas bioquímicas se va a ir llenando los tipos de pruebas que se hizo de cada una de las muestras que se obtuvieron, cabe mencionar que entre más pruebas bioquímicas se realice la predicción va a ser mucho más exacta la identificación en este caso con una bacteria ácido láctica

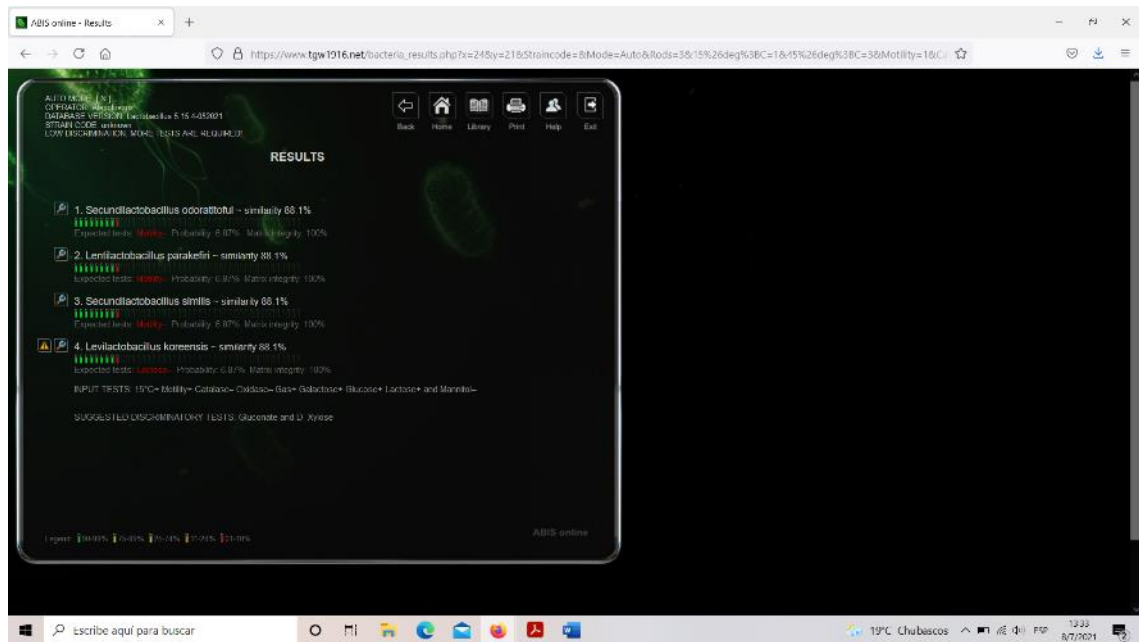


Figura 11-2. Aproximación de microorganismo estudiado

Fuente: (ABIS ONLINE BIOCHEMICAL IDENTIFICATION, 2021)

Con lo cual existe una coincidencia del 88% con las especies en base de datos cuando se utiliza las pruebas bioquímicas al momento de llenar los parámetros

- *Secundilactobacillus odoratitofui*
- *Lentilactobacillus parakefiri*

2.13.17. Medición de la cantidad de humedad en las muestras de suelo

Procedimiento:

- Se inicia este paso con el tamizado de la muestra fresca de suelo y se recoge y se pesa 5 gramos en una balanza analítica los cuales se los deposita en papel aluminio cada muestra de forma independiente
- Aparte se toma unos crisoles y se los deposita en una mufla a 600°C por 6 horas luego del tiempo transcurrido se los lleva con cuidado con unas pinzas a un desecador hasta que se enfríe y luego de esto se toma nota del peso de los crisoles
- Luego de esto se toma la muestra de 5 gramos de suelo fresco y se los deposita en los crisoles y se procede a hacer un pesaje de estos y se toma apuntes del resultado luego los crisoles con la muestra de suelo fresco ya pesados se proceden a realizar una calcinación por 5 horas removiendo la muestra de suelo cada 20 minutos con una varilla

de agitación tratando que el suelo que se encuentra en la superficie llegue a la base del crisol.

- La cantidad de agua o de humedad será la diferencia entre el peso del suelo fresco es decir los 5 gramos menos el peso del crisol muflado con la muestra ya calcinada al final luego de haber pasado las 5 horas en calcinación (VARGAS, y otros, 2009)

Cálculos:

- Se realiza al inicio y al final los pesos de los crisoles y tener cuidado con estos pesos
- Reportar de manera cuantitativa cosas como el peso durante las horas de calcinación en incineración cuando ya sea constante (VARGAS, y otros, 2009)

2.13.18. Medición de la cantidad de materia orgánica en las muestras de suelo

Procedimiento

- El proceso se inicia con el tamizado de la muestra fresca de suelo y se recoge y se pesa 5 gramos en una balanza analítica los cuales se los deposita en papel aluminio cada muestra de forma independiente y se los lleva a unos crisoles los cuales se procede a realizar una calcinación por 5 horas removiendo la muestra de suelo cada 20 minutos con una varilla de agitación tratando que el suelo que se encuentra en la superficie llegue a la base del crisol.
- Aparte se toma trozos cuadrados de papel aluminio aproximadamente de 7cm por lado y se los pesa en la balanza analítica y se anota el peso.
- Concluida la calcinación de 5 horas la muestra de suelo calcinado se la coloca en el papel aluminio recién pesado del paso anterior
- Aparte se toma otros crisoles dependiendo del número de muestras dependerá el número de crisoles que se va a necesitar, se procede a realizar un pesaje de los crisoles vacíos frescos se los lleva a una mufla a unos 600°C por 6 horas luego de esto se procede a retirarlos con mucho cuidado y con la ayuda de unas pinzas debido a la alta temperatura hacia un desecador en el cual se espera a que se enfríe, después de que estese frío se lo lleva a la balanza analítica y se realiza un pesaje de los crisoles y se toma apuntes.
- Luego la muestra de los 5 gramos de suelo calcinado y pesado con el papel aluminio se los deposita en los crisoles recién pesados tratando de que toda la muestra calcinada caiga dentro de los crisoles y se realiza un nuevo pesaje de los crisoles desecados ahora con la muestra de suelo en su interior en una balanza analítica y se toma apuntes de los resultados.
- Como último paso se toma el crisol con la muestra de suelo calcinado en su interior y se la lleva a la mufla a 600°C por 6 horas luego de este tiempo se saca la muestra de la

mufla con unas pinzas y se la lleva al desecador hasta que se enfríe, luego de esto se procede a realizar un pesaje de los crisoles con las muestras de suelo en su interior en una balanza analítica y se toma apuntes del peso observado.

- La cantidad de materia orgánica se la calcula con el peso que se anotó del crisol vacío que se lo puso en la mufla por 6 horas, restándole el peso que nos dio al final luego de haber puesto la muestra de suelo calcinada en el crisol que se lo puso en la mufla por 6 horas es decir la diferencia del crisol muflado al inicio y con la muestra final del suelo proveniente de la calcinación (VARGAS, y otros, 2009)

Cálculos:

- Se realiza al inicio y al final los pesos de los crisoles y tener cuidado con estos pesos
- Reportar de manera cuantitativa cosas como el peso durante las horas de calcinación en incineración cuando ya sea constante para evitar errores
- Los resultados deben anotarse para sacar la materia orgánica mediante la diferencia de lo que se calcinó y se incineró es decir al inicio y al final. (VARGAS, y otros, 2009)

2.13.19. Medición de la cantidad de nitrógeno en las muestras de suelo

Procedimiento:

- Para medir la cantidad de nitrógeno en las muestras de suelo se lo hizo por digestión como el método Kjeldahl que se lo utiliza para determinar la cantidad de nitrógeno en alimentos.
- Para la investigación se tomó 9 partes de $\text{Na}_2(\text{SO}_4)$ (sulfato de sodio) y se mezcla con $\text{Cu}(\text{SO}_4)$ (sulfato de cobre) y se mezcla hasta obtener una mezcla homogénea después se lo va colocar en papel bond y se las cierra completamente a manera de sobre hay que dejarlo en forma rectangular para que pueda entrar en el balón
- Luego se tomó 2g de muestra de suelo fresca previamente tamizada sin restos de material orgánico como vegetales, insectos etc. después se lo va colocar en papel bond y se las cierra completamente a manera de sobre además de dejarlo en forma rectangular para que pueda entrar en el cuello del balón
- Las muestras anteriores tanto del suelo como de los reactivos $\text{Na}_2(\text{SO}_4)$ y $\text{Cu}(\text{SO}_4)$ se las coloca dentro de un matraz de balón, hay que introducirlas y a estas se le adiciona 25mL de H_2SO_4 en el equipo digestor por aproximadamente 1 hora y media, o cuando adquiera la muestra una tonalidad verde claro y que esta mantenga tal color luego de bajar la temperatura del matraz
- Pasado el tiempo digerado se lo deja que se enfríe al ambiente al balón con la muestra con mucho cuidado sacar al matraz y adicionar 200mL de agua destilada luego se agrega

100mL de NaOH (hidróxido de sodio) y también se le agrega las granallas de zinc las cuales vienen en estado sólido en toda esta preparación hay que mantener la agitación constante con la mano para evitar una mejor disipación del calor

- En otro matraz, tipo Erlenmeyer se va a colocar 100mL de H₃BO₃ (ácido bórico) AL 25% y en este será en donde se recoja el líquido destilado
- Luego se toma el matraz de balón con las muestras digestadas y se lo lleva hacia el destilador (en la parte de arriba se localiza) mientras que el matraz tipo Erlenmeyer (en la parte de abajo), el destilado que se obtiene tiene que llegar hasta estar entre los 200 – 250mL del matraz en donde se encuentra el H₃BO₃
- Este destilado mezclado con el ácido bórico recogido en el matraz Erlenmeyer se lo lleva para hacer la titulación
- Finalmente se procede a realizar la titulación con HCl (ácido clorhídrico) en la bureta, y adicionando el indicador mixto (4gotas) al titulado que es el destilado y luego se procede a hacer los cálculos pertinentes para obtener cantidad de nitrógeno (VARGAS, y otros, 2009)

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

Procedimiento:

- Se toma una muestra de suelo fresco de 5g el cual debe estar de manera homogénea y libre de impurezas como restos vegetales o animales es decir que de ser posible tamizarla para una mayor homogeneidad de las partículas
- El suelo obtenido de 5 gramos se va a mezclar con 15mL de agua destilada en un matraz pequeño y se lo va a agitar en un vórtex.
- Se debe preparar los papeles filtro, embudos y matraces dependiendo del número de muestras que se desea analizar y etiquetarlos
- Luego la mezcla del suelo con el agua, se va a vaciarla por completo en los embudos con el papel filtro y se va a esperar a que se obtenga un filtrado en el nuevo matraz
- Pasadas unas 4 o 5 horas o cuando el agua se haya filtrado por completo se va a retirar y se va proceder a llevarlos hacia el equipo espectrofotométrico
- Se va a tomar el filtrado y se va a colocar en la celda del espectrofotómetro que es de aproximadamente 10mL y a este se le va adicionar el reactivo de lectura del mineral en nuestro caso el reactivo de potasio que viene en forma de polvo en un sobre
- Se coloca la celda dentro del espectrofotómetro y se procede a darle inicio para que el equipo haga la lectura al final en la pantalla nos indicará la cantidad en forma de mg/L es decir miligramos por litros de potasio en la muestra

Cálculos:

- Se realiza al final la anotación de la cantidad mostrada en la pantalla del espectrofotómetro
- Reportar de manera cuantitativa
- Los resultados deben y se indican en miligramos por litro

2.13.21. Conservación de microorganismos de uso agroindustrial

Procedimiento:

- Anteriormente a las muestras de bacterias ácido lácticas, bacterias fermentativas o levaduras que se han aislado y seleccionado hay que enriquecerlas de 24 a 48 horas en caldo de peptona (agua de peptona) la cual se la prepara en tubos de ensayo de forma estéril es decir autoclavando.
- Para la conservación se lo realizó en nitrógeno líquido para lo cual se procede a preparar una solución de glicerol al 25% o 30% para lo cual el glicerol en forma comercial se lo encuentra al 99,9% con lo cual se va a asumir que está al 100% de pureza con lo cual hay que llevarlo a una concentración de 25 al 30%

$$C_3H_8O_3 \text{ al } 30\% = \frac{30\% \text{ buscado} \times 100\text{mL}}{100\% \text{ pureza}} = 30\text{mL glicerol se necesita}$$

- Se necesita 30mL de glicerol puro disuelto en 100mL de agua destilada para obtenerlo al 30%.

Posterior a esto la solución de glicerol preparada se lo mezcla en proporción de 50/50 con las muestras enriquecidas en agua de peptona de las bacterias fermentativas

Cálculos:

- Se realiza la cantidad de agua y glicerol que se requiere
- Reportar de manera cuantitativa cuanto de muestra se utilizó
- Los cálculos de los reactivos utilizados se deben tener guardados para reportarlos en el laboratorio

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de resultados

3.1.1. Caracterización del suelo de bosque primario del Cantón Colta

- *pH del suelo de bosque primario*

Las muestras de suelo una vez llevadas al laboratorio de bromatología fueron tamizadas y homogeneizadas para la caracterización física y química en la cual se tomaron 5 muestras para empezar las caracterizaciones se seleccionó 5 muestras al azar de las 15 que se trajo originalmente se las trató con agua destilada (15mL), dándonos los siguientes resultados

Tabla 1-3: pH de las muestras de suelo del bosque primario

Muestra de suelo	pH
M1=002	8,01
M2=006	7,65
M3=007	7,42
M4=011	6,81
M5=012	6,97

Realizado por: Orellana A. (2022)

De los datos obtenidos se puede ver que la media de pH en dicha zona de bosque tiene un pH de 7.372 con lo que se considera un suelo neutro, es por ello que en dicho pH obtenido en la investigación fue muy factible encontrar bacterias, actinomicetos y en mayor medida a microorganismos fúngicos, esto se pudo constatar ya que se encontró pocas bacterias ácido lácticas de aproximadamente 5 especies y en cambio para especies fúngicas como levaduras se obtuvo 8 especies cabe mencionar que a medida que el pH es menor a 7 existe mayor posibilidad de hallar bacterias las cuales sobreviven y generan la descomposición de la materia orgánica y se desarrollan de mejor manera en pH un poco ácidos según lo señala (CENTER FOR AGRICULTURE, FOOD, AND ENVIRONMENT, 2018).

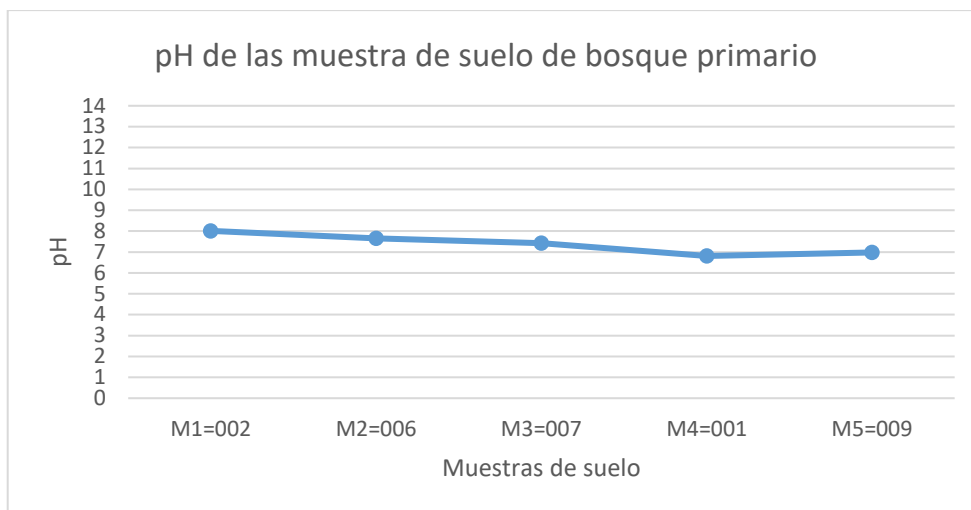


Figura 1-3. pH de las muestras de suelo de bosque primario

Realizado por: Orellana A. (2022)

En los datos de los resultados encontrados, se tiene un pH máximo de 8,01 pero la mayoría se encuentra entre 7 y por debajo de 7 con la cual se puede determinar que si es factible el hallazgo de microorganismos fermentativos que se desarrollan mejor en pH ácidos, pero el suelo al ser proveniente de un bosque primario va a tener un pH relativamente neutro de una media de pH 7,372 que si se lo compara con el pH de los bosques en la que en su mayoría son neutros o un poco debajo de pH de 7 tal como lo dice (FAO (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA), 2020)

- *Acidez activa del suelo de bosque primario*

En las muestras del suelo se vio que la acidez activa debida a la actividad de los iones $[H^+]$

Tabla 2-3: Acidez activa del suelo del bosque primario

Muestra	Acidez Activa $[H^+]$
M1=002	0,0000000097723722095581
M2=006	0,0000000223872113856834
M3=007	0,0000000380189396320561
M4=001	0,0000001548816618912480
M5=009	0,0000001071519305237610

Realizado por: Orellana A. (2022)

