



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

**“TIPIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL
AGROINDUSTRIAL AISLADOS DE SUELO DE BOSQUES
PRIMARIOS DE LA PARROQUIA BAÑOS”.**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

AUTORA: ERIKA JACQUELINE ALLAUCA MANYA

DIRECTORA: BQF. MARÍA VERÓNICA GONZÁLEZ CABRERA

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Erika Jacqueline Allauca Manyá

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, Erika Jacqueline Allauca Manya, declaro que el presente Trabajo de Titulación de enfoque experimental es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

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

Riobamba 24 de enero de 2023

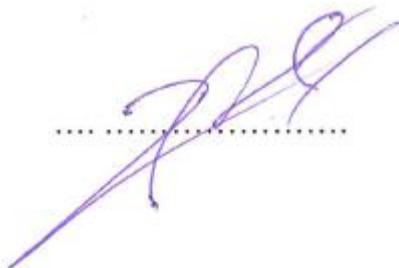
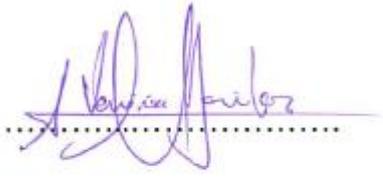
A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Erika Jacqueline Allauca Manya', enclosed within a large, loopy purple oval scribble.

Erika Jacqueline Allauca Manya

C.I: 060517434-1

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que, El Trabajo de Titulación, Tipo: Trabajo Experimental, **“TIPIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL AGROINDUSTRIAL AISLADOS DE SUELO DE BOSQUES PRIMARIOS DE LA PARROQUIA BAÑOS”**, realizado por la señorita: **ERIKA JACQUELINE ALLAUCA MANYA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científico, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	-----	FECHA
Ing. Iván Patricio Salgado Tello MsC PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-01-24
Bqf. María Verónica González Cabrera DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2023-01-24
Dr. César Iván Flores Mancheno PhD ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2023-01-24

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación le dedico a Dios por guiarme en mis estudios, sobre todo por darme las fuerzas y la sabiduría para alcanzar mis metas a pesar de los obstáculos que se presentaron en mi camino. A mi madre, por guiarme por el camino del bien, por enseñarme los valores de la vida, por su paciencia, dedicación y por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

Erika

ÍNDICE DE CONTENIDO

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

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1. Baños.....	4
1.2. Límites.....	4
1.3. La parroquia Río Negro limita:	4
1.3.1. Suelos.....	4
1.3.2. Temperatura.....	5
1.3.3. Humedad.....	5
1.4. Materia orgánica	5
1.5. Sistema ambiental - Biofísico.....	6
1.6. Microorganismos eficientes	6
1.7. Microorganismos eficientes autóctonos	7
1.7.1. Bacterias ácido-lácticas	7
1.7.1.1. Generalidades.....	7
1.7.1.2. Características y taxonomía	8
1.7.1.3. Género Bacillus.....	9
1.8. Bacterias y hongos microscópicos	9
1.9. Bacterias ácido lácticas (Lactobacillus spp).....	10
1.10. Levaduras (Saccharomyces spp).....	10
1.11. Ecología microbiana	10
1.12. Importancia de los microorganismos.....	11
1.13. Consorcios microbianos	12
1.14. Aislamientos de microorganismos.....	12
1.15. Método de identificación	13
1.15.1. Métodos de Identificación Bacteriana	13
1.15.2. Tinción de Gram y morfología	13

1.15.3.	<i>Pruebas bioquímicas</i>	14
1.15.4.	<i>Catalasa</i>	14
1.15.5.	<i>Oxidasa</i>	15
1.15.6.	<i>Movilidad</i>	15

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	16
2.1.	Localización y duración del experimento	16
2.2.	Unidad de Análisis	16
2.3.	Población del Estudio	16
2.4.	Tamaño de la Muestra	16
2.5.	Selección de la Muestra	17
2.6.	Localización del trabajo de titulación	17
2.7.	Localización de la fase de campo	18
2.8.	Localización de la fase de Laboratorio	18
2.9.	Unidad experimental	19
2.10.	Materiales, Equipos e instalaciones	19
2.10.1.	<i>Materiales, reactivos e instalaciones</i>	19
2.10.2.	<i>Materiales de laboratorio</i>	20
2.10.3.	<i>Reactivos de laboratorio</i>	21
2.10.4.	<i>Equipos</i>	22
2.10.5.	<i>Instalaciones</i>	23
2.11.	Tratamiento y diseño experimental	23
2.12.	Mediciones experimentales	23
2.13.	Técnicas estadísticas	24
2.14.	Metodología de la evaluación	24
2.14.1.	<i>Método de muestreo en campo</i>	24
2.15.	Fase de Laboratorio	25
2.15.1.	<i>Método de preparar las muestras en el laboratorio para el aislamiento</i>	25
2.15.2.	<i>Siembra de Bacterias Ácido Lácticas (Medio de Cultivo MRS)</i>	25
2.15.3.	<i>Siembra de Levaduras (Medio Cultivo YPD Yeast Extract Peptone Dextrose)</i> ... 26	
2.15.4.	<i>Siembra de levaduras (Medio de Cultivo Sabourand)</i>	26
2.15.4.1.	<i>Procedimiento</i>	26
2.15.5.	<i>Siembra de bacterias Acéticas</i>	27
2.15.5.1.	<i>Procedimiento</i>	27
2.15.6.	<i>Identificación macroscópica de microorganismos de uso agroindustrial</i>	27

2.15.7.	<i>Identificación microscópica de Bacterias Ácido Láctica</i>	27
2.15.8.	<i>Identificación microscópica de levaduras</i>	28
2.15.9.	<i>Identificación microscópica de Bacteria Acéticas</i>	28
2.15.10.	<i>Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas</i>	28
2.15.10.1.	<i>Procedimiento</i>	28
2.15.11.	<i>Aislamiento de levaduras</i>	29
2.15.11.1.	<i>Procedimiento</i>	29
2.15.12.	<i>Aislamiento de bacterias Acéticas</i>	30
2.15.13.	<i>Identificación bioquímica de los microorganismos</i>	30
2.15.13.1.	<i>Prueba de catalasa</i>	30
2.15.13.2.	<i>Prueba de oxidasa</i>	30
2.15.13.3.	<i>Prueba de tinción de Gram</i>	30
2.15.13.4.	<i>Procedimiento</i>	31
2.15.13.5.	<i>Prueba KOH</i>	31
2.15.13.6.	<i>Prueba de movilidad</i>	31
2.15.13.7.	<i>Procedimiento</i>	32
2.15.13.8.	<i>Prueba de fermentación de azúcares</i>	32
2.15.13.9.	<i>Procedimiento:</i>	32
2.15.13.10.	<i>Prueba de fermentación de azucares en bacterias acéticas y levaduras</i>	33
2.15.13.11.	<i>Procedimiento:</i>	33
2.15.13.12.	<i>Prueba bioquímica caldo YPD</i>	34
2.15.13.13.	<i>Procedimiento</i>	34
2.15.14.	<i>Prueba de producción de ácido sulfhídrico</i>	34
2.15.15.	<i>Identificación de especies microbiológicas con el software ABIS</i>	35
2.15.16.	<i>Medición de la cantidad de la materia seca del suelo</i>	36
2.15.16.1.	<i>Procedimiento</i>	36
2.15.17.	<i>Medición de la cantidad de cenizas en las muestras de suelos</i>	36
2.15.17.1.	<i>Procedimiento</i>	36
2.15.18.	<i>Medición de la cantidad de materia orgánica en las muestras de suelo</i>	37
2.15.18.1.	<i>Procedimiento</i>	37
2.15.19.	<i>Medición de la cantidad de nitrógeno en las muestras de suelo</i>	38
2.15.20.	<i>Medición de la cantidad de minerales (Magnesio) en las muestras de suelo</i>	38
2.15.21.	<i>Medición de la cantidad de minerales Nitratos en las muestras de suelo</i>	39
2.15.22.	<i>Medición de la cantidad de potasio en las muestras de suelo</i>	39
2.15.23.	<i>Conservación de microorganismos de uso agroindustrial</i>	39
2.15.23.1.	<i>Procedimiento</i>	39

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS RESULTADOS ..	40
3.1.	Análisis de resultados	40
3.1.1.	<i>Caracterización del suelo de bosque primario del Cantón Baños</i>	<i>40</i>
3.1.2.	<i>pH del suelo de bosque primario</i>	<i>40</i>
3.1.3.	<i>Materia orgánica del suelo de bosque primario</i>	<i>41</i>
3.1.4.	<i>Humedad del suelo de bosque primario</i>	<i>41</i>
3.1.5.	<i>Ceniza del suelo de bosque primario</i>	<i>41</i>
3.1.6.	<i>Nitrógeno asimilable del suelo del bosque primario</i>	<i>42</i>
3.1.7.	<i>Cantidad de potasio (K), de las muestras de suelo de bosque primario</i>	<i>42</i>
3.1.8.	<i>Cantidad de magnesio (Mg), de las muestras de suelo de bosque primario</i>	<i>42</i>
3.1.9.	<i>Cantidad de nitrato, de las muestras de suelo de bosque primario</i>	<i>43</i>
3.2.	Conteo de los microorganismos	43
3.1.	Bacterias Ácido lácticas	43
3.1.1.	<i>Aislamiento de las Bacterias Ácido Lácticas.</i>	<i>43</i>
3.1.2.	<i>Caracterización in vitro de los microorganismos aislados</i>	<i>44</i>
3.2.	Caracterización de los microorganismos para uso agroindustrial	44
3.2.1.	<i>Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas de Bacterias ácido lácticas.</i>	<i>44</i>
3.2.1.1.	<i>Prueba bioquímica de Tinción Gram</i>	<i>45</i>
3.2.1.2.	<i>Pruebas bioquímicas de Catalasa</i>	<i>45</i>
3.2.1.3.	<i>Pruebas bioquímicas de Oxidasa</i>	<i>45</i>
3.2.1.4.	<i>Prueba bioquímica de KOH</i>	<i>46</i>
3.2.2.	<i>Prueba de movilidad</i>	<i>46</i>
3.2.3.	<i>Prueba de fermentación de azúcares</i>	<i>46</i>
3.3.	Bacterias Acéticas	48
3.3.1.	<i>Aislamiento de Bacterias Acéticas</i>	<i>48</i>
3.3.2.	<i>Selección de los grupos morfológicos a través de tinción Gram BA</i>	<i>48</i>
3.3.3.	<i>Pruebas Bioquímicas de las muestras aisladas (Bacterias Acéticas)</i>	<i>49</i>
3.3.4.	<i>Prueba de fermentación de azúcares de las BA</i>	<i>49</i>
3.3.4.1.	<i>Producción de ácido sulfhídrico</i>	<i>50</i>
3.4.	Levadura	50
3.4.1.	<i>Aislamiento de Levaduras</i>	<i>50</i>
3.4.2.	<i>Selección de los grupos morfológicos a través de Tinción Gram</i>	<i>50</i>
3.4.3.	<i>Pruebas Bioquímicas de las muestras aisladas</i>	<i>51</i>
3.4.4.	<i>Prueba de fermentación de azúcares de levaduras</i>	<i>51</i>
3.4.5.	<i>Prueba de producción ácido sulfhídrico</i>	<i>52</i>

CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Características principales de las bacterias ácido-lácticas (BAL).....	8
Tabla 2-1:	Taxonomía con los géneros más importantes de BAL.....	9
Tabla 3-1:	Métodos de aislamiento más frecuentes	12
Tabla 1-2:	Formulación del Agar YPD.....	26
Tabla 2-2:	Ingredientes de caldo rojo fenol	32
Tabla 3-2:	Fórmula del caldo YPD en g/L.....	34
Tabla 1-3:	Composición físico-químico del suelo de bosque	40
Tabla 2-3:	Conteo de microorganismos estadísticamente.....	43
Tabla 3-3:	Morfología de las especies aisladas de las BAL	44
Tabla 4-3:	Identificación bioquímica de las especies aisladas de BAL.	45
Tabla 5-3:	Resultados de la prueba de fermentación de azúcares BAL.....	46
Tabla 6-3:	Morfología de las especies aisladas de BA	48
Tabla 7-3:	Caracterización microscópica de BA	48
Tabla 8-3:	Identificación bioquímica de especies aisladas de BA.....	49
Tabla 9-3:	Resultado de Fermentación de azúcares de BA	50
Tabla 10-3:	Morfología de la especie aislada de la levadura	50
Tabla 11-3:	Caracterización microscópica de la Levadura.....	51
Tabla 12-3:	Pruebas bioquímicas en la Levadura Caldo YPD.....	51
Tabla 13-3:	Pruebas de fermentación de azúcares de la levadura.....	52

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-1:	Límites de Baños.....	4
Ilustración 2-1:	Caracterización morfológica de las bacterias en cultivos primarios.	14
Ilustración 1-2:	Área de muestreos	17
Ilustración 2-2:	Mapa de ecosistemas (Provincia de Baños).....	18
Ilustración 3-2:	Localización de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo	19
Ilustración 4-2:	Aislamiento mediante siembra por estrías.....	29
Ilustración 5-2:	Página de identificación Bioquímica.....	35
Ilustración 6-2:	Elección de microorganismo a investigar	35

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** GEORREFERENCIACIÓN DEL LUGAR DE MUESTREO
- ANEXO B:** PESAJE DE LAS MUESTRAS Y ESTERILIZACIÓN
- ANEXO C:** SIEMBRA LOS MICROORGANISMOS EN LOS AGARES ESPECÍFICOS
- ANEXO D:** AISLAMIENTO Y CONTEO DE LAS CEPAS
- ANEXO E:** SELECCIÓN DE BACTERIAS
- ANEXO F:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS.
- ANEXO G:** ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO
- ANEXO H:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR MRS
- ANEXO I:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO MRS
- ANEXO J:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR *ACETOBACTER* GLUCOSA
- ANEXO K:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR SABORAU DEXTROSA
- ANEXO L:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR POTATO DEXTROSA
- ANEXO M:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO POTATO DEXTROSA BROTH
- ANEXO N:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO YPD
- ANEXO O:** POBLACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO BAÑOS
- ANEXO P:** CONTEO DE LAS PLACAS IDENTIFICADAS DE LAS BAL
- ANEXO Q:** CONTEO DE LAS PLACAS IDENTIFICADAS DE BA
- ANEXO R:** CONTEO DE LAS PLACAS IDENTIFICADAS DE LAS LEVADURAS
- ANEXO S:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
- ANEXO T:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS
- ANEXO U:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LAS LEVADURAS

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la tipificación de microorganismos con potencial agroindustrial como las familias: *Acetobacter*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces*, aislados de un suelo del bosque primario de la parroquia Baños. El trabajo de laboratorio se lo realizó a partir de una disolución madre del suelo, con una dilución seriada hasta una concentración de 1×10^{-5} , luego se sembró por vertido en placa en medios selectivos específicos para los tres microorganismos como agar acetobacter glucosa para bacterias acéticas en aerobiosis a un pH neutro, agar MRS para *Lactobacillus* en anaerobiosis a un pH 5.5, agar YPD para *Saccharomyces* en anaerobiosis a un pH neutro y mediante la siembra por estrías se realizó la purificación. Se tipificó con pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa, KOH y H₂S, se utilizó los principales azúcares como lactosa, glucosa, manitol, fructosa, galactosa se incubó a 36 °C por 48 horas. Además, se analizó los parámetros físico químicos del suelo como pH, materia orgánica y minerales. Obteniendo como resultado 7 especies de bacterias ácido lácticas, 2 especies de bacterias acéticas y 1 especie de levadura, se observó la metabolización de azúcares, pH bajo, fermentación, liberación de CO₂, resultaron negativo a la prueba de H₂S y no representa un riesgo para su uso agroindustrial. Los parámetros físicos químicos del suelo, resultaron con un pH 6.12, materia orgánica 70.80 %, nitrógeno 0.34%, potasio 10.84 mg/L y magnesio 8.53 mg/L. Se concluye que las especies que se tipificó posiblemente pertenezcan a los géneros *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, las Bacterias acéticas al género *Acetobacter* y Levaduras al género *Sacharomyces* poseen un buen potencial agroindustrial al haber tenido un óptimo proceso de fermentación y la no liberación de H₂S, se recomienda realizar pruebas rápidas o prueba PCR para una mejor tipificación de las especies estudiadas.

Palabras claves <AGROINDUSTRIAS>, <BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS>, <BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS>, <BOSQUE PRIMARIO>, <PRUEBAS BIOQUÍMICAS>, <ÁCIDO SULFHÍDRICO>



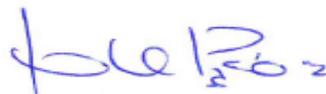
0644-DBRA-UPT-2023

ABSTRACT

The objective of this research work was to determine the typing of microorganisms with agroindustrial potential such as the families: Acetobacter, Lactobacillus and Saccharomyces, isolated from a soil of the primary forest in Baños town. The laboratory work was carried out starting from a stock solution of the soil, with a serial dilution up to a concentration of 1×10^{-5} . Then it was sown by pouring on a plate in specific selective media for the three microorganisms such as acetobacter glucose agar for acetic acid bacteria in aerobiosis at neutral pH, MRS agar for Lactobacillus in anaerobiosis at pH 5.5, YPD agar for Saccharomyces in anaerobiosis at neutral pH, and purification was carried out by streak sowing. It was typed with biochemical tests such as catalase, oxidase, KOH and H₂S. The main sugars such as lactose, glucose, mannitol, fructose, galactose were used and incubated at 36 °C for 48 hours. In addition, the physical and chemical parameters of the soil such as pH, organic matter and minerals were analyzed. As a result, 7 species of lactic acid bacteria, 2 species of acetic acid bacteria and 1 species of yeast were obtained. Sugar metabolization, pH under fermentation and CO₂ release were observed, which were negative in the H₂S test and do not represent a risk for agro-industrial use. The physical and chemical parameters of the soil were pH 6.12, organic matter 70.80%, nitrogen 0.34%, potassium 10.84 mg/L and magnesium 8.53 mg/L. It is concluded that the species that were typified possibly belong to the genera *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, the acetic bacteria to the genus *Acetobacter* and yeasts to the genus *Sacharomyces* have a good agroindustrial potential having had an optimal fermentation process and the non-release of H₂S. It is recommended to perform rapid tests or PCR tests for a better typing of the species under study.

Keywords: <AGROINDUSTRIES>, <ACID LACTIC ACID BACTERIA>, <ACID ACETIC BACTERIA>, <PRIMARY FOREST>, <BIOCHEMICAL TESTS>, <SULPHYDRIIC ACID>.

0644-DBRA-UPT-2023



Dra. Gloria Isabel Escudero Orozco. MsC.

0602698904

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la forma más común se busca poder identificar e aislar microorganismos de los bosques primarios ya que son el hogar natural de muchas especies únicas tanto vegetales, animales y microbiológicas las cuales muchas veces son propias del país o únicas de la zona, de la misma forma que gracias a su riqueza biológica ayudan a que los ciclos biogeoquímicos así como en el flujo del agua y el aire se den con mucha más facilidad haciendo que la vida prolifere en abundancia siendo una fuente de liberación de oxígeno hacia la atmósfera y de absorción del CO₂ que genera el efecto invernadero .

El interior del suelo de bosques primarios al ser un suelo no afectado por el accionar humano este tiene una microflora muy rica a niveles de diversidad biológica con muchas especies de microorganismos como las bacterias *Bacillus*, *Actinomicetes*, *Pseudomonas*, *Cianofíceas*, también hongos como *Penicillium*, *Aspergillus* los cuales son unos excelentes microorganismos benéficos para la aplicación en la industria , amplia en campos el agroindustrial en la cual se los utiliza para la fabricación de derivados alimenticios, los microorganismos de montañas contienen un promedio de 80 especies de microorganismos de unos 10 géneros, que pertenecen básicamente a cuatro grupos: bacterias fotosintéticas, actinomicetos, bacterias productoras de ácido láctico y levaduras, que se desarrollan en diferentes ecosistemas, en estos ecosistemas se genera una descomposición de materia orgánica, que se convierte en los nutrientes necesarios para el desarrollo de su flora (Tencio, 2015, p.1).

Una importancia indiscutible ya que son considerados esponjas de adsorción de los recursos hídricos, garantizan el balance ecológico en las zonas productivas más bajas y son refugio de especies silvestres que pueden tener un gran potencial biotecnológico (Allauca, 2018, p.11). Mientras que los estudios realizados sobre microbiología del suelo han aumentado gradualmente en los últimos años debido al rápido avance de la ciencia, en la actualidad los ecosistemas paramunos tienen una gran demanda de explotación gracias a la abundancia de muestras de plantas, animales y microorganismos que poseen, pues estas representan infinidad de posibilidades y nuevas alternativas de utilización en industrias de alimentos, producción de químicos, materiales poliméricos, perfumes y productos farmacéuticos entre ellos las plantas (Arias, et al., 2018 p. 3).

En el Ecuador los bosques primarios constituyen una parte importante porque posee muchos climas y también uno de las mayores biodiversidades a nivel mundial hace que también exista un sinnúmero de especies microbiológicas beneficiosas para la producción agroindustrial y ayudar a las poblaciones a satisfacer sus necesidades alimentarias para mejorar su calidad de vida (Mestre,

2016 p. 6), con el propósito de aprovechar de una manera más racional y sostenible los recursos naturales sin causarles ningún tipo de perturbaciones, se escogieron zonas delimitadas del Bosque siempre verde ya que son zonas rurales donde no ha intervenido de manera significativa la mano del hombre por lo que es más favorable poder hallar alguna variedad microbiónicas benéficas para la humanidad ya que pocos son favorecidos por la tecnología (Uribe, 2015, p.13), la naturaleza brinda suelos con un alto nivel de diversidad biológica, contribuir al conocimiento e investigación científica de la microflora, especialmente para la identificación y aislamiento de bacterias y levaduras, ya que son importantes en diversos campos agroindustriales, se realiza la investigación en la parroquia Baños de la provincia de Tungurahua donde esta área no ha sido intervenida por el ser humano, considerando una zona con muchas especies microbiónicas, lo cual sus resultados se utilizarán en diferentes técnicas que permitan la recuperación de un cierto número de cepas a utilizar en posteriores investigaciones en el campo de la biotecnología, debido a que el mundo está atravesando un crisis de confinamiento provocado por la pandemia ha hecho que este estudio sea relevante para indagar microorganismos con potencial agroindustrial ya que la humanidad requiere una alimentación saludable ya que es un factor muy importante en el ser humano adquirir alimentos que fortalezcan el sistema inmunológico para que el cuerpo esté preparado para combatir cualquier virus o enfermedades que se desconoce al pasar los años.

El propósito de esta investigación fue aislar e identificar microorganismos con potencial agroindustrial, en un tiempo establecido de 60 días, tomando en cuenta una zona donde no ha intervenido la mano del hombre ya que con sus acciones provocan contaminaciones que afectan la zona, perjudicando la flora y fauna, por lo que se ha considerado una zona fuera de riesgos de contaminación, el estudio de investigación se realizó en el Bosque siempreverde parroquia Baños, uno de los lugares del Ecuador que nos brindan una naturaleza con un alto nivel de biodiversidad ya que en la actualidad se ha incrementado aprovechar los sinnúmeros de especies microbiónicas benéficas que se puede aplicar en varios campos industriales, uno de los principales para el ser humano es obtener microorganismos potenciales agroindustrial para la implementación de la elaboración de alimentos, ya que al pasar el tiempo la humanidad requiere de alimentos saludables que al adquirirlo tengan beneficios para su sistema inmunológico y así afrontar enfermedades o virus que se presentan hoy en día.

Por esta razón el presente estudio tiene como objetivo Tipificar los microorganismos con potencial agroindustrial aislados de muestras de suelo del Bosque siempreverde de la parroquia Baños y como objetivos específicos

Analizar los parámetros físico- químico para las muestras de suelo obtenidas

Cuantificar los microorganismos viables con potencial agroindustrial de las muestras de suelo obtenidas

Caracterizar in vitro el microbiota con potencial agroindustrial aislada en forma de consorcios o de cepas individuales.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Baños

La presente investigación se desarrolló dentro de la parroquia Río Negro ubicado al suroccidente del cantón Baños aproximadamente a unos 30 Km de distancia. Su poblado se encuentra asentado a un rango altitudinal de 1.186 m s.n.m. Cuya extensión de 628,7 km², correspondiente al 59,06 % de su área total. Con una población de 1.276 habitantes, según el censo realizado en el 2011 por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) (Pozo, 2020 p. 22).

1.2. Límites

1.3. La parroquia Río Negro limita:

Al Norte: Con la ciudad del Tena y el Parque Nacional Llanganates.

Al Sur: Con la provincia del Macas.

Al Este: Con la ciudad del Puyo y al Oeste: Con la parroquia Río Verde, en toda su extensión hasta su desembocadura en el Río Pastaza según lo citado por el (Gobierno Provincial Pastaza, 2019 p. 65), a continuación, la ilustración 1-1, muestra la superficie del suelo urbano y rural del cantón Baños de Agua Santa, en el cual, se puede diferenciar al Río Negro de color rojo con sus respectivos límites geográficos.



Ilustración 1-1: Límites de Baños

Fuente: (Gobierno Provincial Pastaza, 2019 p. 65)

1.3.1. Suelos

Conforme a la información cartográfica del IGM, El cantón Baños posee siete formaciones rocosas y en lo correspondiente a la parroquia El Río Negro; se destacan dos tipos de suelo según

(MAE, 2018 p. 65). Inceptisoles: cuya principal característica, dentro de este tipo de suelo se encuentra conformado por ceniza volcánica de antiguas erupciones, formando suelos negros, pesado limosos, bastante suaves y esponjosos, cuyo tipo de suelo torna una tonalidad amarillenta a mayor profundidad y una capacidad de retención de humedad de 100 a 200 % (APP, 2019 pp. 34-35) y los Histosoles son suelos que se componen primordialmente por un alto contenido de material orgánico conocidos como turbas. Se hallan saturados de agua, cuyas características impide la mineralización de los materiales orgánicos (APP, 2019, p.35).

1.3.2. *Temperatura*

Ecuador, al encontrarse ubicado geográficamente sobre la línea ecuatorial, a lo largo del año. Solo hay dos estaciones definidas: húmeda o invierno y seca o verano (Varela, et al., 2018 p. 2). Además, estas dos estaciones varían regionalmente (Varela, et al., 2018 p. 2).

En la región Costa, la época lluviosa comienza entre el diciembre hasta mayo; En los Andes, la estación lluviosa perdura los meses de octubre a mayo y la seca de junio a septiembre. En la región amazónica hay diferencias entre norte y sur. En la Amazonía norte, la época lluviosa dura de marzo a noviembre mientras que la seca de diciembre a febrero y la Amazonía sur, el patrón estacional muestra similitud a la región Sierra (Varela, et al., 2018 p. 2).

1.3.3. *Humedad*

Según (Ramírez, et al., 2015 p. 17), dentro del plan de Ordenamiento Territorial, desde el año 1999, se registra una humedad relativa media anual de 85 % y una media mínima anual de 40 %; prevaleciendo estos datos hasta el año 2004. El incremento de precipitación evaluados desde el año 2005 ha ocasionado el incremento de la humedad relativa mínima anual, hasta el 68% y manteniéndose a la actualidad. Estos cambios en la intensidad de la precipitación han incrementado el flujo del Rio Negro convirtiendo a esta región vulnerable a deslizamientos, afectando la biodiversidad biótica y abiótica (Ramírez, et al., 2015 p. 17).

1.4. Materia orgánica

Los residuos como: ramas, corteza, raíces y hojas de los árboles, arbustos y arvenses en general es el principal material que conforma la materia orgánica del suelo. Misma que se forma bajo condiciones naturales. Llegando aportar anualmente al suelo una gigantesca proporción de residuos orgánicos según (Bonifaz, et al., 2020 p. 18). Además, menciona que el contenido de materia

orgánica en el suelo de uso agrícola se compone por aquellos residuos que se deja con la finalidad de incrementar el contenido nutricional del suelo y en casos los restos animales son uno de los elementos que conforman la estructura del material orgánico en un suelo (Bonifaz, et al., 2020 p. 18).

Según indica (Navarro, et al., 2013 p. 35); existen millones de microorganismos que viven en la capa fértil de la tierra y son la base fundamental de la salud de las plantas. El número de especies y el distinto tipo de vida microbiológica del suelo depende del tipo de cultivos que se desarrollan, el sistema de trabajo que se emplea, del clima y la clase de suelo (Navarro, et al., 2013 p. 35).

Aquellos suelos cuyas prácticas culturales que han sido realizadas de manera adecuada, contribuyen a la gran biodiversidad de microorganismos que contribuyen a su estructura en comparación a suelos cuyas actividades convencionales como el uso de abonos químicos y el abuso de pesticidas según (Navarro, et al., 2013 p. 35), pierden muchas características estructurales y por ende disminuya número de microorganismo benéficos.

1.5. Sistema ambiental - Biofísico

El sistema ambiental o biofísico posee una interrelación entre los recursos bióticos y abióticos obteniendo un equilibrio en la naturaleza (flora, fauna) y los asentamientos humanos a lo largo de la historia, en el cual no solo intervienen un grupo de especies asociadas y el ser humano, sino también dichos elementos ambientales que influyen positiva o negativamente (Dominguez, et al., 2019 p. 5). Dentro de un diagnóstico referente al sistema ambiental y biofísico se consideran criterios hidrográficos, biogeográficos, climáticos, ecológicos de dinámica natural y antropogénica causados por el ser humano con la finalidad de conocer cómo influye él uno del otro, dentro y fuera de un ecosistema (Dominguez, et al., 2019 p. 5).

1.6. Microorganismos eficientes

La “biotecnología verde” considerada como una de las ramas de la biotecnología la cual ofrece nuevos campos biotecnológicos al sector ambiental y agroindustrial, cuya función permite potenciar el desarrollo económico de un sector sin una fuerte contaminación (Bermudez y Rojas, 2019 p. 75).

Según (Bermudez y Rojas, 2019 p. 75), mencionan que aún existen microorganismos eficientes (EM), sin ninguna manipulación genética, mismo que son originarios de varios hábitats naturales. Son microorganismos benéficos, cuya función es equilibrar el ecosistema en el que se encuentran

(Bermudez y Rojas, 2019 p. 75). Los EM (microorganismos eficientes), se los considera al grupo de microorganismos aerobios, anaerobios y ciertos microorganismos fotosintéticos dentro del suelo. Las cuales poseen distintas aplicaciones industriales que contribuyen a mejorar ciertos procesos en la elaboración de alimentos, reducción de olores e incluso la agricultura la cual contribuye a la nula aplicación de agroquímicos (Bermudez y Rojas, 2019 p. 75).