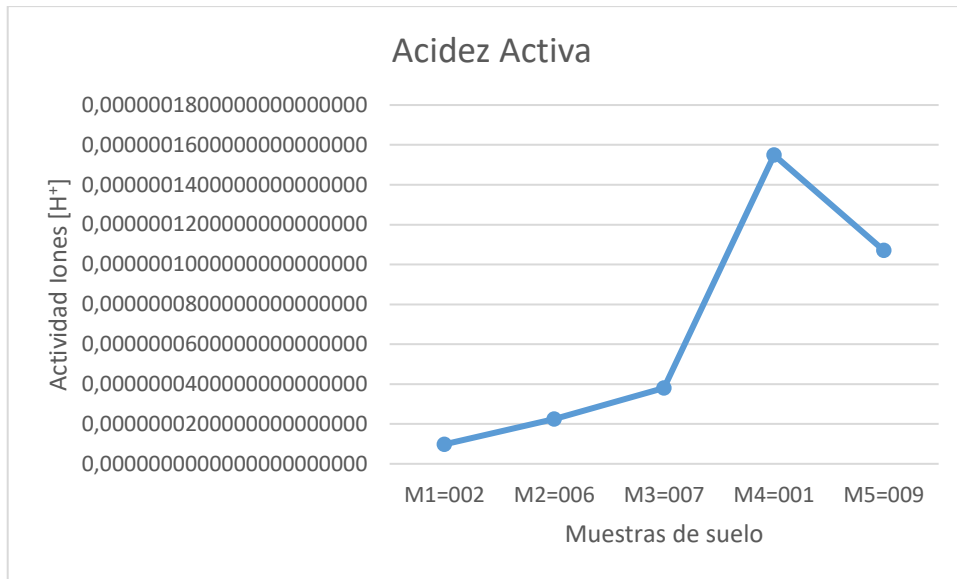


Figura 2-3. Acidez Activa del suelo de bosque primario

Realizado por: Orellana A. (2022)

Según los resultados obtenidos de la acidez activa se puede ver que a medida que el pH baja en las muestras de suelo su acidez aumenta se puede comprobar esto en la muestra 4 (M4) la cual tiene un pH de 6.81 y su acidez activa llega a un valor de 0,0000001548816618912480 [H⁺] (iones de hidrógenos) con lo que se puede decir que debido a que el la acidez y el pH son algo neutras existe la disponibilidad de elementos esenciales como el nitrógeno (N) el magnesio (Mg) y el fósforo (P) además de micronutrientes como el boro (B) el molibdeno (Mb) pero también debido a que el bosque primario de donde se obtuvo las muestras de suelo es un sitio con constantes lluvias se determinó que elementos como el manganeso (Mn) el Zinc (Zn) el hierro (Fe) y el cobre (Cu) existen en cantidades despreciables debido a su solubilidad según lo menciona el (CENTER FOR AGRICULTURE, FOOD, AND ENVIRONMENT, 2018).

- *Materia orgánica del suelo de bosque primario*

En los suelos de los bosques la materia orgánica es muy importante ya que esta determina la capacidad de este para que exista actividad de degradar la materia vegetal o animal es decir que existe una dinámica entre los microorganismos y el suelo. El estudio de la materia orgánica de la investigación se lo hizo por vía seca en la cual se obtuvieron estos resultados.

Tabla 3-3: Cálculo de materia orgánica en el suelo en gramos

Muestra	Muestra inicial (g)	Muestra final (g)	Materia orgánica (g)
M1(002)	2,076	2,0682	0,0078
M2(006)	2,4732	2,4685	0,0047

M3(007)	2,1988	2,1926	0,0062
M4(011)	2,2575	2,2508	0,0067
M5(012)	2,1847	2,1769	0,0078

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 4-3: Cantidad de materia orgánica en el suelo en porcentaje

Muestra	Materia orgánica (g)	Porcentaje de materia orgánica
M1(002)	0,0078	0,38
M2(006)	0,0047	0,19
M3(007)	0,0062	0,28
M4(011)	0,0067	0,30
M5(012)	0,0078	0,36

Realizado por: Orellana A. (2022)

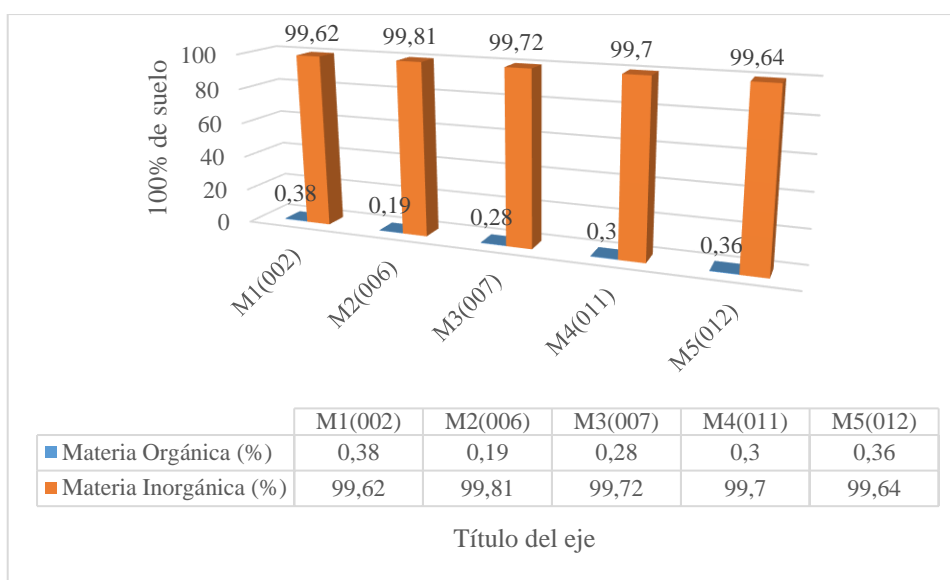


Figura 3-3. Materia orgánica en las muestras de suelo del bosque primario de Cañi

Realizado por: Orellana A. (2022)

Como se puede observar en la gráfica de los resultados obtenidos el porcentaje de materia orgánica es de menos del 1% debido a que es un bosque primario en la cual es de esperarse que este valor sea bajo si se lo compara con suelos en donde existe la presencia humana pero a nivel de ser un suelo silvestre es bastante bueno ronda una media de 0,302 % de materia orgánica en la cual según (VARGAS, y otros, 2009) es de esperarse esta carga de materia orgánica además de que va a dar un color gris si se la somete al proceso de estudio de materia orgánica por vía seca, con lo cual se pudo verificar que la tonalidad fue gris en el suelo de estudio en la investigación

Nitrógeno asimilable del suelo del bosque primario

Es la cantidad de nitrógeno que existe en el suelo en la cual se presenta en forma asimilable y no asimilable en la presente investigación se evaluó la cantidad de nitrógeno asimilable es decir la que está disponible para las especies vegetales.

Tabla 5-3: Cantidad de nitrógeno (N), en las muestras de suelo

Muestra	Nitrógeno Total (%)	Nitrógeno asimilable (%)
M1(002)	0,019	0,000285
M2(006)	0,0095	0,0001425
M3(007)	0,014	0,00021
M4(011)	0,015	0,000225
M5(012)	0,018	0,00027

Realizado por: Orellana A. (2022)

El nitrógeno asimilable que se obtuvo en la presente investigación fue de un promedio de 0,0002265% que es muy bajo con lo cual se halla por debajo del 0,1% de nitrógeno en el que se lo califica como suelo muy pobre si se lo analiza en base a la tabla de clasificación que proporciona (AGROLAB ANÁLISIS TÉCNICOS, 2017), y se entiende que el valor sea bajo debido a que este suelo de este bosque se encuentra en una zona demasiado lluviosa con lo que las formas asimilables de nitrógenos son muy propensas a ser lavables y se ven arrastradas por el agua

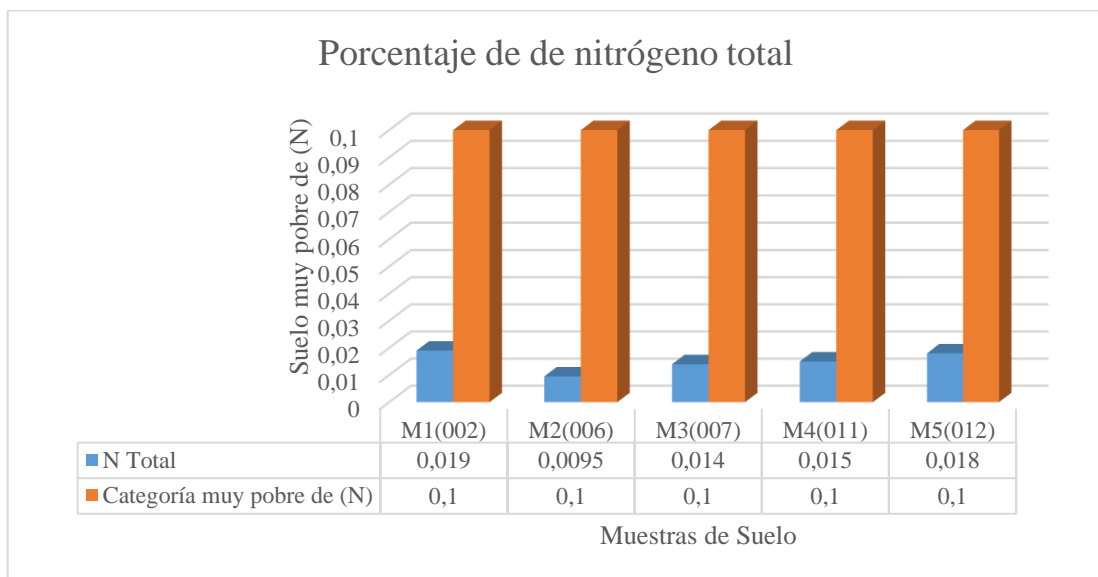


Figura 4-3. Porcentaje de nitrógeno total

Realizado por: Orellana A. (2022)

La figura del nitrógeno total obtenido en el laboratorio (en color celeste) muestra que este elemento se encuentra por debajo del 20% dentro del parámetro de un suelo muy pobre (en color anaranjado).

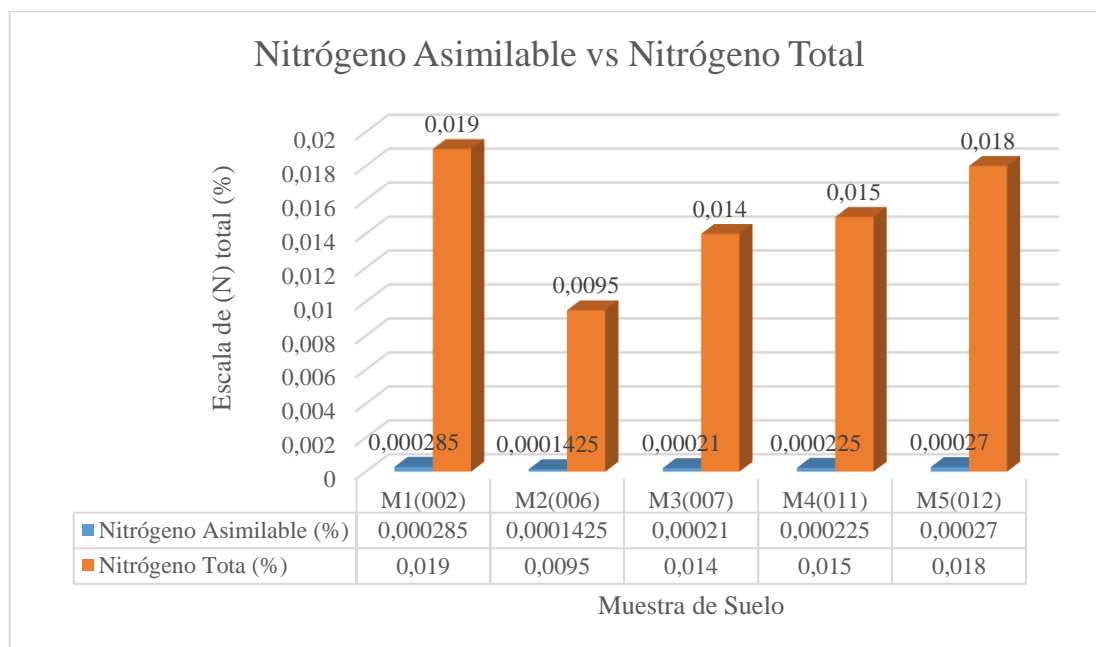


Figura 5-3. Nitrógeno Asimilable vs Nitrógeno Total

Realizado por: Orellana A. (2022)

El nitrógeno asimilable para las plantas (en color celeste) muestra el porcentaje de nitrógeno no disponible para las plantas es decir el inorgánico que ha sido convertido en nitrógeno asimilable es decir nitratos (NO_3^-) y amonios (NH_4^+)

- *Cantidad de potasio (K), de las muestras de suelo de bosque primario*

El potasio es un elemento muy importante en los suelos porque mantiene una relación estrecha entre las funciones de las plantas especialmente a nivel enzimático, además esta tiene potencial osmótico con lo cual entre más potasio tenga un suelo mayor potencial de retener el agua tendrá, en la investigación se encontraron valores de potasio algo bajos con un promedio de 17,518 ppm como se ve a continuación.

Tabla 6-3: Cantidad de Potasio (K) en las muestras de suelo

Muestra	Potasio (mg/L) o (ppm)
---------	------------------------

M1(002)	20
M2(006)	20
M3(007)	12,23
M4(011)	20
M5(012)	15,36

Realizado por: Orellana A. (2022)

De lo antes ya mencionado se obtuvo 17,518 ppm de potasio con lo cual el valor mencionado este suelo estudiado se considera un suelo pobre ya que como lo da a conocer (AGROLAB ANÁLISIS TÉCNICOS, 2017) que los valores se hallan en valores por debajo de 150 ppm son considerados suelos pobres es decir suelos bajos en potasio.

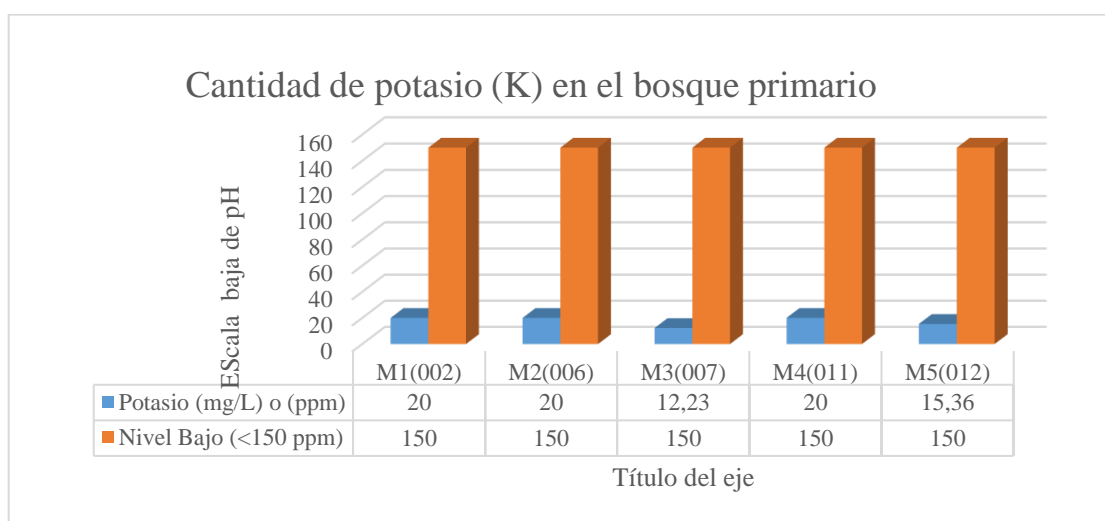


Figura 6-3. Cantidad de potasio (K) en el bosque primario

Realizado por: Orellana A. (2022)

Los valores de potasio resultantes en el análisis de laboratorio (en color celeste) muestra que a comparación del valor superior para categorizarlo como un suelo pobre en potasio está por debajo del 12% del mismo.

3.1.2. Obtención de Unidades Formadores de colonias

- *Siembra de microorganismo para hallar UFC muestra 001*

Tabla 7-3: Unidad formadora de colonia de la muestra 001

Nombre	Repetición	Concentración	Núm. Colonias por Campo	Núm. Total Colonias	UFC
--------	------------	---------------	-------------------------	---------------------	-----

(001)	1°	(1x10 ⁻³)	2	18	18 x10 ³
(001)	2°	(1x10 ⁻³)	3	24	24x10 ³
(001)	3°	(1x10 ⁻³)	3	21	21x10 ³
					21 x10 ³
(001)	1°	(1x10 ⁻⁵)	1	11	12x10 ⁵
(001)	2°	(1x10 ⁻⁵)	2	13	13 x10 ⁵
(001)	3°	(1x10 ⁻⁵)	2	11	11 x10 ⁵
					12 x10 ⁵
(001)	1°	(1x10 ⁻⁷)	1	3	3x10 ⁷
(001)	2°	(1x10 ⁻⁷)	1	4	4x10 ⁷
(001)	3°	(1x10 ⁻⁷)	1	6	6x10 ⁷
					4,3 x10 ⁷
(001)	1°	(1x10 ⁻⁹)	1	2	2x10 ⁹
(001)	2°	(1x10 ⁻⁹)	1	3	3x10 ⁹
(001)	3°	(1x10 ⁻⁹)	1	3	3x10 ⁹
					2,6 x10 ⁹

Realizado por: Orellana A. (2022)

- *Siembra de microorganismos para hallar UFC muestra 002*

Tabla 8-3: Unidad formadora de colonia de la muestra 002

Nombre	Repetición	Concentración	Núm. Colonias por Campo	Núm. total colonias	UFC
(002)	1°	(1x10 ⁻³)	1	12	12x10 ³
(002)	2°	(1x10 ⁻³)	1	14	14x10 ³
(002)	3°	(1x10 ⁻³)	No válida		
					13x10 ³
(002)	1°	(1x10 ⁻⁵)	1	8	8x10 ⁵
(002)	2°	(1x10 ⁻⁵)	1	5	5x10 ⁵
(002)	3°	(1x10 ⁻⁵)	1	5	5x10 ⁵
					6 x10 ⁵
(002)	1°	(1x10 ⁻⁷)	1	5	3x10 ⁷
(002)	2°	(1x10 ⁻⁷)	No Válida		x10 ⁷
(002)	3°	(1x10 ⁻⁷)	1	7	7x10 ⁷
					6 x10 ⁷
(002)	1°	(1x10 ⁻⁹)	1	5	5 x10 ⁹
(002)	2°	(1x10 ⁻⁹)	1	5	5 x10 ⁹
(002)	3°	(1x10 ⁻⁹)	1	4	4 x10 ⁹
					4,6 x10 ⁹

Realizado por: Orellana A. (2022)

- *Siembra de microorganismos para hallar UFC muestra 003*

Tabla 9-3: Unidad formadora de colonia de la muestra 003

Nombre	Repetición	Concentración	Núm. Colonias por Campo	Núm. total colonias	UFC
(003)	1°	(1x10 ⁻³)	1	19	19x10 ³
(003)	2°	(1x10 ⁻³)	1	22	22x10 ³
(003)	3°	(1x10 ⁻³)	2	21	21x10 ³
					20,6x10 ³
(003)	1°	(1x10 ⁻⁵)	1	13	13x10 ⁵
(003)	2°	(1x10 ⁻⁵)	1	14	14x10 ⁵
(003)	3°	(1x10 ⁻⁵)	1	13	13x10 ⁵
					13,3 x10 ⁵
(003)	1°	(1x10 ⁻⁷)	1	6	6x10 ⁷
(003)	2°	(1x10 ⁻⁷)	No Válida		x10 ⁷
(003)	3°	(1x10 ⁻⁷)	1	9	9x10 ⁷
					7,5 x10 ⁷
(003)	1°	(1x10 ⁻⁹)	1	3	3 x10 ⁹
(003)	2°	(1x10 ⁻⁹)	1	2	2 x10 ⁹
(003)	3°	(1x10 ⁻⁹)	1	4	4 x10 ⁹
					3 x10 ⁹

Realizado por: Orellana A. (2022)

- *Siembra de microorganismos para hallar UFC muestra 006*

Tabla 10-3: Unidad formadora de colonia de la muestra 006

Muestra	Repetición	Concentración	Núm. Colonias por Campo	Núm. Total Colonias	UFC
(006)	1°	(1x10 ⁻³)	1	19	19x10 ³
(006)	2°	(1x10 ⁻³)	2	16	16x10 ³
(006)	3°	(1x10 ⁻³)	2	15	15x10 ³
					16,6x10 ³
(006)	1°	(1x10 ⁻⁵)	1	15	15x10 ⁵
(006)	2°	(1x10 ⁻⁵)	1	12	12x10 ⁵
(006)	3°	(1x10 ⁻⁵)	1	13	13x10 ⁵
					13,3x10 ⁵
(006)	1°	(1x10 ⁻⁷)	1	7	7x10 ⁷
(006)	2°	(1x10 ⁻⁷)	No Válida		x10 ⁷
(006)	3°	(1x10 ⁻⁷)	1	6	6 x10 ⁷
					6,5 x10 ⁷
(006)	1°	(1x10 ⁻⁹)	1	6	6x10 ⁹
(006)	2°	(1x10 ⁻⁹)	1	5	5x10 ⁹
(006)	3°	(1x10 ⁻⁹)	No Válida		x10 ⁹
					5,5x10 ⁹

Realizado por: Orellana A. (2022)

- *Siembra de microorganismos para hallar UFC muestra 007*

Tabla 11-3: Unidad formadora de colonia de la muestra 007

Muestra	Repetición	Concentración	Núm. Colonias por Campo	Núm. Total Colonias	UFC
(007)	1°	(1x10 ⁻³)	Incontable	Incontable	x10 ³
(007)	2°	(1x10 ⁻³)	Incontable	Incontable	x10 ³
(007)	3°	(1x10 ⁻³)	Incontable	Incontable	x10 ³
(007)	1°	(1x10 ⁻⁵)	2	12	12x10 ⁵
(007)	2°	(1x10 ⁻⁵)	2	13	13x10 ⁵
(007)	3°	(1x10 ⁻⁵)	1	9	9x10 ⁵
					11,33x10 ⁵
(007)	1°	(1x10 ⁻⁷)	1	7	7x10 ⁷
(007)	2°	(1x10 ⁻⁷)	1	7	7x10 ⁷
(007)	3°	(1x10 ⁻⁷)	1	7	7x10 ⁷
					7x10 ⁷
(007)	1°	(1x10 ⁻⁹)	1		x10 ⁹
(007)	2°	(1x10 ⁻⁹)	1	6	6x10 ⁹
(007)	3°	(1x10 ⁻⁹)	1	5	5x10 ⁹
					5,5x10 ⁹

Realizado por: Orellana A. (2022)

- *Siembra de microorganismos para hallar UFC muestra 009*

Tabla 12-3: Unidad formadora de colonia de la muestra 009

Muestra	Repetición	Concentración	Núm. Colonias por Campo	Núm. Total Colonias	UFC
(009)	1°	(1x10 ⁻³)	3	25	25x10 ³
(009)	2°	(1x10 ⁻³)	2	22	22x10 ³
(009)	3°	(1x10 ⁻³)	1	22	22x10 ³
					23x10 ³
(009)	1°	(1x10 ⁻⁵)	1	16	16x10 ⁵
(009)	2°	(1x10 ⁻⁵)	2	13	13x10 ⁵
(009)	3°	(1x10 ⁻⁵)	1	11	11x10 ⁵
					13,3x10 ⁵
(009)	1°	(1x10 ⁻⁷)	1	6	6x10 ⁷
(009)	2°	(1x10 ⁻⁷)	1	6	6x10 ⁷
(009)	3°	(1x10 ⁻⁷)	1	7	7x10 ⁷
					6,3x10 ⁷
(009)	1°	(1x10 ⁻⁹)	1	2	2x10 ⁹
(009)	2°	(1x10 ⁻⁹)	1	3	3x10 ⁹
(009)	3°	(1x10 ⁻⁹)	1	2	2x10 ⁹

					2,3x10 ⁹
--	--	--	--	--	---------------------

Realizado por: Orellana A. (2022)

- *Siembra de microorganismos para hallar UFC muestra 011*

Tabla 13-3: Unidad formadora de colonia de la muestra 011

Nombre	Repetición	Concentración	Núm. Colonias por Campo	Núm. Total Colonias	UFC
(011)	1°	(1x10 ⁻³)	3	22	22 x10 ³
(011)	2°	(1x10 ⁻³)	3	35	35x10 ³
(011)	3°	(1x10 ⁻³)	3	27	27x10 ³
					28 x10 ³
(011)	1°	(1x10 ⁻⁵)	1	12	12x10 ⁵
(011)	2°	(1x10 ⁻⁵)	2	14	14 x10 ⁵
(011)	3°	(1x10 ⁻⁵)	2	13	13 x10 ⁵
					13 x10 ⁵
(011)	1°	(1x10 ⁻⁷)	1	5	5x10 ⁷
(011)	2°	(1x10 ⁻⁷)	1	6	6x10 ⁷
(011)	3°	(1x10 ⁻⁷)	1	3	3x10 ⁷
					4,6 x10 ⁷
(011)	1°	(1x10 ⁻⁹)	1	4	4x10 ⁹
(011)	2°	(1x10 ⁻⁹)	1	5	5x10 ⁹
(011)	3°	(1x10 ⁻⁹)	1	4	4x10 ⁹
					4,3 x10 ⁹

Realizado por: Orellana A. (2022)

- *Siembra de microorganismos para hallar UFC muestra 012*

Tabla 14-3: Unidad formadora de colonia de la muestra 012

Muestra	Repetición	Concentración	Núm. Colonias por Campo	Núm. Total Colonias	UFC
(012)	1°	(1x10 ⁻³)	2	21	21x10 ³
(012)	2°	(1x10 ⁻³)	1	15	15x10 ³
(012)	3°	(1x10 ⁻³)	1	14	14x10 ³
					16,6x10 ³
(012)	1°	(1x10 ⁻⁵)	No Válida		x10 ⁵
(012)	2°	(1x10 ⁻⁵)	1	10	10x10 ⁵
(012)	3°	(1x10 ⁻⁵)	1	7	7x10 ⁵
					8,5x10 ⁵
(012)	1°	(1x10 ⁻⁷)	1	6	6x10 ⁷
(012)	2°	(1x10 ⁻⁷)	1	5	5x10 ⁷
(012)	3°	(1x10 ⁻⁷)	1	5	5x10 ⁷

					5,3x10 ⁷
(012)	1°	(1x10 ⁻⁹)	1	1	1x10 ⁹
(012)	2°	(1x10 ⁻⁹)	1	4	4x10 ⁹
(012))	3°	(1x10 ⁻⁹)	1	3	3x10 ⁹
					2,6x10 ⁹

Realizado por: Orellana A. (2022)

Luego de haber realizado la siembra se hizo el conteo lo cual nos arrojó los resultados de las tablas de arriba de cada una de las muestras de suelo y para elegir la unidad formadora de colonia en una concentración adecuada según (MADIGAN, y otros, 2015) el valor de las colonias tiene que estar en un rango de 30 a 300 y en el trabajo de investigación se eligió la unidad formadora de colonia de entre (1x10⁻⁵) (1x10⁻⁷) y (1x10⁻⁹) debido a que cada muestra de suelo presentan diferentes números de colonias.

Para elegir una unidad formadora de colonia la (NORMA OFICIAL MEXICANA, 2022) dice en la Norma 111 que se puede elegir el número de entre 10 a 150 UFC cuando se quiere realizar un conteo para poder ofrecer un resultado más claro

3.1.3. Aislamiento de microorganismos

- *Aislamiento de bacterias Ácido Lácticas*

Tabla 15-3: Características de las especies de bacterias lácticas aisladas

Muestra	Repetición	Concentración	No. de Colonias	Aspecto de las BAL		
				Forma	Color	Superficie
(002)	1°	(1x10 ⁻⁹)	1	ondulada	anaranjado	lisa
(002)	2°	(1x10 ⁻⁹)	0			
(002)	3°	(1x10 ⁻⁹)	1	ondulada	anaranjado	lisa
(006)	1°	(1x10 ⁻⁵)	1	rizoide	blanquecina	plana
(006)	2°	(1x10 ⁻⁵)	2	rizoide	blanquecina	plana
(006)	3°	(1x10 ⁻⁵)	1	rizoide	blanquecina	plana
(007)	1°	(1x10 ⁻⁷)	2	irregular	marfil oscuro	convexa
(007)	2°	(1x10 ⁻⁷)	1	irregular	marfil oscuro	convexa
(007)	3°	(1x10 ⁻⁷)	2	irregular	marfil oscuro	convexa
(011)	1°	(1x10 ⁻⁹)	0			
(011)	2°	(1x10 ⁻⁹)	1	circular	hueso claro	elevada

(011)	3°	(1x10 ⁻⁹)	0			
(012)	1°	(1x10 ⁻⁷)	3	lobulada	marfil	cremosa
(012)	2°	(1x10 ⁻⁷)	2	lobulada	marfil	cremosa
(012)	3°	(1x10 ⁻⁷)	5	lobulada	marfil	cremosa

Realizado por: Orellana A. (2022)

- *Aislamiento de Levaduras*

Tabla 16-3: Características de las especies de levaduras aisladas

Muestra	Repetición	Concentración	No. de Colonias	Aspecto de las BAL		
				Forma	Color	Superficie
(001)	1°	(1x10 ⁻⁷)	3	irregular	blanquecino	fina
(001)	2°	(1x10 ⁻⁷)	3	irregular	blanquecino	fina
(001)	3°	(1x10 ⁻⁷)	2	irregular	anaranjado	fina
(003)	1°	(1x10 ⁻⁵)	1	circular	marfil claro	delgada
(003)	2°	(1x10 ⁻⁵)	2	circular	marfil claro	delgada
(003)	3°	(1x10 ⁻⁵)	1	circular	marfil claro	delgada
(006)	1°	(1x10 ⁻⁷)	1	circular	blanco naranja	convexa
(006)	2°	(1x10 ⁻⁷)	2	circular	blanco naranja	convexa
(006)	3°	(1x10 ⁻⁷)	2	circular	blanco naranja	convexa
(007)	1°	(1x10 ⁻⁷)	0			
(007)	2°	(1x10 ⁻⁷)	0			
(007)	3°	(1x10 ⁻⁷)	1	puntiforme	blanco	lisa
(009)	1°	(1x10 ⁻⁷)	1	ondulada	marfil	cremosa seca
(009)	2°	(1x10 ⁻⁷)	0			
(009)	3°	(1x10 ⁻⁷)	0			

Realizado por: Orellana A. (2022)

- *Aislamiento de bacterias Fermentativas*

Tabla 17-3: Características de las especies de las bacterias fermentativas

Muestra	Repetición	Concentración	No. de Colonias	Aspecto de las BAL		
				Forma	Color	Superficie
(001)	1°	(1x10 ⁻⁷)	3	irregular	blanquecino	fina
(001)	2°	(1x10 ⁻⁷)	2	irregular	blanquecino	fina
(001)	3°	(1x10 ⁻⁷)	3	irregular	anaranjado	fina

(003)	1°	(1x10 ⁻⁵)	2	ondulada	blanco claro	plana
(003)	2°	(1x10 ⁻⁵)	1	ondulada	blanco claro	plana
(003)	3°	(1x10 ⁻⁵)	1	ondulada	blanco claro	plana
(006)	1°	(1x10 ⁻⁷)	2	puntiforme	blanco naranja	convexa
(006)	2°	(1x10 ⁻⁷)	1	puntiforme	blanco naranja	convexa
(006)	3°	(1x10 ⁻⁷)	2	puntiforme	blanco naranja	convexa
(007)	1°	(1x10 ⁻⁷)	0			
(007)	2°	(1x10 ⁻⁷)	1	irregular	marfil	cremosa
(007)	3°	(1x10 ⁻⁷)	0			
(009)	1°	(1x10 ⁻⁷)	0			
(009)	2°	(1x10 ⁻⁷)	0			
(009)	3°	(1x10 ⁻⁷)	1	rizoide	blanco amarillo	difuminada

Realizado por: Orellana A. (2022)

3.1.4. Selección de microorganismos

- *Selección de bacterias Ácido Lácticas*

Para el aislamiento de las bacterias ácido lácticas se trabajó en base a la unidad formadora de colonias (UFC) con las especies que se obtuvieron de las muestras de suelo, rotuladas como (002), (006), (007), (011), y (012) las cuales tienen unas UFC de (4,6 x10⁹), (13,3x10⁵), (7x10⁷), (4,3 x10⁹) y (5,3x10⁷) respectivamente y se manejó con estos valores en base a la (NORMA OFICIAL MEXICANA, 2022) que maneja valores cercanos a 10 UFC

- *Selección Levaduras*

La selección de las levaduras se da luego de haberla sembrado en agar PDA y hacer una resiembra en agar YPD y finalmente en agar Sabouraud con un inhibidor de crecimiento de bacterias (NTE INEN 1529-10:2013, 2017 pág. 2) para así eliminar a los microorganismos interferentes y obtener una colonia pura.

- *Selección bacterias Fermentativas*

Con la ayuda de la aplicación de etanol al 8% en agar Acetobacter se puede ir eliminando a bacterias y levaduras que no toleran el alcohol por lo que luego de tener una colonia primaria se vuelve a hacer un aislamiento por estrías y escogiendo luego a los microorganismos que toleren el alcohol, al igual como se lo realizó en la investigación de (GERARD, 2015 pág. 64) con una concentración de alcohol al 5%, ya que estas son bacterias aerobias las que más toleren al alcohol etílico son las que intervienen en proceso de fermentación y las que son mejores candidatas para la selección de las especies fermentativas.