1.7. Microorganismos eficientes autóctonos

Según (Leiva y Morocho, 2019 p. 2), los microorganismos eficientes (EMA) son inoculantes microbianos de uso agrícola, ganadero, agroindustrial y medio ambiental. Aquí se encuentran levaduras, bacterias ácido lácticas, bacterias fotosintéticas en baja proporción, actinomicetos y hongos, mismos que llegan a ser compatibles entre sí y pueden coexistir dentro de un mismo lugar (Leiva y Morocho, 2019 p. 2).

Un ejemplo claro en cuanto al uso de los EMA (microorganismos eficientes autóctonos), se encuentra dentro de la agricultura cuya función ha sido el de incrementar la productividad bajo condiciones orgánicas o naturales (Leiva y Morocho, 2019 p. 2).

1.7.1. Bacterias ácido-lácticas

1.7.1.1. Generalidades

Las bacterias ácido-lácticas conocidas como bacterias BAL, es un grupo de microorganismos de origen natural provenientes de procesos de fermentación en plantas (maíz, cebada, col y etc.), carne, productos lácteos y suelo (Ferrari, et al., 2020 p. 8). Actualmente las bacterias BAL son más conocidas por contribuir en ciertas características como organolépticas y fisicoquímicas a la leche (Ferrari, et al., 2020 p. 8).

Estas bacterias según (Fernández, 2019 p. 26), son de importancia económica en el mercado ya que estos sirven para crear derivados lácteos como el yogur, requesón o quesos como el Cheddar y Camembert; además en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales.

Las BAL contribuyen a ciertos procesos de fermentación para la producción de salchichas, jamones curados, vinos, cerveza y licores fortificados. Por esta razón dentro de la industria alimentaria es indispensable y de gran proyección económica por los diferentes beneficios que brindan como es el caso del sabor o el olor de ciertos subproductos alimenticios (Fernández, 2019 p. 26).

Investigaciones mencionan que ciertos pacientes con sistemas inmunes deteriorados han utilizado a las bacterias ácido-lácticas como un tratamiento para reforzar el sistema inmune mediante los alimentos donde estas bacterias forman parte y así evitar patologías como la endocarditis y septicemia (Jaramillo, 2020 p. 38). De esta forma las BAL tienen la posibilidad de actuar como alimentos probióticos con el objetivo de mejorar la salud del ser humano (Jaramillo, 2020 p. 38).

1.7.1.2. Características y taxonomía

Las bacterias ácido-lácticas como su nombre lo indica producen principalmente ácido láctico en el proceso de fermentación, hidrolizando los péptidos de la leche (Armoa, 2020 p. 33). El crecimiento de las mismas depende de la producción de proteinasas y peptidasas y como consecuente la presencia de exopolisacáridos (EPS) llegan a modificar las proteínas aportando a la generación de nuevas características organolépticas (sabor, aroma, textura) y fisicoquímicas en alimentos (Armoa, 2020 p. 33).

Mediante el análisis de ADN ribosómico, estas bacterias se clasifican en: *Lactobacillales* y *Bifidobacteriales*, dentro de ellas se encuentran las bacterias Gram positivas como se puede observar en la tabla 1 y las *Lactobacillales*; aquellas de mayor importancia industrial (Jaramillo, 2020 p. 73).

Tabla 1-1: Características principales de las bacterias ácido-lácticas (BAL)

Parámetro	Característica
Tinción diferencial	Gram positivas
Formadores de esporas	No
Motilidad	No
Morfología	Cocos y bacilos
Longitud	Variable
Grosor	0,5-0,8 um
Tipo de respiración	Anaerobias facultativas
Prueba catalasa	Negativa
Prueba oxidasa	Negativa
Clasificación nutricional	Quimioorganotrofos
Fuentes de energía	Carbohidratos fermentables y alcoholes

Fuente: (Jaramillo, 2020 p. 83).

Realizado por: Allauca, Erika, 2023

Tabla 2-1: Taxonomía con los géneros más importantes de BAL

Orden	Familia	Género
Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium
Lactobacillales	Aerococcaceae	Aerococcus
	Camobacteriaceae	Cmobacterium
	Enterococcaceae	Enterococcus
	Lactobacillaceae	Lactobacillus, Pediococcus
	Leuconostocaceae	Leuconostoc, Oenococcus, Weisella
	Streptococcaceae	Streptococcus, Lactococcus

Fuente: (Jaramillo, 2020, p.88).

Realizado por: Allauca, Erika, 2023.

1.7.1.3. Género *Bacillus*

Las especies del género *Bacillus* son bacterias aerobias precisos o anaerobios facultativos, que se mueven por medio de flagelos insertados en disposición peritrica que llegan a medir de 0.5-2-5 a 1.2-10 μm ; son saprofitas, catalasa positiva y quimiorganótrofas de metabolismo fermentativo (Leiva y Morocho, 2019 p. 23). Mismas que muestran una gran capacidad fisiológica la cual les permiten sobrevivir en varios ambientes naturales (Leiva y Morocho, 2019 p. 23).

El periodo de vida de *Bacillus* se divide en dos etapas: el incremento vegetativo y la esporulación (Gavín, 2018 p. 14). En la primera etapa (aumento vegetativo), estas bacterias crecen de manera exponencial en el ambiente donde las condiciones nutricionales son favorables (Gavín, 2018 p. 15). Una vez que los nutrientes son limitados la bacteria inicia su segundo proceso llamado esporulación, mismo que forma una endospora, cuya composición de la endospora, les permite sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, desecación, pH, entre otras condiciones ambientales (Gavín, 2018 p. 15).

1.8. Bacterias y hongos microscópicos

Según (Maldonado, 2020 p. 42), las bacterias y los hongos microscópicos (HM) son principalmente organismos heterotróficos cuya principal alimentación se basa de materia orgánica en descomposición (saprobios) o de materia viva (parásitos). Encontrándose en distintos ecosistemas como: por ejemplo, ríos, océano, suelo, restos vegetales, restos animales, en los seres vivos, además permanecen distribuidos en regiones desérticas incluyendo zonas excesivamente gélidas existentes en el planeta (Maldonado, 2020 p. 42).

Los microorganismos son vitales en el equilibrio ecológico del suelo; los cuales contribuyen a la degradación y formación de materia orgánica ayudando a la retención de nutrientes, como es el caso del proceso de transformación del nitrógeno para ser asimilable para las plantas (Gamboa, et al., 2019 p. 55).

A lo largo de la historia el ser humano a utilizado a los microorganismos y sus procesos metabólicos como la fermentación para la elaboración del pan, alcohol, aditivos para la industria y en el campo de la biorremediación de sitios contaminados (Gamboa, et al., 2019 p. 54). En general los metabolitos que producen las bacterias benéficas pese al costo en la preparación de medicamentos para humanos, plantas y animales han contribuido de manera importante, pues el control biológico de plagas y patologías es otro campo que los microorganismos logran ser una herramienta de control (Gamboa, et al., 2019 p. 55).

1.9. Bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus spp*)

Las bacterias fotosintéticas y levaduras producen ácido láctico a partir de azúcares y otros carbohidratos (Chingana, et al., 2017 p. 4). Como es el caso de los *Lactobacillus*, que tiene la capacidad mediante la fermentación el desdoblamiento de lignina y celulosa, permitiendo la descomposición de los materiales vegetales (Chingana, et al., 2017 pp. 3-4). Además, de poseer la facilidad de eliminación de microorganismos patológicos, como los hongos del género *Fusarium*, responsable del debilitamiento de las plantas, facilitando que otros patógenos causen la muerte o la baja producción (Chingana, et al., 2017 p. 4).

1.10. Levaduras (*Saccharomyces spp*)

Sintetizan tanto sustancias antimicrobiales, como compuestos útiles para el incremento de las plantas, partiendo de aminoácidos y azúcares (secretados por las bacterias fotosintéticas), así como de materia orgánica (Morales, 2019 p. 16). Los recursos hechos por las levaduras (hormonas y enzimas), promueven la separación activa de células, siendo sustratos útiles para las bacterias ácido lácticas y los actinomicetos (Morales, 2019 p. 16).

1.11. Ecología microbiana

El concepto ambiente abarca los componentes físicos, químicos y biológicos; cada uno de estos se relacionan entre sí, en los cuales se desarrollan miles de microorganismos (Guzmán, 2017 p. 3). Estos desempeñan un papel relevante, el cual podría inferir por el diminuto tamaño que poseen. Pues según (Guzmán, 2017 p. 3), con una visión ecológica menciona que los microorganismos

forman parte de la sociedad y de todo el ecosistema; cada organismo en un ecosistema interactúa de manera que logra modificar ciertas propiedades del mismo (Guzmán, 2017 p. 3).

(López, et al., 2018 p. 26); menciona que existen ambientes, donde los organismos se encuentran relativamente ausentes debido a factores extremos tanto físicos como químicos, aun existiendo una extensa variedad de microorganismos existen algunos que se desarrollan en zonas de acidez extrema, desecación, salinidad, entre otros. Sin embargo, los componentes del ambiente por la situación antropogénicas afectan a los microorganismos en la naturaleza (López, et al., 2018 p. 26). Pues los laboratorios en la actualidad se han convertido en un medio de cultivo de varios microorganismos con fines industriales logrando mayor número de colonias en comparación a la cantidad de microorganismos que de manera natural se reproducen, ya que es más difícil dentro de un ecosistema natural el desarrollo y reproducción de estos individuos microbiológicos; pese a tener una gran resistencia a zonas abruptas (López, et al., 2018 p. 26).

1.12. Importancia de los microorganismos

Los microorganismos desarrollan diferentes procesos vitales enfocados mayoritariamente a su ingesta de alimentos, lo que es eficaz para la obtención de energía por medio del consumo de nutrientes, cada microorganismos cumple con un papel en la biósfera, interactuado en la estabilidad natural e incorporando recursos anteriormente metabolizados, siendo igualmente importantes para el desempeño de los ciclos biogeoquímicos, ya hace años los microorganismos se han usado para la obtención de diferentes productos por medio del aprovechamiento de sus habilidades metabólicas (Espitia, 2020 pp. 62-63).

Pues ciertos microorganismos como es el caso de los anaerobios tiene la capacidad de transformar mediante procesos de fermentación ciertos alimentos, en la industria minera el procesamiento de ciertos minerales, mediante la lixiviación se dan proyectos de remediación ambiental, pues ciertos microorganismos poseen la capacidad de metabolizar y degradar determinadas sustancias contaminantes, gracias a proceso es como tomo importancia el concepto biorremediación, logrando con éxito recuperar regiones contaminadas por derrames petroleros y varios de sus derivados (Espitia, 2020 p. 63).