3.1.5. Caracterización de los microorganismos para uso agroindustrial

- *Caracterización de bacterias ácido lácticas encontradas*

Para el aislamiento se lo hizo siguiendo mediante la modificación de factores como son el pH, la temperatura y el oxígeno del aire en el ambiente en donde se aislaron los microorganismos, esto es esencial para poder hacer que se desarrollen con normalidad en base a las pruebas bioquímicas al final de la investigación se obtuvieron 5 especies diferentes ya que al hacer la evaluación morfológica al microscopio se pudo ver que son diferentes y con las pruebas que se hicieron a continuación se detallan los resultados de las 5 especies encontradas:

Tabla 18-3: Nombres equivalentes utilizados en el laboratorio y en los resultados

H	I	J	K	L
↓	↓	↓	↓	↓
C3 R2	C2	C1	C3 R1	C4

Realizado por: Orellana A. (2022)

Debido a las resiembras se terminó alterando algunos nombres para mayor comodidad de interpretación.

Pruebas bioquímicas de Catalasa

Tabla 19-3: Prueba bioquímica de Catalasa

Muestra	H		I		J		K		L	
Repetición	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Catalasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

En la prueba de la catalasa las 5 especies encontradas arrojaron datos negativos incluida sus repeticiones esta prueba se la realiza con agua oxigenada y todo microorganismo que posea dicha enzima al entrar en contacto con el H₂O₂ es aerobio.

Los resultados negativos se deben a que existe la falta de dicha enzima en los microorganismos encontrados los cuales son de tipo anaerobios muy parecido a los resultados que se obtuvieron en la investigación de (WASSIE, y otros, 2016 pág. 3) donde manifiesta que las pruebas preliminares para saber si un microorganismo es bacteria ácido láctica debe dar negativo a la prueba de catalasa como en nuestro caso lo cual quiere decir que la ruta metabólica de las especies encontradas es por fermentación láctica.

Pruebas bioquímicas de Oxidasa

Tabla 20-3: Prueba bioquímica de Oxidasa

Muestra	H		I		J		K		L	
Repetición	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

Las especies halladas en la presente investigación se las sometió a la prueba de la oxidasa dando como resultado negativas a esta prueba la cual origina una coloración azulada o violeta azulada lo más factible es hacer esta prueba con muestras frescas.

Si se toma en cuenta los resultados hallados y se los compara con el trabajo investigativo de (TAYE, y otros, 2021) menciona que la familia de los lactobacillus da negativo a esta prueba debido a que no poseen la enzima citocromo oxidasa la cual está presente en los microorganismos aerobios mientras que las bacterias ácido lácticas tienen una ruta metabólica de fermentación láctica y el oxígeno no entra a ser parte de su metabolismo.

Prueba bioquímica de Tinción Gram

Tabla 21-3: Prueba bioquímica de Tinción Gram

Muestra	H		I		J		K		L	
Repetición	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2

Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Realizado por: Orellana A. (2022)

Cuando se hizo la tinción Gram se pudo ver que todas las 5 especies mostraron una coloración violeta y violeta azulado esta es la característica de la familia de las bacterias ácido lácticas y esto se da cuando el cristal violeta se fija a la pared de las células.

En la investigación de (VERDEZOTO, y otros, 2017) las bacterias ácido lácticas al hacerles la tinción dieron resultado positivo es decir con coloración igual al de presente investigación y esto se debe a la existencia de abundante peptidoglicano en la pared de la célula el cual hace que se llenen los espacios cuando se la tiñe en esta prueba.

Prueba bioquímica de KOH

Tabla 22-3: Prueba bioquímica de KOH

Muestra	H		I		J		K		L	
Repetición	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
KOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

Cuando se utiliza el KOH y este interacciona con las células en el portaobjetos la solución básica entra a la célula y si es que el microorganismo es Gram positivo no va a desprender un halo mucoide la célula, pero por el contrario si existe un rastro mucoide significa que el microorganismo será Gram negativo (VERDEZOTO, y otros, 2017).

Pruebas bioquímicas de Movilidad

Tabla 23-3: Prueba bioquímica de Movilidad

Muestra	H		I		J		K		L	
Repetición	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Movilidad	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

Las pruebas de movilidad se las hizo con la ayuda del medio SIM en la cual se pudo ver que el resultado fue negativo con lo que da a entender de que estas especies encontradas no poseen flagelos tal como lo dice (HERNÁNDEZ-URZÚA, 2016) de la familia de las bacterias ácido lácticas lo que coincide con los resultados obtenidos.

Prueba de fermentación de Azúcares (Lactosa)

Tabla 24-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Lactosa)

Azúcar	Lactosa									
Muestra	H		I		J		K		L	
Repetición	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Resultado	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Fructuosa)

Tabla 25-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Fructuosa)

Azúcar	Fructuosa									
Muestra	H		I		J		K		L	
Repetición	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Resultado	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Manitol)

Tabla 26-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Manitol)

Azúcar	Manitol									
Muestra	H		I		J		K		L	
Repetición	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Resultado	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Glucosa)

Tabla 27-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Glucosa)

Azúcar	Glucosa									
Muestra	H		I		J		K		L	
Repetición	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Resultado	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Galactosa)

Tabla 28-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Galactosa)

Azúcar	Galactosa									
Muestra	H		I		J		K		L	
Repetición	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Resultado	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

Una parte de las pruebas bioquímicas es la de fermentación de azúcares en la cual se muestran los resultados a los que se llegó en la investigación como se puede ver que se trabajó con 5 azúcares: lactosa, fructuosa, manitol, glucosa y galactosa las cuales fueron inoculadas junto con las 5 especies aisladas de los microorganismos del bosque primario de Cañi, en condiciones anaerobias a 35°C por 48 horas, se realiza este tipo de pruebas buscando saber si es que las especies obtenidas pueden llegar a degradarlos azúcares principales pero el glúcido que más importa saber si es que logran metabolizar es la lactosa, ya que esta sería la principal fuente para producir ácido láctico en el caso de la familia de los *Lactobacillus*.

Cuando se realizó esta prueba se vio que no todas las especie metabolizaron todos los azúcares a estudiar, pero sí que todas fermentaron la glucosa fue el azúcar que todas lo pudieron metabolizar al igual que en el estudio de (TAYE, y otros, 2021) en donde explica que todas las especies de bacterias ácido lácticas (BAL) si utilizan como fuente principal la glucosa estas son homofermentativas en esta clasificación se hallan familias como *Lactococcus* y *Streptococcus* , para las cepas denominada (I) y (K) pasadas las 24 horas a 32°C fueron las que de mejor manera utilizaron la lactosa como fuente de energía y la pudieron degradar cuando se las observó al microscopio con el lente de 100X se pudo ver que la forma de estas dos especies era la (I) en forma de bacilos largos y Gram positivos que si lo comparamos lo que dice (PARÉS, y otros, 2012 pág. 76) que la forma en forma de bastones que desprende CO₂ corresponde a la familia de los *Lactobacillus*.

Con lo mostrado anteriormente coincide con las características que encontramos en la investigación, de igual manera la muestra rotulada como (K) al microscopio con el lente 100X tiene una forma de cocos formando cadenas de cocos y también de parejas siendo Gram positivas y que como se dijo fermentó de buena manera y esto coincide con que dice el mismo autor que los cataloga a las bacterias Gram positivas en forma de cocos que forman cadenas y que sean anaerobios como parte de la familia de los *Streptococcus* en estos dos casos la fermentación generaría lactato como producto de la fermentación llevada a cabo.

- *Caracterización de las levaduras encontradas*

Pruebas bioquímicas de Catalasa

Tabla 29-3: Prueba bioquímica de Catalasa

Levaduras															
Prueba bioquímica															
Catalasa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Esta prueba es hecha para determinar si un microorganismo tiene la capacidad de utilizar el oxígeno en su fisiología es decir que va a haber un ligero burbujeo cuando existe un resultado positivo se sabe que es una especie aerobia o facultativa si llegara el caso.

Esta prueba se la realiza más típicamente a las bacterias, pero en la presente investigación se la realizó también a las levaduras las cuales reaccionaron al H₂O₂ con un pequeño burbujeo, en la investigación de (MEDINA, 2010 pág. 18) indica que la célula reacciona debido al contacto del líquido con lo que se pudo determinar que las levaduras estuvieron expuestas a un debido a la exposición del peróxido de hidrógeno.

Prueba bioquímica de Oxidasa

Tabla 30-3: Prueba bioquímica de Oxidasa

Levaduras															
Prueba bioquímica:															
Oxidasa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

La prueba de oxidasa al ser una forma de identificar a microorganismos aerobios es de esperarse que las levaduras fermentativas al ser facultativas estas también utilizan el O₂ en sus funciones biológicas es por eso que se realizó esta prueba en la investigación, aunque sea más utilizada para, analizar bacterias (REYNOSO, y otros, 2015).

En esta prueba luego de analizar a las 8 muestras de levaduras la prueba de oxidasa nos dio positivo a todas las muestras es decir que dichas células lo utilizan porque a pesar de que su fermentación sea anaerobia también logran utilizar al oxígeno al ser facultativas

Prueba bioquímica de Tinción Gram

Tabla 31-3: Prueba bioquímica de Tinción Wright

Levaduras															
Prueba bioquímica:															
Prueba Tinción Wright															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Esta prueba no se trata en sí de que sea positiva o negativa sino que muestra de mejor manera la morfología al microscopio y en vez de este colorante se puede también hacerlo con azul de metileno o azul de algodón de lactofenol ya que a diferencia de las bacterias, las levaduras y otras especies de hongos son un poco más grades y con las coloraciones mencionadas anteriormente se llega a distinguir de mejor manera tal como lo indica (GONZÁLEZ, y otros, 2020) los conidios hifas y otras partes de estos pero en levaduras es más cómodo utilizarlo porque los tiñe en su totalidad y su morfología se la puede identificar mucho mejor.

Prueba bioquímica de resistencia alcohólica

Tabla 32-3: Prueba bioquímica de resistencia a alcohol OH

Levaduras															
Prueba bioquímica:															
OH															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Esta es una prueba muy importante en levaduras aquí se puede ver cuales tienen el potencial para fermentar y cuáles van a resistir de mejor manera la concentración de alcohol a medida que la fermentación alcohólica en la presente investigación hubieron 5 especies que toleraron la concentración de alcohol al 8% así como en la investigación de (HEREDIA, y otros, 2015) en la cual las especies de levaduras que resistieron mejor al alcohol fueron seleccionadas en su caso se seleccionó a las que resistieron a la concentración al 6% de alcohol con esto se asegura la viabilidad del proceso de fermentación por más tiempo.

Prueba de fermentación de Azúcares (Lactosa)

Tabla 33-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Lactosa)

Levaduras															
Azúcar a fermentar:															
Lactosa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Fructuosa)

Tabla 34-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Fructuosa)

Levaduras															
Azúcar a fermentar:															
Fructuosa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Manitol)

Tabla 35-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Manitol)

Levaduras															
Azúcar a fermentar:															
Manitol															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Glucosa)

Tabla 36-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Glucosa)

Levaduras															
-----------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Azúcar a fermentar:															
Glucosa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Galactosa)

Tabla 37-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Galactosa)

Levaduras															
Azúcar a fermentar:															
Galactosa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

Las levaduras obtienen energía a partir de degradar la glucosa y entre los azúcares más comunes se analizó esta en la cual todas las especies aisladas utilizaron la glucosa además de ello se analizó con la azúcar fructuosa en la cual todas asimilaron este azúcar y eso es de esperar debido a que en un ambiente natural esta es la principal fuente de energía de las levaduras salvajes y como lo dice (FERREYRA, y otros, 2009).

Por otra parte, se puede ver en la presente investigación que ninguna de las especies no logró degradar la lactosa y esto se debe a que el proceso de glucólisis lo realiza de mejor manera con moléculas de glucosa o componentes de ella si se la compara con los análisis de (GILCES, y otros, 2006 pág. 81) en la cual coincide los azúcares a fermentar por parte de las levaduras en la cual se utilizó fructuosa, sacarosa, y glucosa obteniendo resultados positivos.

Prueba de producción de Gas

Tabla 38-3: Prueba de producción de Gas

Levaduras							
Producción de Gas							
Prueba de CO ₂							
001AC2		001BC2		001BC1		009C2	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Se realizó un seguimiento de producción de gas debido a la fermentación alcohólica en la presente investigación, en la cual se pudo observar que hubo liberación de CO₂ y esto es de mucha importancia para el ámbito de querer hallar buenas velocidades de fermentación en especies fermentativas del vino y cerveza tal como lo indica (SANZ, 2012 pág. 53) la liberación de gas según es un indicador positivo para ver el potencial fermentativo de las especies aisladas.

Prueba de producción ácido sulfhídrico

Tabla 39-3: Prueba de producción ácido sulfhídrico

Levaduras							
Producción de H ₂ S							
Prueba de H ₂ S							
001AC2	001BC2	001BC1	009C2	003C1A	006C1'	006C1	007C1'
-	-	-	-	-	-	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

En las pruebas de laboratorio de la investigación realizada a las especies de levaduras se pudo ver que no hubo liberación de ácido sulfhídrico lo que es un detalle muy relevante ya que al no haber liberación H₂S como lo señala (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 83) esto hace que no exista un peligro al entrar en contacto con el ser humano.

- *Caracterización de las bacterias fermentativas encontradas*

Pruebas bioquímicas de Catalasa

Tabla 40-3: Prueba bioquímica de Catalasa

Bacterias fermentativas															
Prueba bioquímica:															
Catalasa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

En la evaluación de la presencia de la enzima catalasa en las bacterias fermentativas se obtuvo resultados positivos con lo que las especies halladas son propias de los microorganismos aerobios

o facultativos y esto es muy apegado a lo que señala (PARÉS, y otros, 2012 pág. 55) que la característica de las bacterias acéticas es la de dar positivo a esta prueba

Prueba bioquímica de Oxidasa

Tabla 41-3: Pruebas bioquímicas de Oxidasa

Bacterias fermentativas															
Prueba bioquímica:															
Oxidasa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

La prueba de oxidasa realizada a las especies bacterianas obtenidas dio positivas esto es por la presencia de la enzima citocromo oxidasa en la cual como lo muestra (DU TOIT, y otros, 2001 pág. 5) donde las bacterias acéticas dan positivo a las pruebas de oxidasa

Pruebas bioquímicas de Tinción Gram

Tabla 42-3: Prueba bioquímica de Tinción Gram

Bacterias fermentativas															
Prueba bioquímica:															
Prueba Tinción Gram															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

En las pruebas de laboratorio la mayoría de las especies dieron un resultado negativo tal como era lo esperado por las bacterias ácido acéticas como manifiesta (HAGHSHENAS, y otros, 2014 pág. 3) pero por otro en 3 muestras hubieron resultados positivos en uno de los 2 ensayos de cada muestra por lo cual quizá se deba a lo que señala (PARÉS, y otros, 2012 pág. 55) que en los cultivos viejos se puede dar el caso que en la tinción de Gram de positivo debido al tiempo.

Prueba bioquímica de resistencia a alcohol

Tabla 61-3: Pruebas bioquímicas de resistencia a alcohol

Tabla 43-3: Pruebas bioquímicas de resistencia a alcohol

Bacterias fermentativas															
Prueba bioquímica:															
OH															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

En la etapa de laboratorio se adicionó alcohol y se pudo ver que las bacterias fermentativas pudieron resistir y proliferar de buena manera tal como lo indica (GERARD, 2015 pág. 12) que las bacterias acéticas utilizan el etanol como fuente de energía para transformarlo en ácido acético es decir que el que haya alcohol no interfiere a su desarrollo.

Pruebas bioquímicas de Movilidad

Tabla 44-3: Prueba bioquímica de Movilidad

Bacterias fermentativas															
Prueba bioquímica:															
Movilidad															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

Para esta prueba se utilizó el medio SIM en la cual se pudo ver que los resultados dieron negativo tal como lo indica (PARÉS, y otros, 2012) que la característica de la familia de las bacterias acéticas es la de dar movilidad negativa.

Prueba de fermentación de Azúcares (Lactosa)

Tabla 45-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Lactosa)

Bacterias fermentativas															
Azúcar a fermentar:															
lactosa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Fructuosa)

Tabla 46-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Fructuosa)

Bacterias fermentativas															
Azúcar a fermentar:															
fructuosa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Manitol)

Tabla 47-3: Prueba de fermentación de Azúcares (manitol)

Bacterias fermentativas															
Azúcar a fermentar:															
Manitol															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Glucosa)

Tabla 48-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Glucosa)

Bacterias fermentativas															
Azúcar a fermentar:															
Glucosa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Prueba de fermentación de Azúcares (Galactosa)

Tabla 49-3: Prueba de fermentación de Azúcares (Galactosa)

Bacterias fermentativas															
Azúcar a fermentar:															
Galactosa															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

Las características de las bacterias fermentativas en el caso de la familia de las bacterias acéticas fermentan muy bien la glucosa y otros azúcares simples a excepción de la lactosa para el caso de las familias *Acetobacter* y *Gluconobacter* y muy débil para la familia *Pseudomonas* según (PARÉS, y otros, 2012 pág. 55) con lo cual es presumible la presencia de estas especies en la presente investigación.

Por otra parte, en presencia del oxígeno y de etanol las bacterias ácido acéticas fermentan muy bien los azúcares presentes en el sustrato además que con lo estudiado siempre que se encuentre por debajo de un 7% u 8% el desarrollo será óptimo además de un pH semi neutro.

Prueba de producción de Gas

Tabla 50-3: Prueba de producción de Gas

Bacterias fermentativas							
Producción de Gas							
Prueba de CO ₂							
001AC2	001BC2	001BC1	009C2	003C1A	006C1'	006C1	007C1'
+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Orellana A. (2022)

La producción de gas en forma de CO₂ es muy importante ya que indica que existe una liberación y presencia de una fermentación acética tal como lo dice (PARÉS, y otros, 2012 pág. 81) 81 y en la presente investigación se pudo detectarlo por su liberación en forma de burbujas al dejar al recipiente cerrado con el cultivo de las bacterias fermentativas.

Producción de ácido sulfhídrico

Tabla 51-3: Producción de ácido sulfhídrico

Bacterias fermentativas
Producción de H ₂ S
Prueba de H ₂ S

001AC2	001BC2	001BC1	009C2	003C1A	006C1'	006C1	007C1'
-	-	-	-	-	-	-	-

Realizado por: Orellana A. (2022)


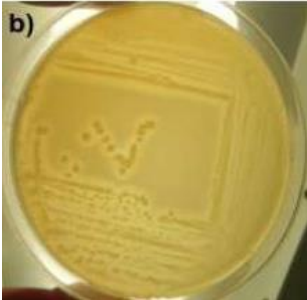
La presencia del ácido sulfhídrico indica que dicho producto o sustrato no es consumible para el ser humano debido a la toxicidad de dicho compuesto como lo hace notar (REYNOSO, y otros, 2015 pág. 83), y en la investigación estudiada dio resultados negativos con lo que se puede asegurar que las especies halladas no son de peligro para el ser humano.

3.2. *Identificación de los microorganismos para uso agroindustrial*

Para la identificación en la investigación estudiada se lo ha hecho en función de las características fenotípicas:

- *Identificación macroscópica de los microorganismos aislados*
- *Identificación macroscópica de bacterias ácido lácticas*


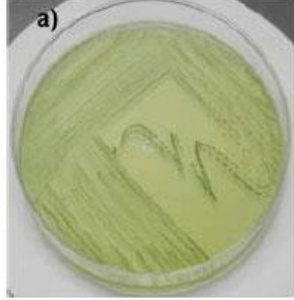
Tabla 52-3: Vista macroscópica muestra H

Muestra: H (C3 R2)	Descripción H (C3 R2):	Imagen de bibliografía
	Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa Color: Crema Textura: Pastosa	 Fuente: (RAMIREZ-LÓPEZ, y otros, 2016)

Realizado por: Orellana A. (2022)


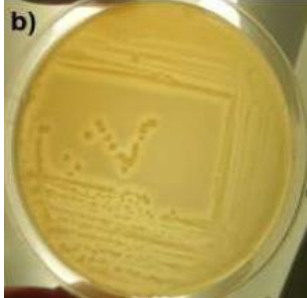
Tabla 53-3: Vista macroscópica muestra I

Muestra: I (C2)	Descripción I (C2):	Imagen de bibliografía

	<p>Forma: Redonda Borde: Entero ondulado Superficie: Plana Color: Blanco Textura: Cremosa</p>	 <p>Fuente: (RAMIREZ-LÓPEZ, y otros, 2016)</p>
---	---	--


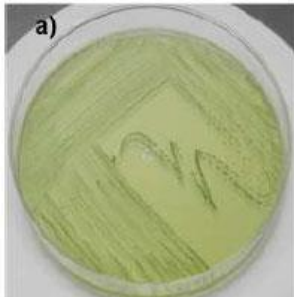
Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 54-3: Vista macroscópica muestra J

Muestra: J (C1)	Descripción J (C1):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa craterioforme Color: Crema oscuro Textura: Pastosa</p>	 <p>Fuente: (RAMIREZ-LÓPEZ, y otros, 2016)</p>


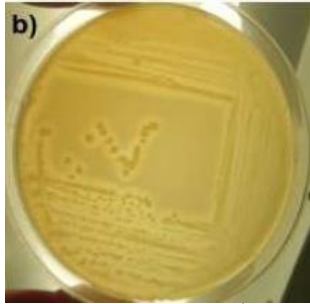
Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 55-3: Vista macroscópica muestra K

Muestra: K (C3R1)	Descripción K (C3R1):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma: Redonda Borde: Entero ondulado Superficie: Plana Color: Blanco Textura: Cremosa</p>	 <p>Fuente: (RAMIREZ-LÓPEZ, y otros, 2016)</p>

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 56-3: Vista macroscópica muestra L

Muestra: L (C4)	Descripción L (C4):	Imagen de bibliografía
	Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa acuminada Color: Crema oscuro Textura: Pastosa	 <p>Fuente: (RAMIREZ-LÓPEZ, y otros, 2016)</p>

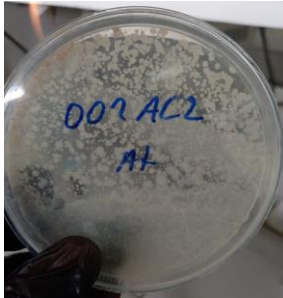

Realizado por: Orellana A. (2022)

Como se puede observar morfológicamente a primera vista y también de sus características organolépticas como el olor de las especies obtenidas en la presente investigación son muy parecidas a las que bibliográficamente se ha consultado de anteriores investigaciones en las cuales (RAMIREZ, y otros, 2018) señala que las especies encontradas son de las familias *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *lactococcus lactis spp.*

En los suelos no es frecuente encontrar especies bacterias ácido lácticas pero como lo indica (MAGNUSSON, y otros, 2002), que sí se ha encontrado especies en el suelo como *leuconostoc* y *lactococcus* aportando un dato más claro de la existencia de estos microorganismos en los suelos.

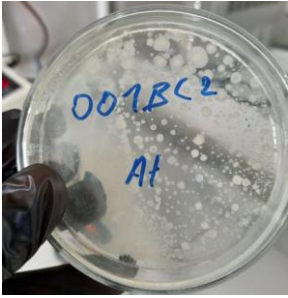

- *Identificación macroscópica de levaduras*

Tabla 57-3: Vista macroscópica muestra AL

Muestra: 001AC2 (AL)	Descripción 001AC2 (AL):	Imagen de bibliografía
	Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa acuminada Color: crema Textura: Pastosa	 <p>Fuente: (HEREDIA, y otros, 2015)</p>

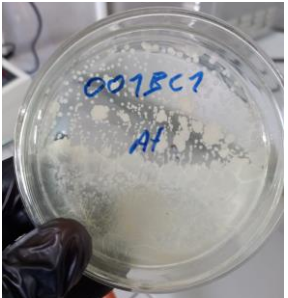

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 58-3: Vista macroscópica muestra BL

Muestra: 001BC2 (BL)	Descripción 001BC2 (BL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma: Circular Borde: Entero Superficie: Lisa Color: Crema oscuro Textura: Pastosa</p>	 (CORONEL, 2015)

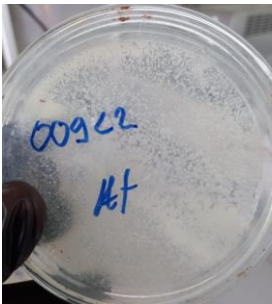

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 59-3: Vista macroscópica muestra CL

Muestra: 001BC1 (CL)	Desc. Muestra 001BC1 (CL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma: Circular Borde: Entero y ondulado Superficie: Plana Color: Crema oscuro Textura: Pastosa</p>	 Fuente: (HEREDIA, y otros, 2015)

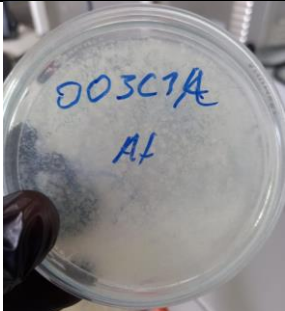

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 60-3: Vista macroscópica muestra DL

Muestra: 009C2 (DL)	Descripción 009C2 (DL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma: Puntiforme Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa Color: Blanco Textura: Pastosa</p>	 (CORONEL, 2015)

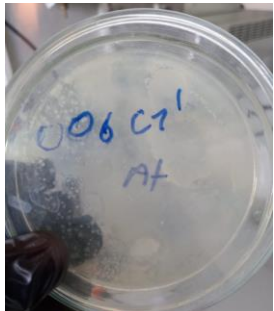

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 61-3: Vista macroscópica muestra EL

Muestra: 003C1A (EL)	Descripción 003C1A (EL):	Imagen de bibliografía
	Forma: Puntiforme Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa Color: Crema Textura: Pastosa	 Fuente: (HEREDIA, y otros, 2015)

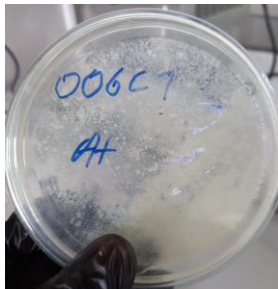

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 62-3: Vista macroscópica muestra FL

Muestra: 006C1' (FL)	Descripción 006C1' (FL):	Imagen de bibliografía
	Forma: Redonda Borde: Entero circular Superficie: Lisa Color: Crema Textura: Pastosa	 (CORONEL, 2015)

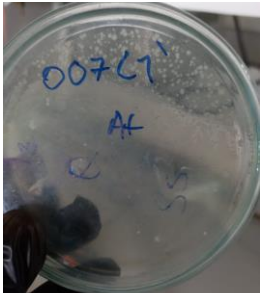

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 63-3: Vista macroscópica muestra GL

Muestra: 006C1 (GL)	Desc. Muestra: 006C1 (GL):	Imagen de bibliografía
	Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa acuminada Color: Crema oscuro Textura: Pastosa	 Fuente: (HEREDIA, y otros, 2015)

Realizado por: Orellana A. (2022)

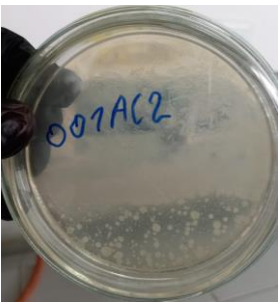

Tabla 64-3: Vista macroscópica muestra HL

Muestra: 007C1' (HL)	Descripción 007C1' (HL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma: Circular y Puntiforme Borde: Entero y ondulado Superficie: Lisa Color: Crema Textura: Pastosa</p>	 (CORONEL, 2015)

Realizado por: Orellana A. (2022)

- *Identificación macroscópica de bacterias fermentativas*

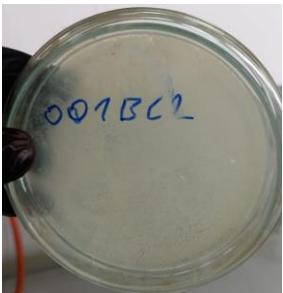
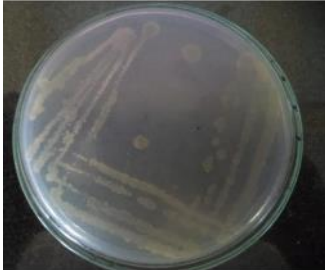
Tabla 65-3: Vista macroscópica muestra IF

Muestra: 001AC2 (IF)	Descripción 001AC2 (AL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma: Circular Borde: Entero Superficie: Lisa acuminada Color: Crema oscuro Textura: Pastosa</p>	 (JIMENEZ-SALGADO, y otros, 2007)

Realizado por: Orellana A. (2022)



Tabla 66-3: Vista macroscópica muestra JF

Muestra: 001BC2 (JF)	Descripción 001BC2 (BL):	Imagen de bibliografía

	<p>Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa acuminada Color: Crema oscuro Textura: Pastosa</p>	 (BELLANKIMATH, y otros, 2017)
---	---	--


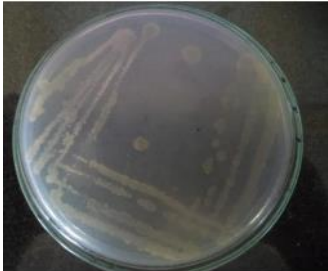
Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 67-3: Vista macroscópica muestra KF

Muestra: 001BC1 (KF)	Desc. Muestra 001BC1 (CL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa acuminada Color: Crema oscuro Textura: Pastosa</p>	 (JIMENEZ-SALGADO, y otros, 2007)

Realizado por: Orellana A. (2022)

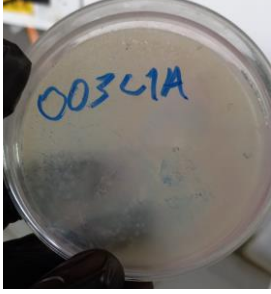

Tabla 68-3: Vista macroscópica muestra LF

Muestra: 009C2 (LF)	Descripción 009C2 (DL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa acuminada Color: Crema oscuro Textura: Pastosa</p>	 (BELLANKIMATH, y otros, 2017)

Realizado por: Orellana A. (2022)

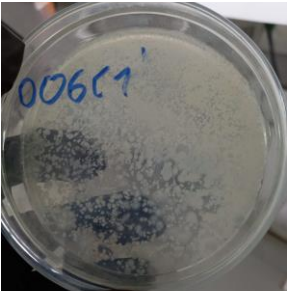
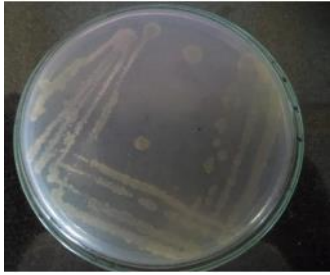
Tabla 69-3: Vista macroscópica muestra MF

Muestra: 003C1A (MF)	Descripción 003C1A (EL):	Imagen de bibliografía
----------------------	--------------------------	------------------------

	<p>Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa acuminada Color: Crema oscuro Textura: Pastosa</p>	 (JIMENEZ-SALGADO, y otros, 2007)
---	---	---



Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 70-3: Vista macroscópica muestra NF

Muestra: 006C1' (NF)	Descripción 006C1' (FL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa acuminada Color: Crema oscuro Textura: Pastosa</p>	 (BELLANKIMATH, y otros, 2017)

Realizado por: Orellana A. (2022)



Tabla 71-3: Vista macroscópica muestra OF

Muestra: 006C1 (OF)	Desc. Muestra: 006C1 (GL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa acuminada Color: Crema oscuro Textura: Pastosa</p>	 (JIMENEZ-SALGADO, y otros, 2007)

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 72-3: Vista macroscópica muestra PF

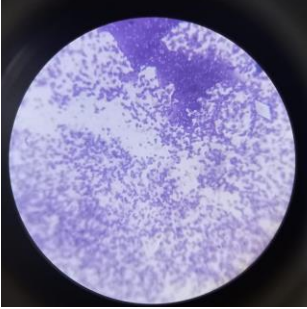
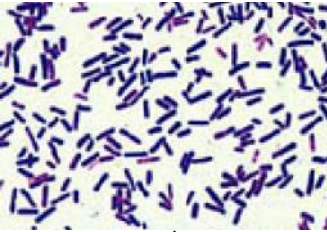
Muestra: 007C1' (PF)	Descripción 007C1' (HL):	Imagen de bibliografía
----------------------	--------------------------	------------------------

	<p>Forma: Circular Borde: Entero ondulado Superficie: Lisa acuminada Color: Crema oscuro Textura: Pastosa</p>	 (BELLANKIMATH, y otros, 2017)
---	---	--

- **Realizado por:** Orellana A. (2022)

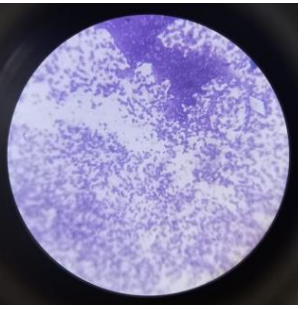
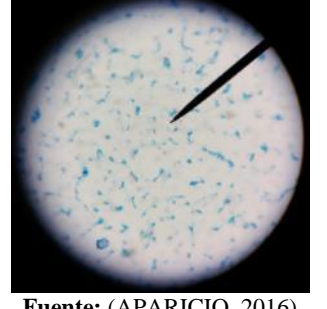
- *Identificación microscópica de los microorganismos*
- *Identificación microscópica de bacterias ácido lácticas*

Tabla 73-3: Vista microscópica muestra H

Muestra: H (C3 R2)	Descripción H (C3 R2):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Elíptica Vista lente: 100X Tinción: Gram (+) Olor: Olor a masa de pan</p>	 Fuente: (RODRÍGUEZ, 2009)

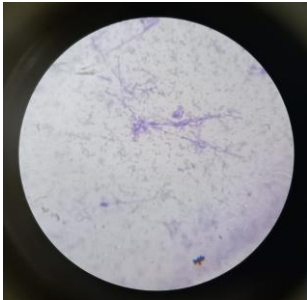

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 74-3: Vista microscópica muestra I

Muestra: I (C2)	Descripción I (C2):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Bastones largos y cocos en parejas Vista lente: 100X Tinción: Gram (+) Olor: Olor a masa de pan</p>	 Fuente: (APARICIO, 2016)