(Serrano, et al., 2012 p. 21); menciona que la biorremediación usa el potencial metabólico de los microorganismos primordialmente bacterias, al igual que hongos y levaduras, de forma que los contaminantes orgánicos se degraden en compuestos más básicos, reduciendo extremadamente la contaminación del suelo incluyendo el agua (mares, ríos, lagunas y el océano); (Leiva y Morocho,

2019 p. 54). Según avanza el tiempo la biotecnología presenta nuevos usos en los microorganismos, relacionando esta ciencia con la ingeniería genética el combinar genes en ciertos microorganismos contribuyen a conocer nuevas funcionalidades de provecho mundial (Serrano, et al., 2012 p. 21).

1.13. Consorcios microbianos

Según (Anguisaca, 2017 p. 13), la sociedad de bacterias interactúa de manera distinta una de otra. Pues cada especie de microorganismos muestran diferentes requerimientos nutricionales y energéticos, por lo que la formación de colonias podría ser más beneficiosa que una sola especie; ejemplificando para la biolixiviación de un mineral debido a que ciertos compuestos son difíciles de oxidar por una especie de microorganismos tienen la posibilidad de ser oxidados por la otra (Anguisaca, 2017 pp. 13-14).

1.14. Aislamientos de microorganismos

El aislamiento de un microorganismo no necesariamente implica ser un patógeno; en un proceso de ciertas enfermedades, rara vez puede tratarse de flora saprofita o un representante vacunal (Valladares, 2010 p. 25), el microorganismo aislado puede poseer una tipificación antigénica para poder demostrar la existencia de elementos virulentos, etc. Así mismo, la falta aislamiento de un microorganismo no implica claramente que éste no sea la causante de cierta enfermedad cita (Chasi, 2015 p. 15). En bacteriología se aplican medios enriquecidos y selectivos artificiales, pruebas bioquímicas y en algunos casos identificación por medio de antisueros. Los resultados se expresan como género y especie bacteriana aislada y en ocasiones en cantidades relativas según (Valladares, 2010 p. 22), citado por (Chasi, 2015 p. 15)

Tabla 3-1: Métodos de aislamiento más frecuentes

Tipo de Siembra	Mecanismo	Técnica
Agotamiento porestrías	Agotamiento progresivo y continuo del inóculo.	Consiste en realizar múltiples estriados en el medio sólido en diferentes secciones, tomando en cada rayado solo la muestra de la sección anterior.
Diseminación ensuperficie	Extensión múltiple del inóculo.	Se extiende con una espátula de siembra una mínima cantidad de muestra (50µL) rotando múltiples veces el medio sólido.
Diluciones seriadas	Dilución sucesiva del inóculo.	Consiste en realizar diluciones graduales de la muestra con la finalidad de sembrar la menor cantidad de colonias en el medio sólido.

Fuente: (Camacho, 2016 p. 22)

Elaborado por: Allauca, Erika, 2023.

1.15. Método de identificación

1.15.1. Métodos de Identificación Bacteriana

Las bacterias estudiadas en el presente trabajo demostraron tener una significativa capacidad de minimizar metales, gracias a ello es necesario detectar en forma rigurosa dichos microorganismos para aplicarlos en procesos de biorremediación (Leyva, 2017 p. 26).

El valor de hacer esta identificación se debe a que ciertas funciones de las bacterias permitan conocer con exactitud el tipo de organismo, sus propiedades morfológicas, fisiológicas e inferir sus probables mecanismos de resistencia, con el fin de usar las características de los microorganismos en beneficio del ser humano evitando peligros o efectos adversos (Villacis, 2017, p.63). La identificación bacteriana radica a encontrarse definido a un taxón, basándose en la decisión confiable de las propiedades fenotípicas y genotípicas de un microorganismo comparando dichas propiedades con otros taxones involucrados a la categorización considerada (Chingana, et al., 2017 p. 52), el cómo identificar cierta familia bacteriana principalmente se hace mediante procedimientos clásicos, basados en la observación de las propiedades fenotípicas, ya que su ejecución y precio ayuda a esta técnica sea la más conveniente (Leyva, 2017, p.27).

El procedimiento usual de cultivo continúa siendo un procedimiento evaluativo que una vez sea factible es posible efectuarlo, debido a que posibilita el confinamiento bacteriano y su identificación (Leyva, 2017 p. 27). Para detectar bacterias por medio de este procedimiento es preciso examinar la agrupación, morfología colonial, características, propiedades morfológicas, el comportamiento frente a la tinción Gram y sus procesos metabólicos en los ensayos para lograr una producción de enzimas y óxido a partir de la fermentación (Gamboa, et al., 2019 p. 8).

1.15.2. Tinción de Gram y morfología

La identificación es un método fundamental para poder aislar distintas colonias bacterianas, y mediante la observación poder clasificarlas por su forma, consistencia, y color. En el caso de la tinción Gram permite obtener una clasificación generalizada, donde se puede evidenciar dos grandes grupos mediante su forma (Castillo, et al., 2022 p. 22). Las Gram positivas (+) y las Gram negativas (-), logrando un control de pureza en las colonias bacterianas, en el cual la gran mayoría de bacterias Gram (-) resultan ser patógenas, mientras que las Gram (+) no representan peligro al ser humano; aquí se encuentran las tan conocidas bacterias ácido-lácticas menciona (Castillo, et al., 2022 p. 22).

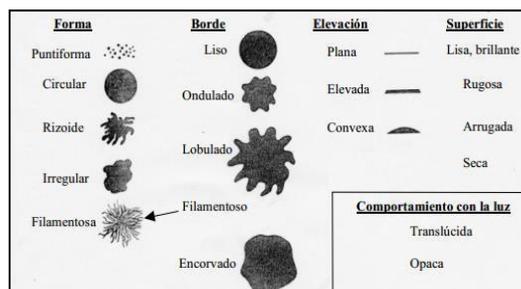


Ilustración 2-1: Caracterización morfológica de las bacterias en cultivos primarios.

Fuente: (Genesis, 2019 p. 1).

1.15.3. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son usadas para identificar de manera concisa la existencia o ausencia de una enzima o conjunto de enzimas en un microorganismo o una vía metabólica completa (Morales, 2019 p. 26), esta técnica necesita de un medio de cultivo bacteriano anterior para poder conocer e identificar los microorganismos existentes en una muestra (Morales, 2019 p. 26). Los procedimientos bioquímicos sólo permiten la identificación más clara posible pero no definitiva, o sea que mostrarán solo el género o solo su especie a la que el microorganismo pertenece, pero no de manera absoluta (Morales, 2019 pp. 26-27).

Hay diversos tipos de pruebas bioquímicas entre ellos están las pruebas fundamentadas en letras y números de resistencia a ciertas sustancias, la prueba de solubilidad en bilis, las pruebas que se aplican en la identificación preliminar y con lectura rápida como la catalasa y oxidasa; además se encuentran las llamadas pruebas lentas, con lectura de 18 a 48 horas; que incluirían la óxido-fermentación y al final las pruebas rápidas (Ríos, et al., 2017 p. 63); entre los paquetes bioquímicos comerciales más utilizados para la identificación de bacterias se hallan las pruebas API y Vitek, las cuales permiten la diferenciación entre Gram positivas, Gram negativas y la identificación de bacterias entéricas, no entéricas, especies de *Streptococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Campylobacter*, levaduras entre otras (Mestre, 2016 p. 82).

1.15.4. Catalasa

Se trata de una adaptación de los microorganismos al H₂O₂ (Peróxido de hidrogeno) que, aunque no es un radical libre es poco reactivo. La enzima catalasa es de vital importancia en los organismos, para la eliminación del H₂O₂ intracelular, protegiendo a las especies aeróbicas o reactivas del oxígeno por ser un residuo, de las especies anaeróbicas resultando negativo en una prueba ya que no se podrá evidenciar el burbujeo menciona Kraeva y Horáková en el 2017, citado

por (Castillo, et al., 2022 p. 22).

1.15.5. Oxidasa

La prueba de oxidasa permite la identificación de la enzima oxidasa, debido a la reacción con el citocromo oxidasa, que activa el citocromo por la presencia de oxígeno generado de la descomposición entre el oxígeno y el agua, esto depende mucho de la especie bacteriana de tipo aerobias, mismas que darán positivo a esta prueba, mientras que la gran mayoría de bacterias anaerobias obtendrán resultados negativos y las bacterias anaeróbicas estrictas por lo general no poseen esta enzima, generan oxidasa negativa (Olmos, et al., 2010 p. 6).

1.15.6. Movilidad

La bacteria al poseer una pared celular y uno o varios flagelos, cuya función es para movilizarse en el medio donde se desarrollan, esta facilidad de moverse les proporciona dirigirse hacia lugares más cómodos, donde las condiciones y las fuentes de alimento son favorables (Pino, F. 2012 citado por (Chasi, 2015 p. 28).

El agar es un medio de cultivo solidificante en ciertas concentraciones la cual le permite mantenerse semisólido, cuya condición primordial para identificar su movilidad, que se prueba por el enturbiamiento del medio o por aumento que difunde más allá de la línea de siembra (Pino, F. 2012, citado por (Chasi, 2015 p. 28).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Localización y duración del experimento

El presente trabajo de Investigación se realizó en el laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias, perteneciente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en la avenida Panamericana Sur km 1 1/2, en la ciudad de Riobamba provincia de Chimborazo, Ecuador; la misma que tendrá una duración de 60 días.

2.2. 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 ácido lácticas, bacterias acéticas y levaduras.

2.3. Población del 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 primarios de la Provincia de Tungurahua, es por ello por lo que trata de dar a conocer a los investigadores, docentes, y técnicos docentes de 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, así como a los pobladores de la parroquia de Baños 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 muy húmedo Pre-Montano. Se encuentra en la provincia de Tungurahua, las coordenadas 78°13'W - 01°24'S; el bosque se encuentra 1500 m.s.n.m.

2.4. Tamaño de la Muestra

Se la realizará la toma de muestras de suelo de varias áreas del bosque primario de la parroquia Baños. La cantidad de suelo utilizado para análisis se llevó 0.5 kg al laboratorio, empacado en

una bolsa plástica debidamente identificada con tinta permanente, o en un recipiente hermético.