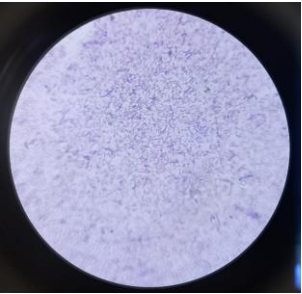
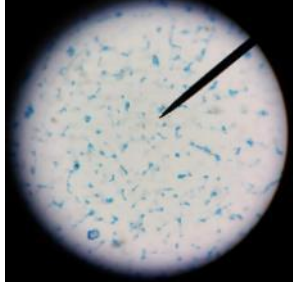
Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 75-3: Vista microscópica muestra J

Muestra: J (C1)	Descripción J (C1):	Imagen de bibliografía
	Forma estimada: Bastones alargados Vista lente: 100X Tinción: Gram (+) Olor: Olor a masa de pan	 Fuente: (APARICIO, 2016)

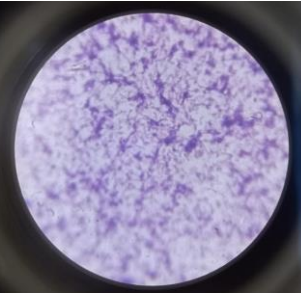
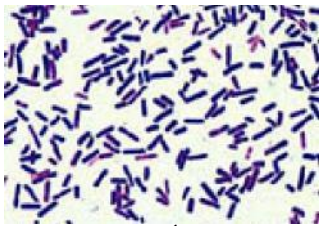
Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 76-3: Vista microscópica muestra K

Muestra: K (C3R1)	Descripción K (C3R1):	Imagen de bibliografía
	Forma estimada: Bastones cortos Vista lente: 100X Tinción: Gram (+) Olor: Olor a masa de pan	 Fuente: (APARICIO, 2016)

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 77-3: Vista microscópica muestra L

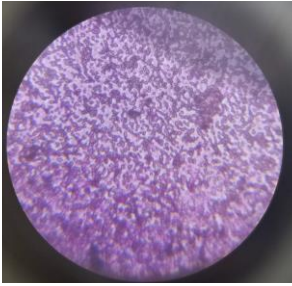
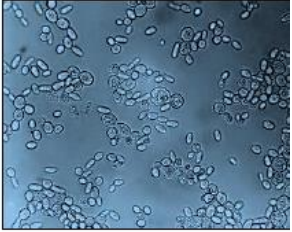
Muestra: L (C4)	Descripción L (C4):	Imagen de bibliografía
	Forma estimada: Bastones largos y cortos formando consorcios Vista lente: 100X Tinción: Gram (+) Olor: Olor a masa de pan	 Fuente: (RODRÍGUEZ, 2009)

Realizado por: Orellana A. (2022)

Como podemos observar con la vista al microscopio la comparación de las especies halladas con las consultadas bibliográficamente se puede ver según (RODRÍGUEZ, 2009) que este tipo de morfología corresponde a la familia *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus spp.* también que según (APARICIO, 2016) el tipo de morfología y el tamaño es típica de *Lactobacillus spp.* Halladas en su investigación.



- *Identificación microscópica de levaduras*

Tabla 78-3: Vista microscópica muestra AL

Muestra: 001AC2 (AL)	Descripción 001AC2 (AL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Ovalada formando consorcios</p> <p>Vista lente: 100X</p> <p>Olor: Olor a masa recién hecha</p>	 Fuente: (CORONEL, 2015)


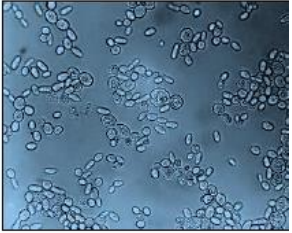
Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 79-3: Vista microscópica muestra BL

Muestra: 001BC2 (BL)	Descripción 001BC2 (BL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Ovalada alargada</p> <p>Vista lente: 100X</p> <p>Olor: Olor a masa de pan</p>	 Fuente: (RODRÍGUEZ, 2009)

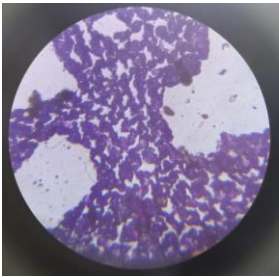

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 80-3: Vista microscópica muestra CL

Muestra: 001BC1 (CL)	Desc. Muestra 001BC1 (CL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Ovalada</p> <p>Vista lente: 100X</p> <p>Olor: Olor a masa de pan</p>	 (CORONEL, 2015)

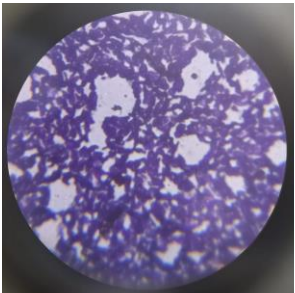
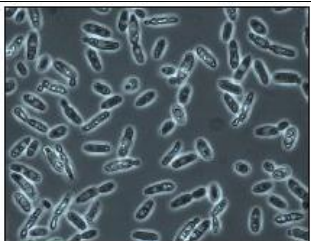
Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 81-3: Vista microscópica muestra DL

Muestra: 009C2 (DL)	Descripción 009C2 (DL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Ovaladas y estrelladas</p> <p>Vista lente: 100X</p> <p>Olor: Olor a masa de pan</p>	 Fuente: (FERREYRA, y otros, 2009)



Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 82-3: Vista microscópica muestra EL

Muestra: 003C1A (EL)	Descripción 003C1A (EL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Ovaladas alargada estrelladas</p> <p>Vista lente: 100X</p> <p>Olor: Olor a masa de pan</p>	 Fuente: (FERREYRA, y otros, 2009)

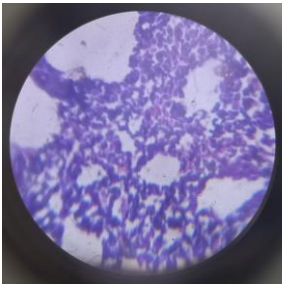
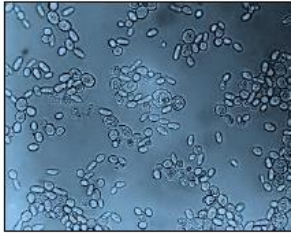
Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 83-3: Vista microscópica muestra FL

Muestra: 006C1´ (FL)	Descripción 006C1´ (FL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Bastones largos y óvalos pequeños Vista lente: 100X Olor: Olor a masa de pan</p>	 <p>Fuente: (RODRÍGUEZ, 2009)</p>

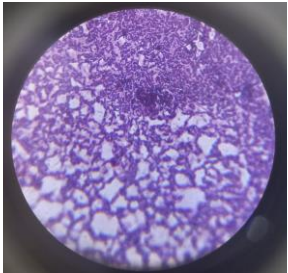
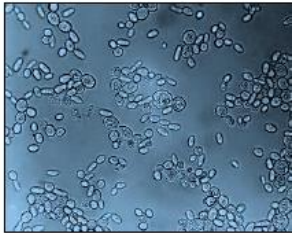
Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 84-3: Vista microscópica muestra GL

Muestra: 006C1 (GL)	Desc. Muestra: 006C1 (GL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: óvalos alargados, y óvalos estrellados Vista lente: 100X Olor: Olor a masa de pan</p>	 <p>(CORONEL, 2015)</p>

Realizado por: Orellana A. (2022)

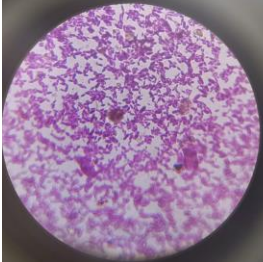

Tabla 85-3: Vista microscópica muestra HL

Muestra: 007C1´ (HL)	Descripción 007C1´ (HL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Óvalos pequeños Vista lente: 100X Olor: Olor a masa de pan</p>	 <p>(CORONEL, 2015)</p>

Realizado por: Orellana A. (2022)

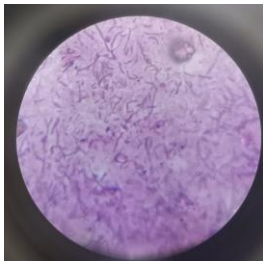
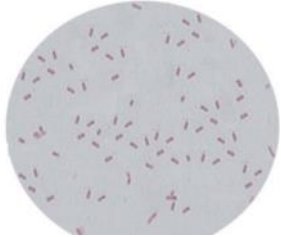
- *Identificación microscópica de bacterias fermentativas*

Tabla 86-3: Vista microscópica muestra IF

Muestra: 001AC2 (IF)	Descripción 001AC2 (AL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Bastones cortos Vista lente: 100X Tinción: Gram (-) Olor: Olor a alcohol</p>	 <p>Fuente: (BELLANKIMATH, y otros, 2017)</p>

Realizado por: Orellana A. (2022)


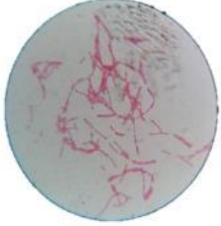
Tabla 87-3: Vista microscópica muestra JF

Muestra: 001BC2 (JF)	Descripción 001BC2 (BL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Bastones alargados Vista lente: 100X Tinción: Gram (+) Olor: Olor a alcohol</p>	 <p>Fuente: (MOLINARI, y otros, 2015)</p>

Realizado por: Orellana A. (2022)

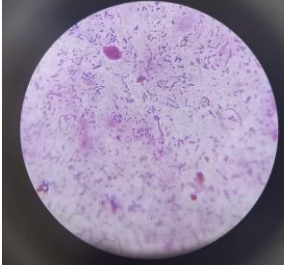
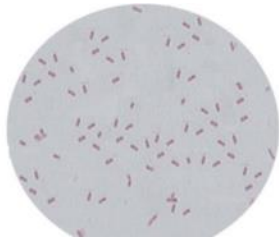
Tabla 88-3: Vista microscópica muestra KF

Muestra: 001BC1 (KF)	Desc. Muestra 001BC1 (CL):	Imagen de bibliografía

	<p>Forma estimada: Bastones alargados Vista lente: 100X Tinción: Gram (-) Olor: Olor a alcohol</p>	 <p>Fuente: (JIMENEZ-SALGADO, y otros, 2007)</p>
---	---	---



Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 89-3: Vista microscópica muestra LF

Muestra: 009C2 (LF)	Descripción 009C2 (DL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Bastones alargados y cortos Vista lente: 100X Tinción: Gram (-) Olor: Olor a alcohol</p>	 <p>Fuente: (MOLINARI, y otros, 2015)</p>

Realizado por: Orellana A. (2022)

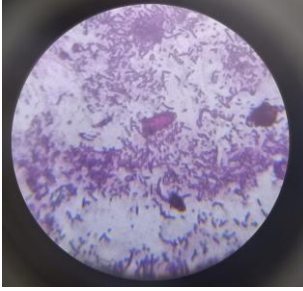
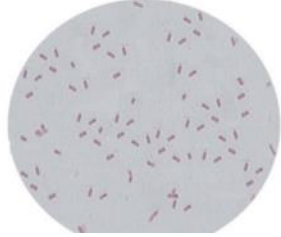
Tabla 90-3: Vista microscópica muestra MF

Muestra: 003C1A (MF)	Descripción 003C1A (EL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Bastones alargados, cortos, irregulares Vista lente: 100X Tinción: Gram (-) Olor: Olor a alcohol</p>	 <p>Fuente: (JIMENEZ-SALGADO, y otros, 2007)</p>

Realizado por: Orellana A. (2022)

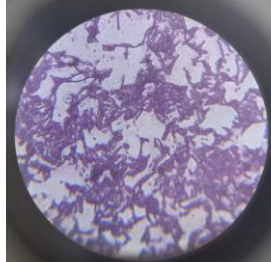

Tabla 91-3: Vista microscópica muestra NF

Muestra: 006C1' (NF)	Descripción 006C1' (FL):	Imagen de bibliografía
----------------------	--------------------------	------------------------

	<p>Forma estimada: Bastones cortos, alargados Vista lente: 100X Tinción: Gram (-) Olor: Olor a alcohol</p>	 <p>Fuente: (MOLINARI, y otros, 2015)</p>
---	---	--

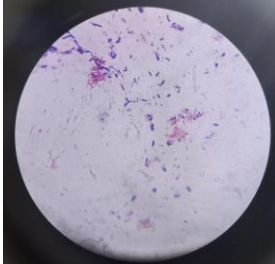

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 92-3: Vista microscópica muestra OF

Muestra: 006C1 (OF)	Desc. Muestra: 006C1 (GL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Bastones alargados Vista lente: 100X Tinción: Gram (-) Olor: Olor a alcohol</p>	 <p>Fuente: (JIMENEZ-SALGADO, y otros, 2007)</p>

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 93-3: Vista microscópica muestra PF

Muestra: 007C1' (PF)	Descripción 007C1' (HL):	Imagen de bibliografía
	<p>Forma estimada: Bastones cortos Vista lente: 100X Tinción: Gram (-) Olor: Olor a alcohol</p>	 <p>Fuente: (BELLANKIMATH, y otros, 2017)</p>

• Realizado por: Orellana A. (2022)


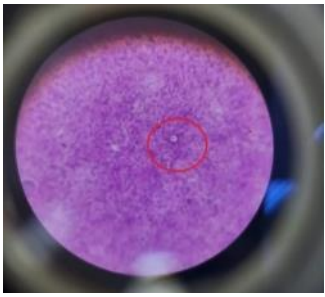
3.3. *Proyección y evaluación del potencial de los microorganismos aislados*

Debido al aumento de la población es muy importante lograr nuevas alternativas para aumentar la disponibilidad de los recursos especialmente en el área agroindustrial ya que esta puede ayudar a solucionar la hambruna mundial, en esta investigación se pudo aislar algunas especies de bacterias ácido lácticas las cuales como se pudo determinar mediante las pruebas bioquímicas en el caso de las muestras (C3R1) o la muestra C4 las cuales pudieron utilizar la lactosa como fuente de energía con lo que nos da a entender que es un posible candidata para poder fermentar productos lácteos y que sería una buena opción de investigaciones futuras.

En lo que se refiere a levaduras estas dos tuvieron mejor rendimiento y tienen la ventaja de ser las más resistentes:

Muestra 007C1' la de mejor resistencia

Tabla 94-3: Muestra 007C1' la de mejor resistencia

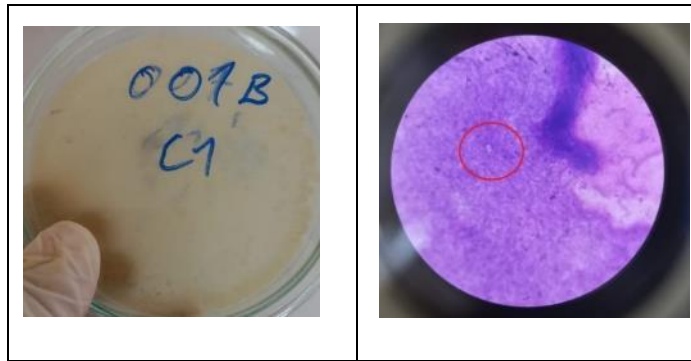
Muestra 007C1'	
Vista macroscópico	Vista microscopía
	

Realizado por: Orellana A. (2022)

Muestra 001C1 la de mejor liberación de gas

Tabla 95-3: Muestra 001C1



Muestra 001C1	
Vista macroscópico	Vista microscopía



Realizado por: Orellana A. (2022)

Muestra 001C2 la de mayor fermentación

Tabla 96-3: Muestra 001C2 la de mayor fermentación

Muestra 001C2	
Vista macroscópico	Vista microscopía
	

Realizado por: Orellana A. (2022)

Análisis Estadístico de las levaduras

Tabla 97-3: Análisis estadístico de las levaduras

Muestra	El tiempo de fermentación de un mes y medio pH	
	pH Inicio	pH Final
001AC2	7	5,9
001BC2	7	5,4
001BC1	7	5,42
009C2	7	5,6
003C1A	7	5,9
006C1´	7	6
006C1	7	6
007C1´	7	6,1

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 98-3: Tabla de hipótesis de levaduras

Hipótesis nula $H_0: \mu \leq 0$ Hipótesis alternativa $H_a: \mu > 0$															
pH finales al final de 1 mes y medio															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
In	Fin	In	Fin	In	Fin	In	Fin	In	Fin	In	Fin	In	Fin	In	Fin
7	5,9	7	5,4	7	5,42	7	5,6	7	5,9	7	6	7	6	7	6,1

Realizado por: Orellana A. (2022)

Se aplicó el test estadístico T-Student para ver si existe el desarrollo de las levaduras en donde el valor estadístico nos dio 12,39 como este valor es mayor a 1,76 se rechaza la hipótesis nula por ende al ser mayor el pH al inicio, entre la diferencia de los pH inicial y final de las levaduras quiere decir que es porque hay actividad de las levaduras al acidificar el medio que tuvo glucosa.