2.5. Selección de la Muestra

Para la toma de muestras no existe un método único, en esta investigación se realizó bajo un recorrido con la finalidad de tomar las muestras mediante zig-zag; tomando un punto central el cual debe contener abundante materia orgánica en el suelo. Luego de que se establecieron las áreas de muestreo, se procede a obtener una muestra de cada una de ellas. Ésta muestra estará compuesta por varias submuestras (Mau, et al., 2011 p. 45), cuanto mayor es la cantidad de submuestras que se tomen, más representativa será la muestra total. Para el suelo la muestra se tratará de que sea lo más representativa para lo cual se la va a realizar de forma sistemática, cada muestra puede estar compuesta de 5 submuestras, para un 80% de precisión (Mau, et al., 2011 p. 45). La cantidad de suelo utilizado para análisis de 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 y se tomará el suelo de la rizosfera (Mau, et al., 2011 p. 45).



Ilustración 1-2: Área de muestreos

Elaborado por: Allauca, Erika, 2023.

2.6. Localización del trabajo de titulación

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

2.7. Localización de la fase de campo

La toma de muestras se la hizo a partir de un suelo de un bosque primario de la parroquia Baños perteneciente a la provincia de Tungurahua, dicho bosque se caracteriza por ser bosque de húmedo pre-montano cuyas coordenadas son $78^{\circ}13'W - 01^{\circ}24'S$; con una altitud de 1500 m.s.n.m.

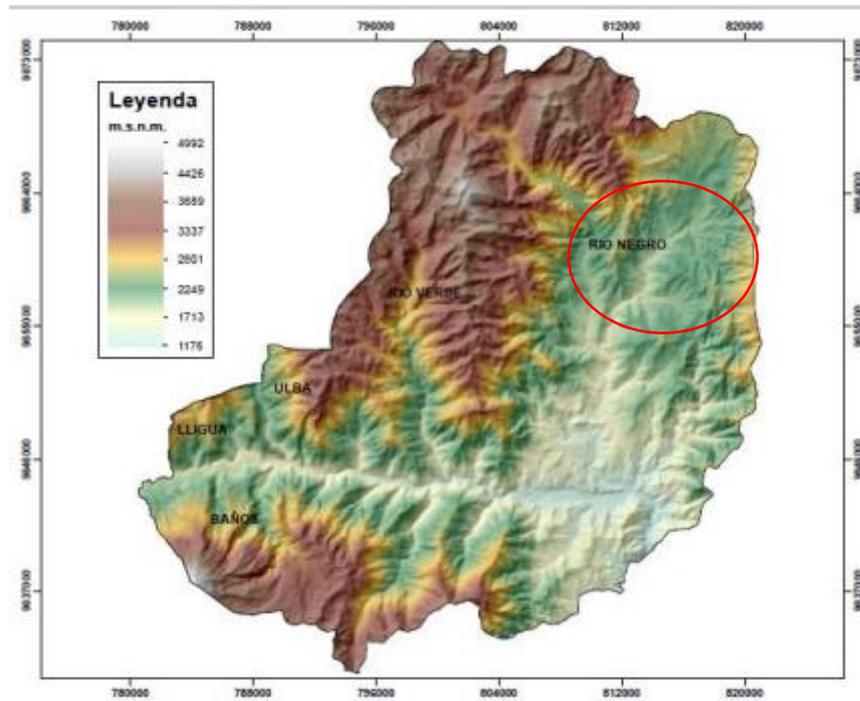


Ilustración 2-2: Mapa de ecosistemas (Provincia de Baños)

Fuente: (GAD Baños de Agua Santa, 2014 p. 21).

2.8. Localización de la fase de Laboratorio

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Ciencias Biológicas y Bromatología de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo de la ciudad de Riobamba, ubicada en la región central de la serranía ecuatoriana en la provincia de Chimborazo de la Panamericana Sur km 1 ½ cuyas coordenadas son $78^{\circ}40'59''$ de longitud oeste y $01^{\circ}38'51''$ de latitud sur y 2850 m.s.n.m. de altitud. (Negrete, 2016, p.14)

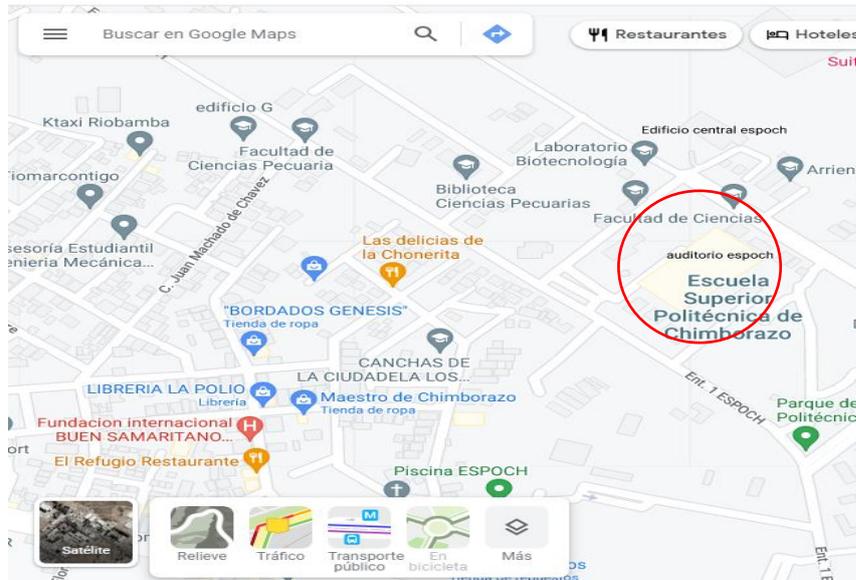


Ilustración 3-2: Localización de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Fuente: Google maps citado por Allauca Erika, 2023.

2.9. Unidad experimental

Para el presente estudio se utilizó 500 g de suelo por cada repetición, lo cual se lo realizará 5 repeticiones y 2500 g por total de la unidad experimental.

2.10. Materiales, Equipos e instalaciones

2.10.1. *Materiales, reactivos e instalaciones*

Materiales y Reactivos de Campo:

- Gradillas
- Tubos de ensayo
- Cajas Petri
- Espátulas
- Asa de siembra
- Funda Ziploc
- Frascos Térmicos
- Cámara
- Kuler de espuma flex
- Pipeta de vidrios

- Mechero
- Papel aluminio
- Pinza
- Guantes
- Cofia
- Mandil
- Probeta
- Barreno
- GPS
- Porta objetos
- Vaso termo resistente

2.10.2. Materiales de laboratorio

- 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
- Algodón
- Asa de siembra microbiológica
- Atomizadores
- Botellas plásticas de 350 mL
- Cápsulas de porcelana
- 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 objeto

2.10.3. *Reactivos de laboratorio*

- Agar MRS
- Caldo MRS
- Peptona
- Tiras de oxidasa
- Solución de Lugol
- Peróxido de Hidrogeno
- Agua destilada
- Alcohol 96%
- Yodo
- Agar TSI

- Acetato de plomo
- Aceite de inmersión
- Ácido sulfúrico
- Ácido bórico
- Azul de Metileno
- Agar Sabouraud
- Caldo YPD (Peptona, Dextrosa, extracto de levadura)
- Cloranfenicol (antibiótico)
- Etanol (70%)
- Glicerol
- Hidróxido de Potasio
- Peróxido de hidrógeno al 3
- Reactivo de tinción Gram

2.10.4. Equipos

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

- Computadora
- Cámara de flujo laminar
- Lámpara de desinfección
- Autoclave

2.10.5. Instalaciones

Se realizó los estudios experimentales 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.

2.11. Tratamiento y diseño experimental

No se utilizará diseño experimental

2.12. Mediciones experimentales

Análisis físico-químico del suelo:

pH

Materia orgánica

Humedad

Ceniza

Nitrógeno

Potasio, Magnesio y nitrato

Identificación de bacterias y levaduras:

Bacterias ácido lácticas: (*Lactobacillus*, *Bacillus*)

Bacterias acéticas: (*Acetobacter aceti* y *spp*)

Levaduras: (*Saccharomyces cerevisiae* y *spp*)

Recuentos de microorganismos:

Bacterias Ácido Lácticas (UFC/g)

Bacterias Acéticas (UFC/g)

Levaduras (UPC/g)

Caracterización de los microorganismos:

Macroscópica

Morfología (Color, Forma y Superficie)

Pruebas bioquímicas

Caracterización bioquímica de las diferentes especies encontradas:

Catalasa

Oxidasa

Prueba de Hidróxido de potasio

Peróxido de potasio

Prueba de movilidad

Pruebas de fermentación de azúcares

Prueba del CO₂ en Caldo YPD

Producción de ácido Sulfhídrico

2.13. Técnicas estadísticas

Estadística descriptiva: media

2.14. Metodología de la evaluación

En la presente investigación se utilizó el siguiente procedimiento:

2.14.1. Método de muestreo en campo

Se utilizó el muestreo al azar consiste en extraer submuestras de suelo en forma de zigzag. Para la investigación se utilizó para análisis 0.5kg de suelo, cabe mencionar que antes de los 30 cm de profundidad aquí es en donde se retira la capa de materia orgánica existente y se tomará el suelo de la rizosfera. Se procede a obtener una muestra de cada una de ellas, dicha muestra estará conformada por varias submuestras y para realizar las pruebas físicas y químicas se obtuvo 10g se las va a poner en un colador para que tenga una estructura uniforme. Para la Identificación

macroscópica se lo va a hacer en base a la forma, tamaño, color y superficie y se va a proceder con las pruebas bioquímicas (Mau, et al., 2011 p. 45).

2.15. Fase de Laboratorio

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

Se procede a tomar 10g de muestra para las pruebas físicas y químicas se las reservará y se coloca en un colador para tener una estructura uniforme y más homogénea (Guevara, 2010 pp. 1-86). En la siembra y el aislamiento de los microorganismos se utilizó 5 muestras de suelo se recogió en la fase de campo, y se utiliza 10g de suelo tamizado de cada una de las 5 muestras con agua destilada unos 90mL del agua destilada en 5 matraces Erlenmeyer diferentes con lo cual esta fue la solución madre, con diluciones como son de 1×10^{-1} 1×10^{-2} 1×10^{-3} 1×10^{-4} 1×10^{-5} , se procedió a sembrar por vertido en placa (Guevara, 2010 pp. 1-86). Todo el procedimiento se lo debe de hacer con pipetas esterilizadas o puntas de micro pipetas estériles al igual que los tubos de ensayo y el material que se utilizó (Guerra, et al., 2020 pp. 139-152), cuando se realiza método de recuento en medio sólido, el número factible de microorganismos que puede ser contado en una caja Petri debe estar en el rango de 30 a 300 colonias por caja. Identificada la concentración más idónea (Guevara, 2010 pp. 1-86).