Análisis Estadístico de las bacterias fermentativas

Tabla 99-3: Análisis Estadístico de las bacterias fermentativas

Muestra	El tiempo de fermentación de un mes y medio	
	pH Inicio	pH Final
001AC2	7	5,75
001BC2	7	6
001BC1	7	6,2
009C2	7	6,1
003C1A	7	5,4
006C1'	7	6,2
006C1	7	6,3
007C1'	7	6,2

Realizado por: Orellana A. (2022)

Tabla 100-3: Tabla de hipótesis de las bacterias fermentativas

Hipótesis nula $H_0: \mu \leq 0$ Hipótesis alternativa $H_a: \mu > 0$															
pH finales al final de 1 mes y medio															
001AC2		001BC2		001BC1		009C2		003C1A		006C1'		006C1		007C1'	
In	Fin	In	Fin	In	Fin	In	Fin	In	Fin	In	Fin	In	Fin	In	Fin
7	5,75	7	6	7	6,2	7	6,1	7	5,4	7	6,2	7	6,3	7	6,2

Realizado por: Orellana A. (2022)

Se aplicó el test estadístico T-Student para ver si existe el desarrollo de las bacterias fermentativas en donde el valor estadístico nos dio 7,48 como este valor es mayor a 1,76 se rechaza la hipótesis nula por ende al ser mayor el pH al inicio entre la diferencia de los pH inicial y final de las bacterias fermentativas, quiere decir que es porque hay actividad de las bacterias al acidificar el medio.

CONCLUSIONES

- Se aisló microorganismos de intereses agroindustrial a partir de muestras de Suelo de Bosques Primarios del Cantón Colta, en la que se hallaron 5 especies de bacterias ácido lácticas, 8 especies de levaduras y 8 especies de bacterias fermentativas.
- Se analizó las características físicas, químicas del suelo y se pudo y en base a los valores que obtuvimos un pH de media de 7,372 con lo que nos dice que es un suelo bastante equilibrado dentro de la categoría de suelos neutros, pero también se vio algunas muestras con pH de valor de 6,81 y 6,97 que les da la categoría de suelos ácidos. Se pudo encontrar que la cantidad de nitrógeno es muy baja de un 0,0151% de media con lo cual entra a la categoría de muy pobre y esto se debe a que el bosque primario de donde se obtuvo las muestras es una zona muy lluviosa y el nitrógeno continuamente va siendo arrastrado hacia las zonas más bajas, el nivel de potasio (K) también es muy bajo de 17,518 ppm si se lo compara con suelos cultivables, y la materia orgánica arrojó resultados de 0,32 que también es muy baja por lo que es un suelo pobre en materia orgánica
- Se aislaron especies las cuales al momento de hacer la prueba de fermentación en el caso de levaduras y estas muestras pertenecieron a las muestras 001 y 009 con ambas muestras de suelo tenían un pH menor a 7 y justamente que los microorganismos aislados de estas muestras tuvieron mejor y mayor proceso de fermentación conjuntamente con la muestra 007 con lo que existen zonas un poco más ácidas las cuales tiene relación con la actividad microbiana encontrada.
- Se caracterizó a los microorganismos con lo que se puede decir que tanto en ácido lácticas sólo dos especies aisladas fermentaron la lactosa con mucha facilidad la C3R2 y la muestra C3R1 en las levaduras la muestra 001 BC1 fue la que pudo generar mayor producción de CO₂ y pasó la prueba del H₂S con lo que no es nocivo a su consumo, en bacterias fermentativas las muestras 009C2 y 007C1' fueron las que sobrevivieron al alcohol y las que fermentaron de mejor manera y en la prueba de H₂S salió negativo.
- Se pudo proyectar que su potencial uso es bastante extenso ya que en el caso de las levaduras y bacterias fermentativas al poder realizar el proceso de fermentación pueden ser utilizados como alternativas a las levaduras comerciales ya que en las especies antes mencionadas su proceso de fermentación fue muy bueno, en el caso de las bacterias ácido lácticas las especies C4 (L) y la C3R2 fueron las que tuvieron un mejor aprovechamiento de los azúcares y se la facilitó para trabajos de investigación en la carrera de Ingeniería Química y de Agroindustrias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

RECOMENDACIONES

- Cuando se vaya a realizar los muestreos de campo hay que reconocer los tipos de parámetros que se quiera medir ya que, si se requiere hacer un estudio a fondo de las características físicas, químicas o físico-químicas del suelo se tiene que hacerlo con un barreno (barrena) y con la técnica adecuada, pero si el estudio es sólo a nivel microbiológico basta con tener un alcance una pala o palilla para hacer el muestreo.
- Cuando se transporte las muestras desde el campo al laboratorio hay que hacer su estudio lo más breve posible si se desea hallar una mayor cantidad de especies microbianas, además hay que tratar de guardar las muestras de suelo durante toda la investigación porque puede fallar los estudios ya sea por contaminación o por mal manejo de los equipos o instrumentos de medida para evitar volver a hacer un muestreo.
- Realizar al comienzo del trabajo de laboratorio una conservación en nitrógeno líquido de los microorganismos y utilizar una dilución de 1×10^{-2} o 1×10^{-3} (como respaldo para poder recuperarlos si es que pasa algún percance como contaminación microbiológica falla de equipos).
- Para una mejor identificación se recomienda utilizar pruebas rápidas para cada tipo de microorganismo como las pruebas rápidas como API 50 CH para *Lactobacillus* o Remmel Rapid Yeast Plus System para el caso de levaduras u otra prueba rápida dependiendo de que tipo de microorganismo se desea aislar, además para una identificación más exacta podría utilizarse sondas de ácido nucleicos o métodos basados en PCR por sus siglas en inglés (reacción en cadena de la polimerasa).
- Esterilizar y desinfectar las áreas en donde se vaya a trabajar, así como los equipos antes de empezar con el trabajo de laboratorio e igual mantener un ambiente lo más estéril posible y evitar contaminaciones en todo el proceso de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

ABIS ONLINE BIOCHEMICAL IDENTIFICATION. 2021. Abis Online. *Abis Onlinen Biochemical*. [Online] Abis Onlinen Biochemical. [Cited: Enero 12, 2022.] https://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html.

ACOSTA, A. 2019. Universidad de Santander UDES. *Universidad de Santander*. [Online] Junio 10, 2019. [Cited: Enero 26, 2022.] <https://repositorio.udes.edu.co/entities/publication/a97bbcfca8da-4a4e-9399-fe792ddcc345>.

AGROLAB ANÁLISIS TÉCNICOS. 2017. Agrolab. *Agrolab*. [Online] Septiembre 27, 2017. [Cited: Febrero 7, 2022.] <https://studylib.es/doc/5220792/interpretaci%C3%B3n-fertilidad-de-suelos---extractos..>

ALVAREZ, M., et al. 2018. Scielo Perú. *Incidencia de la inoculación de microorganismos benéficos en el cultivo de fresa*. [Online] Scielo Perú, 01 04, 2018. [Cited: Enero 12, 2022.] http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172018000100004.2077-9917.

APARICIO, G. 2016. Universidad de Jaén. *Universidad de Jaén*. [Online] Julio 18, 2016. [Cited: Enero 30, 2022.] https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiC_qv4hf_7AhURTABHTODBRQQFnoECAkQAw&url=https%3A%2F%2Ftauja.ujaen.es%2Fbitstream%2F10953.1%2F3951%2F1%2FTFG_Mateos_Aparicio_Romero_de_%25C3%2581vila_Gabriel.pdf&usg=.

BANCO MUNDIAL. 2021. Datos Banco Mundial. *Crecimiento de Población*. [Online] Banco Mundial, Marzo 2021. [Cited: Enero 10, 2022.] <https://datos.bancomundial.org/indicador/sp.pop.grow?locations=EC>.

BELLANKIMATH, A., et al. 2017. Excellent Publisher. *Excellent Publisher*. [Online] Junio 5, 2017. <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.ijcmas.com%2F6-9-2017%2FAnurag%2520Bellankimath%2C%2520et%2520al.pdf&psig=AOvVaw0S64BVcbMqyjLkDEmFx19U&ust=1669158634810000&source=images&cd=vfe&ved=2ahUKEwiuk6TNssD7AhWNI4QIHVoAD8kQtaYDegQIABAS>. ISSN: 2319-7706.

CABRERA, E., MOLINA, A. and SHARMAN, M. 2016. INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). *Ecuador en cifras*. [Online] Junio 15, 2016. [Cited: Enero 17, 2022.] <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ve>

d=2ahUKEwj-
ondkIv8AhUFsDEKHYSuDXEQFnoECBcQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.ecuadorencifras
.gob.ec%2Fdocumentos%2Fweb-
inec%2FEstudios%2520e%2520Investigaciones%2FPobreza_y_desdignidad.

CENTER FOR AGRICULTURE, FOOD, AND ENVIRONMENT. 2018. University of Massachusetts Amherst. *University of Massachusetts Amherst*. [Online] Center for Agriculture, Food, and Environment, Mayo 15, 2018. [Cited: Febrero 17, 2022.] <https://ag.umass.edu/turf/factsheets/soil-ph-liming>.

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

CERRA, H., et al. 2013. *MANUAL DE MICROBIOLOGÍA APLICADA, LAS INDUSTRIAS FARMACÉUTICA, Y DE PRODUCTOS MÉDICOS*. Buenos Aires : Asociación argentina de microbiología, 2013. ISBN 978-987-26716-3-1.

CHATZIPAVLIDIS, I., et al. 2013. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. *FAO (organización de las las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)*. [Online] Marzo 2013. [Cited: Enero 20, 2022.] www.fao.org/docrep/meeting/028/mg309e.pdf.

CHEN, Y., YANAGIDA, F. and SHINOHARA, T. 2005. SFAM society for applied microbiology. *SFAM*. [Online] Febrero 16, 2005. [Cited: Enero 13, 2022.] <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1472-765X.2005.01653.x>.

CONDALAB. 2021. Condalab. *Condalab*. [Online] Enero 20, 2021. [Cited: Febrero 5, 2022.] <https://www.condalab.com/medios-de-cultivo-microbiologia/1223-12405-agar-ypd.html>.

CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR. 2008. Constitución de la República del Ecuador. *CRE*. [Online] Octubre 20, 2008. [Cited: Enero 27, 2022.] https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiy2si3iP_7AhVEQTABHbuFA4EQFnoECAsQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.defensa.gob.ec%2Fwp-content%2Fuploads%2Fdownloads%2F2021%2F02%2FConstitucion-de-la-Republica-del-Ecuador_ac.

CORONEL, D. 2015. Universidad Politécnica Salesiana. *UPS*. [Online] Febrero 5, 2015.

DU TOIT, W. and LAMBRECHTS, M. 2001. Elsevier. *Elsevier*. [Online] Octubre 6, 2001. [Cited: Febrero 20, 2022.] https://www.academia.edu/download/47471139/s0168-1605_2801_2900715-220160724-19164-160sp2n.pdf.

FAO (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA). 2020. Biotecnologías Agrícolas. *Biotecnologías Agrícolas en la agricultura, la silvicultura, la ganadería, la pesca y la agroindustria*. [Online] FAO, Mayo 2020. [Cited: Enero 20, 2022.] <https://www.fao.org/biotech/sectoral-overviews/agro-industry/es/>.

FAO (PORTAL DE SUELOS). 2021. Portal de Suelos de la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura. *Portal de Suelos de la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura*. [Online] FAO, Abril 19, 2021. [Cited: Enero 12, 2022.] <https://www.fao.org/soils-portal/soil-biodiversity/es/>.

FAO. 2020. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *El estado de los bosques del mundo*. [Online] Mayo 15, 2020. [Cited: SEptiembre 17, 2021.] <http://www.fao.org/3/ca8642es/CA8642ES.pdf>. ISBN 978-92-5-132421-9.

FERREYRA, M, et al. 2009. Fermentación alcohólica de jugo de naranja con *S. cerevisiae*. [Online] 2009. ISSN 1851-1716.

GATO CÁRDENAS, Y. 2017. Redalyc Organization. *Métodos de conservación y formulación de trichoderma harzianum*. [Online] Marzo 24, 2017. [Cited: Enero 27, 2022.] <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209115199008>. ISSN 1818-1686.

GERARD, L. 2015. UPV. *Universitat Politècnica de Valencia*. [Online] Diciembre 12, 2015. [Cited: 02 23, 2022.] <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjRqe6foJ37AhXZTTABHbdJBCwQFnoECAsQAQ&url=https%3A%2F%2Friunet.upv.es%2Fbitstream%2Fhandle%2F10251%2F59401%2FGERARD%2520-%2520Caracterizaci%25F3n%2520de%2520bacterias%2520>

GILCES, P. and VELOZ, P. 2006. Universidad de Guayaquil. *Universidad de Guayaquil*. [Online] Julio 7, 2006. [Cited: Febrero 13, 2022.] <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/737>.

GOMEZ-RODRÍGUEZ, D. and BERRIOS-ZEPEDA, R. 2021. Trends and tools for identifying strong and weak sustainability in agribusiness Tendencias e instrumentos para identificar la sostenibilidad en la agroindustria. [Online] 2021. <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/394/3941761010/index.html>.

GONZÁLEZ, R., et al. 2020. *Tinciones*. Zaragoza : Universidad Nacional Autónoma de México, 2020. ISBN 978-607-30-3771-6.

GOOGLE EARTH. 2022. Google. *Google*. [Online] Febrero 18, 2022. [Cited: Febrero 18, 2022.]

HAGHSHENAS, B., et al. 2014. Researchgate. *Researchgate*. [Online] Noviembre 5, 2014. [Cited: Febrero 14, 2022.] https://www.researchgate.net/profile/Yousef-Nami/publication/269419872_Potentially_probiotic_acetic_acid_bacteria_isolation_and_identification_from_traditional_dairies_microbiota/links/5d05f3bf92851c90043f4489/Potentially-probiotic-acetic-acid-bacteria-is.

HARVEY, R., CHAMPE, P. and FISHER, B. 2007. *Microbiología*. Barcelona : Wolters Kluwer, 2007. ISBN 978-84-96921-15-3.

HEREDIA, K. and CHIAYAN, E. 2015. Dspace Universidad Politécnica Salesiana. *Dspace UPS*. [Online] Marzo 25, 2015. [Cited: Octubre 5, 2021.] https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiWvIKo0sP1AhUDTTABHa5BCwkQFnoECDUQAQ&url=https%3A%2F%2Fdspace.ups.edu.ec%2Fbitstream%2F123456789%2F9052%2F1%2FUPS-QT06733.pdf&usq=A0vVaw0SjnjNKpTcVLNpDt16_kv-.

HERNÁNDEZ-URZÚA, M. 2016. *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 version impresa ISBN 978-607-9356-85-9 versión electrónica.

INEC. 2021. INEC Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. *Reporte de pobreza ingreso y desigualdad*. [Online] Instituto Nacional de Estadísticas y Censos INEC, Agosto 16, 2021. [Cited: Enero 17, 2022.] https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwi03dPmj4v8AhVoSzABHW96CHIQFnoECBwQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.ecuadorencifras.gob.ec%2Fdocumentos%2Fweb-inec%2FPOBREZA%2F2021%2FJunio-2021%2F202106_PobrezayDesigualdad.p.

JIMENEZ-SALGADO, T., et al. 2007. Researchgate. *Researchgate*. [Online] Octubre 2, 2007. https://www.researchgate.net/figure/Colony-morphologies-of-N-2-fixing-acetobacters-after-7-days-at-29C-on-LGI-agar-plates_fig1_13928222.

LAURENTIN, H. 2019. Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado. *UCLA Universidad Agrícola*. [Online] UCLA, Octubre 2019. [Cited: Enero 20, 2022.] <https://universidadagricola.com/microorganismos-beneficos-en-la-produccion-agricola-pecuaria-y-agroindustrial/>.

LEBOFFE, M. and PIERCE, B. 2011. *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory*. Englewood : Morton Publishing, 2011. ISBN: 978-089582-872-9.

Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol. **SUÁREZ-MACHÍN, C., GARRIDO-CARRALERO, NORGE ANTONIO and GUEVARA-RODRÍGUEZ, CARMEN AMARILYS.** 2016. 1, La Habana : ICIDCA, 2016, Vol. 50. ISSN: 0138-6204.

LOMBEIDA, E. 2020. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. *Instituto Nacional de Estadísticas y Censos INEC.* [Online] Enero 13, 2020. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/POBREZA/2019/Diciembre-2019/201912_PobrezayDesigualdad.pdf.

LOMBEIDA, E. and SERRANO, M. 2020. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. *Instituto Nacional de Estadísticas y Censos INEC.* [Online] Enero 16, 2020. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/POBREZA/2019/Diciembre-2019/Boletin%20tecnico%20de%20pobreza%20diciembre%202019_d.pdf.

MACKEY, B., SKINNER, E. and NORMAN, P. 2020. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [Online] Febrero 12, 2020. [Cited: Septiembre 17, 2021.] http://assets.fsnforum.fao.org.s3-eu-west-1.amazonaws.com/public/DRAFT_Primary_Forest_Report_12Feb20.pdf.

MADIGAN, M., et al. 2015. *Biología de los Microorganismos.* Décima Cuarta. Madrid : Pearson Educación, 2015. ISBN: 978-84-9035-279-3.