2.15.2. Siembra de Bacterias Ácido Lácticas (Medio de Cultivo MRS)

Para la siembra de BAL se obtuvo de la concentración de 1×10^{-5} en el tubo de ensayo a partir de la muestra madre se realizó lo siguiente se utilizó el 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. Una vez preparado todos los materiales se autoclavan a (120°C por 15 min) con las cajas Petri con las pipetas o puntas de micro pipeta etc (Ramírez, et al., 2016 p. 82).

Se esterilizó la cámara de flujo laminar con alcohol al 96% y con la luz UV para luego proceder a la siembra. 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 y se procede a colocar 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 (Ramírez, et al., 2016 p. 82).

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

El procedimiento de preparación para el extracto de Levadura se obtuvo 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 (Heredia, 2017 pp. 1-55).

La mezcla del agar YPD con el agua destilada se procede a auto clavar a 120°C por 15 min con las cajas Petri con las pipetas o puntas de micro pipeta 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 (Heredia, 2017 pp. 1-55).

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 (Heredia, 2017 pp. 1-55).

Tabla 1-2: 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: (Sigma, 2022 p. 90).

Elaborado por: Allauca, Erika, 2023.

2.15.4. *Siembra de levaduras (Medio de Cultivo Sabourand)*

2.15.4.1. *Procedimiento*

Se utilizo el agar Sabouraud; para las levaduras se toma 6,5 gramos del mismo y se disuelve en 100mL de agua destilada ya que cada caja Petri lleva 10mL. De estas se usa 5 muestras por duplicado, esta agua tiene que estar previamente en un pH ácido entre 4.8 a 5.2 (Heredia, 2017 p. 112).

Finalmente, preparado todos los materiales a utilizar en la siembra y la mezcla del agar Sabouraud con el agua destilada se la procedió auto clavar a 120°C por 15 min con las cajas Petri con las

pipetas o puntas de micro pipeta. 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} y se procede a colocar las cajas Petri ya sembradas dentro de la incubadora a 30°C por 48 horas (Heredia, 2017 p. 112).

2.15.5. Siembra de bacterias Acéticas

2.15.5.1. Procedimiento

Para la siembra de bacterias acéticas se utilizó el agar Acetobacter glucosa y se toma 3,8 gramos del mismo y se disuelve en 100mL de agua destilada ya que cada caja Petri lleva 10mL (Heredia, 2017 p. 119). La mezcla del agar Acetobacter con el agua destilada se la procedió a auto clavar a 120°C por 15 min con las cajas Petri con las pipetas o puntas de micro pipeta (Heredia, 2017 p. 119). 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} que se obtuvo a partir de la muestra madre en las cajas Petri ya autoclavadas. Se colocó las cajas Petri ya sembradas dentro de la incubadora a 30°C por 72 horas (Heredia, 2017 p. 120).

2.15.6. Identificación macroscópica de microorganismos de uso agroindustrial

Una vez realizado la identificada macroscópica de los microorganismos (forma, color, superficie) y las pruebas bioquímicas se procede con los resultados adquiridos en el laboratorio de Ciencias Biológicas se analiza las cantidades de colonias con la ayuda de la cuenta colonias presentes en las cajas Petri luego de 48 horas de ser sembradas e incubadas a una temperatura de 31°C. Por lo cual se observar en el equipo cuenta colonias características morfológicas como color, forma y superficie (González, et al., 2021 pp. 7-13).

Se realizó la evaluación macroscópica de las colonias encontradas; luego se comparó las colonias que se observaron en el laboratorio con revisión bibliográfica para poder identificar bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias acéticas como las de la familia *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Acetobacter* (González, et al., 2021 pp. 7-13).

2.15.7. Identificación microscópica de Bacterias Ácido Láctica

Para la identificación microscópica de BAL se realizó la Tinción Gram utilizando el portaobjetos se le adicionó 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 y se la

fija la muestra del microorganismo en el portaobjetos con la ayuda de la flama del mechero se espera a que este a una temperatura ambiente luego de esto se le adiciona el aceite de inmersión y se observa en el microscopio con el lente de 100X (Porcel, 1947 p. 34).

2.15.8. *Identificación microscópica de levaduras*

Se realiza la esterilización el material que se va a utilizar el microscopio, así como el área de trabajo por lo cual el procedimiento de preparación es que el vidrio portaobjetos se le adiciona una gota de agua destilada y se toma la muestra con el asa de siembra previamente flameada al rojo vivo en el mechero y se realiza un frotis en el portaobjetos y se la fija la muestra del microorganismo en el vidrio portaobjetos con la ayuda de la flama del mechero y se espera a una temperatura ambiente, la muestra del microorganismo fijada se le realiza la tinción con azul de metileno, luego de esto se le adiciona el aceite de inmersión y se observa en el microscopio con el lente de 100X (Salazar, 2017 p. 36).

2.15.9. *Identificación microscópica de Bacteria Acéticas*

Para identificar BA microscópicamente se realizar lo siguiente en el 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 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 (Gerard, 2015 p. 264).

2.15.10. *Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas*

Para el aislamiento de bacterias ácido lácticas se lo realizó por vertido en placa para obtener las colonias por agotamiento por estrías en nuevas cajas Petri con agar MRS a condiciones de 37°C.

2.15.10.1. *Procedimiento*

Se realizó por vertido en placa se observa cuales poseen características morfológicas macroscópicas con color, forma, superficie se las compara con las características de bacterias ácido lácticas después se procede a aislar, 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. Se envolvió las muestras sembradas con Parafilm y se las colocó en un ambiente de anaerobiosis a 37°C por 48 horas

(Gerard, 2015, p.81), al transcurrir el tiempo de 48 horas se verificó el desarrollo de estas colonias y se observa en el equipo cuenta colonias al estriado y se diferencia de forma macroscópica por características morfológicas color, forma y superficie. 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 (Ramírez, et al., 2016 p. 74).

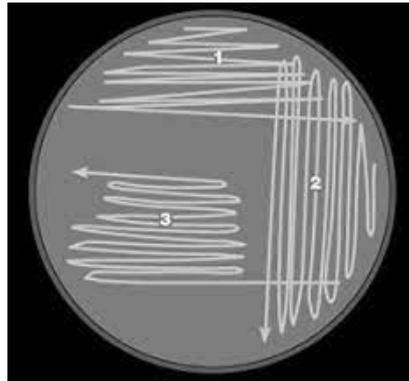


Ilustración 4-2: Aislamiento mediante siembra por estrías

Fuente: (Gerard, 2015, p.81).

2.15.11. Aislamiento de levaduras

2.15.11.1. Procedimiento

Se prepara el área de trabajo totalmente estéril y se auto clava y todo el material, nuevas cajas Petri con el Agar Sabouraud (Suárez, et al., 2016 p. 97). Para un mejor aislamiento se seleccionó a las colonias que resistieron a la concentración de alcohol de 5%. El alcohol actúa como un inhibidor de crecimiento 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 (Suárez, et al., 2016 p. 97).

Se realiza a utilizar el asa de siembra al rojo vivo flameada y se toma una colonia la cual en la nueva caja se procedió a hacer un estriado y se colocó las cajas Petri en incubación por 48 horas a una temperatura de 25°C a 30°C y en condiciones aerobias (Artigas, et al., 2017 p. 50). Pasadas 48 horas se verificó que hay el desarrollo de colonias secundarias y se diferencia de forma macroscópica por características como color, forma, superficie. Una vez que se tenga un solo tipo de microorganismo en la caja Petri se procede a elegir una muestra y se observa en el microscopio (Artigas, et al., 2017 p. 50).

2.15.12. Aislamiento de bacterias Acéticas

Se utilizó el agar Acetobacter glucosa se prepara 38 gramos del Agar y se disuelve en 1000 ml de agua purificada, se homogeniza y se esteriliza en la autoclave a 121°C por 15 minutos. Para un mejor aislamiento se seleccionó a las colonias que resistieron a la concentración de alcohol de 8% ya que actúa como un inhibidor de crecimiento y se los siembra en nuevas cajas Petri con agar Acetobacter glucosa y las cuales provienen de la de concentración 1×10^{-5} (Suárez, et al., 2016 p. 125).

Se realizó estriado a 90 grados sin levantar el asa de siembra evitando sobre pasar el primer estriado y se hace el segundo estriado. Colocar las cajas Petri en incubación por 48 horas a una temperatura de 25°C a 30 °C y en condiciones aerobias y al pasar el tiempo se observa el desarrollo de las colonias (Díaz, 2014 p. 46).

2.15.13. Identificación bioquímica de los microorganismos

2.15.13.1. Prueba de catalasa

Se realizó un frotis sobre un portaobjetos limpio, posteriormente se adicionó entre 1 y 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 %, se observó la presencia o ausencia de efervescencia para comprobar la existencia de catalasa. Las bacterias ácido lácticas son catalasa negativa (Guerrero, 2011 p. 52).

2.15.13.2. Prueba de oxidasa

Tomar una colonia con el asa de inoculación y depositarla sobre una tira de oxidasa. La cepa es catalasa positiva cuando hay un viraje del color blanco de la tira a morado, caso contrario se reporta como catalasa negativa (Guerrero, 2011 p. 52).

2.15.13.3. Prueba de tinción de Gram

La técnica de la tinción de Gram 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 (Jiménez, et al., 2012 pp. 157-173). 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 (Jiménez, et al., 2012 pp. 157-173). Una vez realizado la prueba de tinción de Gram podemos observar la reacción positiva o negativa durante este

procedimiento es un punto fundamental para identificar morfológicamente las bacterias en este estudio (Jiménez, et al., 2012 pp. 157-173).

2.15.13.4. Procedimiento

Realizar la extensión en un portaobjeto limpio se coloca una gota de agua destilada, con la ayuda el asa de siembra, previamente esterilizada a la llama, se lleva una pequeña cantidad de suspensión de una colonia después con el asa se extiende la gota y la colonia sobre el portaobjetos y se fija la extensión por el calor, calentando suavemente a la llama del mechero hasta que se seque.