MAGNUSSON, J., et al. 2002. Microbiology Society. *Microbiology Society.* [Online] Mayo 01, 2002. [Cited: Enero 24, 2022.] <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-52-3-831>.

MEDINA, E. 2010. IPICYT. *Instituto Potosino de Investigación.* [Online] Agosto 16, 2010. [Cited: Febrero 16, 2022.] <https://repositorio.ipicyt.edu.mx/handle/11627/164>.

MERCHAN, D, et al. 2017. Análisis del desarrollo de la agroindustria en el Ecuador. *Ecorfan.* [Online] 2017. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjA6ITlIjov8AhUoQjABHQX8BHYQFnoECAwQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.ecorfan.org%2Fspain%2Fresearchjournals%2FEstrategias_del_Desarrollo_Empresarial%2Fvol3num10%2FRevista_de_Es. ISSN 2444-4960.

MIRANDA-FREIRE, J. 2015. Dspace. *Dspace ESPOCH.* [Online] Septiembre 11, 2015. [Cited: Enero 30, 2021.] <http://dspace.esepoch.edu.ec/handle/123456789/4062>.

MOLINARI, F. and PRAZERES, D. 2015. Science Direct. *Science Direct.* [Online] Noviembre 05, 2015. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/gluconobacter-oxydans>.

MONTANARELLA, L., PENNOCK, D. and MCKENZIE, N. 2016. *Estado Mundial del Recurso Suelo*. Roma : FAO, 2016. ISBN 978-92-5-308960-4.

MORENO LÓPEZ, J. and VELARDE ESCOBAR, K. 2016. Dspace. *Dspace ESPOCH*. [Online] Diciembre 05, 2016. [Cited: Enero 30, 2021.] <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/6276>. 236T0245.

MÜHLHAUSER, M. and RIVAS, L. 2016. ScienceDirect. *ScienceDirect*. [Online] Revista Médica Clínica Las Condes, Mayo 2016. [Cited: Enero 14, 2022.] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864014700720#fig0020>.

NORMA OFICIAL MEXICANA. 2022. Diario Oficial de la Federación SEGOB. [Online] Secretaría de Gobernación, Mayo 10, 2022. [Cited: Febrero 18, 2022.] <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwix46uSxLH7AhVeRTABHYnTD6MQFnoECAkQAQ&url=http%3A%2F%2Fwww.economia-noms.gob.mx%2Fnormas%2Fnormas%2F1995%2F111-ssa1.pdf&usg=AOvVaw2Bn7h68-wDeyTBphiS2WM9>.

NTE INEN 1529-10:2013. 2017. INEN. *INEN*. [Online] Noviembre 11, 2017. [Cited: Febrero 12, 2022.] https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjCubywwJ35AhU5kIQIHfz7A2sQFnoECAkQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.normalizacion.gob.ec%2Fbuzon%2Fnormas%2Fnte_inen_1529-10-1.pdf&usg=AOvVaw1a1ItmVX0JRci0bYtPi6A.

NTE INEN 790:2012. 2016. INEN. *INEN*. [Online] Agosto 8, 2016. [Cited: Febrero 14, 2022.] https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjYrK-2x575AhW4RzABHetvB6gQFnoECBEQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.normalizacion.gob.ec%2Fbuzon%2Fnormas%2FNTE_INEN_790.pdf&usg=AOvVaw1GsfS217AzO-56JNnf3uEB.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL DESARROLLO INDUSTRIAL. 2021. UNIDO. *UNIDO organization*. [Online] ONU, Febrero 2021. [Cited: Enero 12, 2022.] <https://www.unido.org/our-focus-building-better-future/agro-industry-agribusiness-and-food-security>.

OSTOS, O., ROSAS, S. and GONZÁLEZ, J. 2018. Scielo. *Scielo Organization*. [Online] Noviembre 11, 2018. [Cited: Enero 14, 2022.] [file:///C:/Users/Usuario/AppData/Local/Temp/1794-2470-nova-17-31-129\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/AppData/Local/Temp/1794-2470-nova-17-31-129(1).pdf).

PARÉS, R. and JUÁREZ, A. 2012. *Bioquímica de los microorganismos*. Barcelona : Editorial Reverté, S.A., 2012. ISBN 978-84-291-7454-0 edición impresa ISBN 978-84-291-9187-5.

RAMIREZ, J., MEDINA, Y. and USCANGA, I. 2018. Manual de Laboratorio de Microbiología. *Manual de Laboratorio de Microbiología*. Veracruz : Universidad Veracruzana, 2018. Vol. Volumen 1, 1.

RAMIREZ-LÓPEZ, C. and VÉLEZ_RUÍZ, J. 2016. Scielo. *Scielo*. [Online] Junio 27, 2016. [Cited: Febrero 25, 2022.] https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642016000600012. ISSN 0718-0764.

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

RODRÍGUEZ, M. 2009. Universitat Autònoma de Barcelona. *Universitat Autònoma de Barcelona*. [Online] Mayo 07, 2009. [Cited: Febrero 10, 2022.] https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwia5YSEjP_7AhX4mIQIHZauAxoQFnoECA0QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.tdx.cat%2Fbitstream%2Fhandle%2F10803%2F3931%2Fmrg1de1.pdf&usg=AOvVaw22xed5yDCKJXgTe7oVSDDr.

SANZ, S. 2012. Dialnet Uniroja. *Universidad de La Rioja*. [Online] Abril 16, 2012. [Cited: Enero 27, 2022.] <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjki-mpxp77AhV9nWoFHV5zBVgQFnoECA8QAQ&url=https%3A%2F%2Fdialnet.uniroja.es%2Fdescarga%2Flibro%2F100835.pdf&usg=AOvVaw3W8hXKYhmnCM5Rxzu5BLGI>. ISBN: 978-84-694-0870-4.

TAYE, Y., et al. 2021. Hindawi. *Hindawi The Scientific World Journal*. [Online] Agosto 10, 2021. [Cited: Febrero 9, 2022.] <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2021/4697445/>.

THURSTON CONSERVATION DISTRICT. 2019. Thurston Conservation District. *Soil and Nutrient Testing*. [Online] Thurston C. D., Agosto 2019. [Cited: Enero 19, 2022.] <https://www.thurstoncd.com/working-lands/soil-testing/>.

TIUPUL, P. and ARÉVALO, M. 2020. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. *ESPOCH*. [Online] Enero 10, 2020. [Cited: Febrero 30, 2022.] https://www.esPOCH.edu.ec/index.php/component/k2/item/download/836_e6da6d1767dea7aa963f71b2b41ffeed.html.

UDELAR. 2018. Universidad de la República Uruguay. *Facultad de Ciencias de Universidad de la República Uruguay*. [Online] Noviembre 19, 2018. [Cited: Enero 18, 2022.] <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjJ8aq5jYv8AhXeQjABHXOBA3QQFnoECBAQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.fcien.edu.uy%2Fimages%2Fpdf%2FIECA%2Fmicrobiologia-suelos%2Fpractico-1-instructivo-del-microkit.pdf&usg=AOv>.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA. 2015. Universidad Nacional de Córdoba. *UNC Web Site*. [Online] Julio 30, 2015. [Cited: Marzo 28, 2022.] https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiG_9fzjv_7AhVyRDABHQqOBLwQFnoECAwQAQ&url=http%3A%2F%2Fagro.unc.edu.ar%2F~microbiologia%2Fwp-content%2Fuploads%2F2014%2F04%2FGuia-de-Trabajos-Practicos.pdf&usg=AOvVaw3.

VARGAS, R., et al. 2009. *Guía para la descripción de Suelos*. Roma : FAO, 2009.

VERDEZOTO, D. and QUINTANA, J. 2017. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. *Repositorio de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo*. [Online] Agosto 23, 2017. [Cited: Febrero 9, 2022.] <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/2285>.

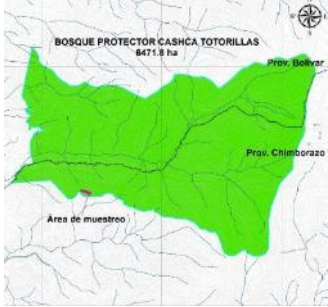




VIJAY, S. ., et al. 2017. *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture Volume I: Plant-Soil-Microbe Nexus*. Singapur : Springer, 2017. ISBN 978-981-10-5588-1.

WASSIE, M. and WASSIE, T. 2016. Researchgate. *Researchgate*. [Online] Julio 26, 2016. [Cited: Febrero 12, 2022.] https://www.researchgate.net/profile/Teketay-Wassie/publication/315681788_Isolation_and_Identification_of_Lactic_Acid_Bacteria_from_Raw_Cow_Milk/links/58db1bbb45851578dfe37508/Isolation-and-Identification-of-Lactic-Acid-Bacteria-from-Raw-Cow-Milk.pdf. ISSN: 2348-8069.

YVES, L., et al. 2020. Elsevier. *Soil sample conservation from field to lab for*. [Online] Julio 2020. [Cited: Enero 10, 2022.] <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2215016120302594?token=223BCB85EF883EC064D8649BBC00B70A11A0A4585F6983D7DEF7DE7A5100698B5ECF015E2BE902B5857C1DFD42EC61D7&originRegion=us-east-1&originCreation=20220223184606>.

ANEXOS

ANEXO A: Sitio de muestreo del suelo de bosque primario

<p>a)</p>  <p>b)</p> 	<p>c)</p> 	<p>d)</p>  <p>e)</p> 							
<p>NOTAS</p> <p>a) Bosque primario cerca de parroquia Cañi</p> <p>b) Vista del bosque a la lejanía</p> <p>c) toma de muestra</p> <p>d) Evaluación de las propiedades breves del suelo</p> <p>e) Ubicación mediante GPS del sitio de muestrei</p>	<p>CATEGORÍA DEL DIAGRAMA</p> <p><input type="checkbox"/> Aprobado</p> <p><input type="checkbox"/> Certificado</p> <p><input type="checkbox"/> Información</p> <p><input type="checkbox"/> Preliminar</p> <p><input type="checkbox"/> Por aprobar</p> <p><input type="checkbox"/> Por Calificar</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>ELABORADO POR:</p> <p>Alejandro Guillermo Orellana</p> <p>Quinchuela</p>	<p>Sitio de muestreo del suelo de bosque primario</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">LAMINA</th> <th style="width: 33%;">ESCALA</th> <th style="width: 33%;">FECHA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">1:1</td> <td style="text-align: center;">24/02/2022</td> </tr> </tbody> </table>	LAMINA	ESCALA	FECHA	1	1:1	24/02/2022
LAMINA	ESCALA	FECHA							
1	1:1	24/02/2022							






ANEXOS

ANEXO B: Análisis de las propiedades del suelo

<p>a)</p>  <p>b)</p> 	<p>c)</p>  <p>d)</p> 	<p>e)</p>  <p>f)</p> 				
<p>NOTAS</p>	<p>CATEGORÍA DEL DIAGRAMA</p> <p><input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por Calificar</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>ELABORADO POR: Alejandro Guillermo Orellana Quinchuela</p>	<p>ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES DEL SUELO</p>			
<p>a) Homogeneización de las muestras b) Preparación de las muestras y del material del suelo c) Calcinación de las muestras de suelo d) Filtrado del agua del suelo para minerales e) Material previo a la entrada de la mufla f) Medición de pH</p>			<p>LAMINA</p>	<p>ESCALA</p>	<p>FECHA</p>	
			<p>1</p>	<p>1:1</p>	<p>24/02/2022</p>	






ANEXOS

ANEXO C: Siembra y aislamiento de bacterias ácido lácticas

<p>a)</p>  <p>b)</p> 	<p>c)</p> 	<p>d)</p>  <p>e)</p> 			
<p>NOTAS</p>	<p>CATEGORÍA DEL DIAGRAMA</p> <p><input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por Calificar</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>ELABORADO POR: Alejandro Guillermo Orellana Quinchuela</p>	<p>SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS</p>		
<p>a) Pesaje y elección del agar MRS b) Homogeneización del medio de cultivo c) Siembra de las bacterias ácido lácticas d) Incubación de bacterias ácido lácticas e) Conservación de bacterias ácido lácticas</p>				<p>LAMINA</p>	<p>ESCALA</p>
			<p>1</p>	<p>1:1</p>	<p>24/02/2022</p>

ANEXOS

ANEXO D: Aislamiento de bacterias ácido lácticas

<p>a)</p>  <p>b)</p> 	<p>c)</p> 	<p>d)</p>  <p>e)</p> 			
<p>NOTAS</p>	<p>CATEGORÍA DEL DIAGRAMA</p> <p><input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por Calificar</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>ELABORADO POR: Alejandro Guillermo Orellana Quinchuela</p>	<p>AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS</p>		
<p>a) Desecador para incubación de bacterias ácido lácticas b) Evaluación de desarrollo de BAL c) Observación de BAL al microscopio d) Especie C4 de buen metabolismo de azúcares e) Especie C3R1 una de las principales especies aisladas</p>			<p>LAMINA</p> <p>1</p>	<p>ESCALA</p> <p>1:1</p>	<p>FECHA</p> <p>24/02/2022</p>



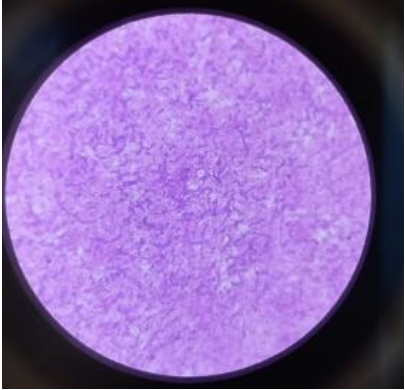
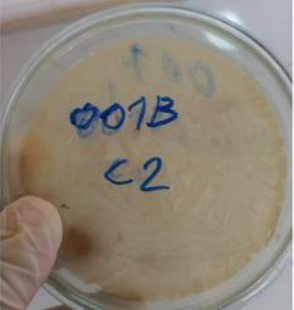
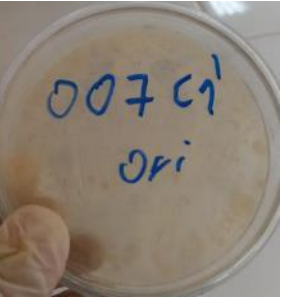
ANEXOS

ANEXO E: Aislamiento de levaduras

<p>a)</p>  <p>b)</p> 	<p>c)</p> 	<p>e)</p>  <p>f)</p> 			
<p>NOTAS</p>	<p>CATEGORÍA DEL DIAGRAMA</p> <p><input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por Calificar</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>ELABORADO POR: Alejandro Guillermo Orellana Quinchuela</p>	<p> AISLAMIENTO DE LEVADURAS</p>		
<p>a) Realización del conteo de las colonias b) Crecimiento de levaduras c) Observación de levaduras al microscopio d) Levadura resistente a alcohol e) Desarrollo de levaduras en medio PDA</p>			<p>LAMINA</p>	<p>ESCALA</p>	<p>FECHA</p>
			<p>1</p>	<p>1:1</p>	<p>24/02/2022</p>

ANEXOS

ANEXO F: Aislamiento de bacterias Fermentativas

<p>a) </p> <p>b) </p>	<p>c) </p>	<p>d) </p> <p>e) </p>							
<p>NOTAS</p>	<p>CATEGORÍA DEL DIAGRAMA</p> <p><input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por Calificar</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>ELABORADO POR: Alejandro Guillermo Orellana Quinchuela</p>	<p>AISLAMIENTO DE BACTERIAS FERMENTATIVAS</p> <table border="1" data-bbox="1532 1209 2040 1331"> <thead> <tr> <th>LAMINA</th> <th>ESCALA</th> <th>FECHA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>1:1</td> <td>24/02/2022</td> </tr> </tbody> </table>	LAMINA	ESCALA	FECHA	1	1:1	24/02/2022
LAMINA	ESCALA	FECHA							
1	1:1	24/02/2022							
<p>a) Examinación de bacterias fermentativas b) Selección y pesaje del medio de cultivo c) Vista al microscopio d) Especies desarrolladas resistente a alcohol e) Muestra que más obtuvo fermentación</p>									

ANEXOS

ANEXO G: Pruebas bioquímicas de los microorganismos

<p>a)</p>  <p>b)</p> 	<p>c)</p>  <p>d)</p> 	<p>e)</p>  <p>f)</p> 			
<p>NOTAS</p>	<p>CATEGORÍA DEL DIAGRAMA</p> <p><input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por Calificar</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>ELABORADO POR: Alejandro Guillermo Orellana Quinchuela</p>	<p>PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LOS MICROORGANISMOS</p>		
<p>a) Tinción de Gram b) Prueba de producción de CO₂ c) Prueba de fermentación de azúcares (pH= neutro) d) Prueba de fermentación de azúcares (pH= ácido) e) Prueba de SH₂ catalasa y oxidasa f) Prueba de resistencia alcohol+oliga</p>			<p>LAMINA</p>	<p>ESCALA</p>	<p>FECHA</p>
			<p>1</p>	<p>1:1</p>	<p>24/02/2022</p>