Procedemos a colocar 1 minuto en cristal violeta después se lava con agua destilada y previamente colocamos 1 minuto en Lugol se lava con agua destilada en forma de corriente. Después decolorar con alcohol-acetona (1:1) y lavar con agua corriente. Finalmente cubrir con safranina durante 30 segundos, lavar con agua corriente (Jiménez, et al., 2012 pp. 157-173). Una vez que la preparación está totalmente seca, poner una gota muy pequeña de aceite y observamos al microscopio con el objetivo de inmersión (Jiménez, et al., 2012 pp. 157-173).

2.15.13.5. 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 (Reynoso, et al., 2015 p. 28).

Material y reactivos

Hidróxido de potasio (KOH) de Panreac (181521.1211) y Portaobjetos de vidrio

Procedimiento experimental

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, et al., 2015 p. 28).

2.15.13.6. Prueba de movilidad

Se presenció la movilidad las cepas en el medio semisólido Sim.

2.15.13.7. Procedimiento.

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, (Chimbo, et al., 2016 p. 30).

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 (Vargas, 2018 pp. 30-34).

2.15.13.8. Prueba de fermentación de azúcares

Se formuló caldo rojo fenol que sirve de base para evidenciar la fermentación del carbohidrato glucosa, ya que posee el indicador, rojo fenol, (Vargas, 2018 pp. 30-34)

Formulación de caldo rojo fenol

El caldo base fue formulado para lograr la fermentación de un carbohidrato individual, en este caso de la glucosa. Los ingredientes se detallan en la Tabla 2-2, el caldo rojo fenol posee un color naranja- rojizo y un pH final de 7.4, que se ajustó con NaOH 2N, (Vargas, 2018 pp. 30-34).

Tabla 2-2: Ingredientes de caldo rojo fenol

Ingrediente	Cantidad
Peptona	12 g
Extracto de carne	1 g
NaCl	5 g
Rojo Fenol	0.018 g
Glucosa	10 g
Agua destilada	1000 MI

Fuente (Vargas, 2018 p. 31).

Realizado por: Allauca, Erika, 2023

2.15.13.9. Procedimiento:

Se coloca 10 ml del caldo rojo fenol en un tubo de ensayo estéril que contiene en su interior un tubo Durham con la abertura hacia abajo. Se auto clava en los tubos de ensayo a 121°C por 15 minutos, sin exceder este tiempo ya que el carbohidrato puede sufrir la reacción de Maillard. Con el asa de inoculación tomar una cepa aislada e inocularla en el caldo, después se incubar a 37° los

aislados de MRS, por 48h. Si hay fermentación del carbohidrato el medio se tornará amarillo y si hay producción de gas durante la incubación de los cultivos, éste se manifiesta por la presencia de burbujas en el interior de los tubos, Durham reportando así la prueba como positiva (Vargas, 2018 p. 35).

2.15.13.10. *Prueba de fermentación de azúcares en bacterias acéticas y levaduras.*

El agar TSI es un medio de cultivo diferencial de fermentación de azúcar en levaduras y acéticas. Para la determinación fermentaciones de tres hidratos de carbono (glucosa, lactosa y sacarosa), la producción de CO₂ al fermentar los hidratos de carbono y la determinación de la producción de H₂S (Britania, 2021 pp. 2-3).

2.15.13.11. *Procedimiento:*

Utilizar y emplear técnicas asépticas para inocular, tocar con cuidado sólo el centro de una colonia aislada en un medio en placa entérico con una aguja estéril fría, insertarla en el medio en la base del tubo y luego extender la muestra en ambas direcciones por la superficie del agar inclinado (Dickinson and Company, 2015 p. 38). Se deben estudiar por separado varias colonias de cada placa primaria dado que es posible que se produzcan infecciones mixtas e incubar con las tapas flojas a 35 °C y examinar después de 18-24 h para detectar fermentación de carbohidrato, producción de gas y producción de ácido sulfhídrico (Dickinson and Company, 2015 p. 38). Es posible observar una combinación de cualquiera de estas reacciones. No incubar durante un período más prolongado que 24 h porque la reacción ácida en el agar inclinado de los organismos fermentadores de lactosa y sucrosa pueden convertirse a una reacción alcalina (Dickinson and Company, 2015 p. 38).

Reacción del agar TSI

- La fermentación de carbohidratos se indica mediante una coloración amarilla del medio.
- Si el medio en la base del tubo se torna amarillo (ácido), pero el medio en el agar inclinado adquiere un color rojo (alcalino), el organismo de prueba fermenta solamente dextrosa (glucosa).
- Un color amarillo (ácido) en el agar inclinado y la base del tubo indica que el organismo de prueba fermenta dextrosa, lactosa y/o sucrosa
- Un color rojo (alcalino) en el agar inclinado y la base del tubo indica que el organismo de prueba no es fermentador.
- La producción de ácido sulfhídrico causa un precipitado negro en la base del tubo (Dickinson and Company, 2015, p.54).

2.15.13.12. Prueba bioquímica caldo YPD.

Los métodos generales para la levadura especifican que un buen medio de crecimiento para cultivar *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras es el YPD broth. Las levaduras crecen bien en un medio mínimo que contiene solo dextrosa y sales, pero la adición de proteínas y extracto de células de levaduras hidrolizados permite un crecimiento más rápido de manera que durante el crecimiento exponencial o fase logarítmica (CONDALAB, 2021 pp. 1-2).

Tabla 3-2: Fórmula del caldo YPD en g/L

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

Fuente : (CONDALAB, 2021 pp. 1-2).

Realizado por: Allauca, Erika, 2023

2.15.13.13. Procedimiento

En el laboratorio de ciencias biológicas se utiliza más la dextrosa para hacer el caldo y se lo coloca en tubos de ensayo. Una vez preparado se lo esteriliza en la autoclave posteriormente se agrega 1mL de la muestra enriquecida y se deposita dentro de los tubos con el caldo YPD estéril de color naranja. Después 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 YPD no cambio de color y se mantiene naranjado quiere decir que da negativo a fermentación (CONDALAB, 2021 pp. 1-2).

2.15.14. 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 tóxico 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 (INEN, 2014 p. 1). 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 (INEN, 2014 p. 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 (Vargas, 2018 p. 30).

2.15.15. Identificación de especies microbiológicas con el software ABIS

Se utilizó el programa Abis online bacterial identification, es una herramienta de laboratorio para la identificación bacteriana basada en caracteres morfológicos y bioquímicos.

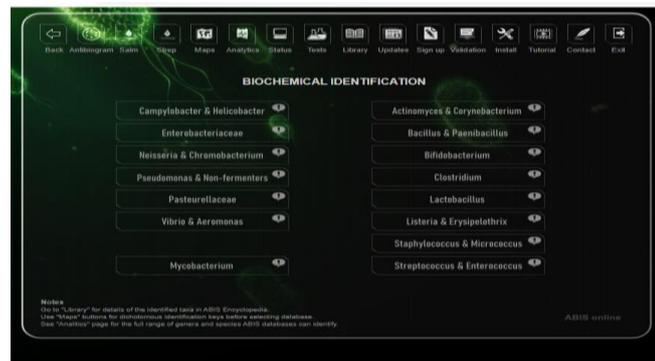


Ilustración 5-2: Página de identificación Bioquímica

Fuente:(Abis Online Biochemical Identification, 2021).

El uso de este software requiere conocimientos y habilidades avanzados en el campo de la microbiología.

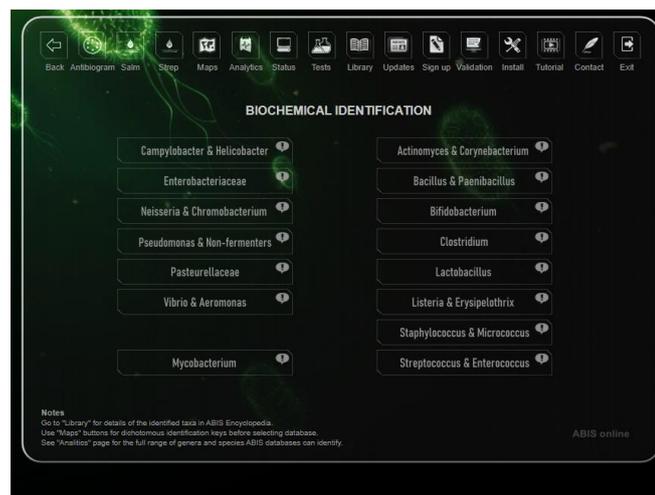


Ilustración 6-2: Elección de microorganismo a investigar

Fuente:(Abis Online Biochemical Identification, 2021).

2.15.16. Medición de la cantidad de la materia seca *del suelo*.

2.15.16.1. Procedimiento

Para el respectivo análisis del suelo se utiliza 10 g de muestra. Los 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. Después se toma la muestra de 10 gramos de suelo fresco y se los deposita en los crisoles y se procede a hacer un pesaje, 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 (INEN, 2014 p. 2).

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 mufla con la muestra ya calcinada al final luego de haber pasado las 5 horas en calcinación

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

Fuente: (INEN, 2014 p. 2)

Realizado por: Allauca, Erika, 2023

Donde:

SS = sustancia seca en porcentaje en masa.

m = masa de la cápsula en g

M1 = masa de la cápsula con la muestra en g

M2 = masa de la cápsula con la muestra después del calentamiento en g (NTE INEN-ISO 11461, 2014, p.2)

%HUMEDAD = 100 - %SS

2.15.17. Medición de la cantidad de cenizas en las muestras de suelos

2.15.17.1. Procedimiento

Utilizamos tres crisoles de porcelana de 50 ml, se los etiqueta se pesó en la balanza analítica, después se anota el peso con 2 cifras significativas en Peso crisol, Después procede a aforar el crisol con la muestra húmeda y se anota el valor con 2 cifras significativas en Peso crisol muestra. Se introduce los crisoles en la mufla automática, se programa la mufla a 500 °C durante un periodo de 4 horas al pasado este periodo de tiempo, se espera mínimo 45 minutos antes de extraer los

crisoles de la mufla. Este procedimiento se lo realiza con las pinzas para el crisol, y por último pesar y anotar el peso (Dueñas, 2012 p. 83).

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

Fuente: (Dueñas, 2012 p. 83).

Realizado por: Allauca, Erika, 2023

Donde:

%C = Contenido de cenizas en porcentaje de masa.

w = Masa de la cápsula vacía en gr

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

CS = Masa de la cápsula con muestra antes de la incineración en gr (Dueñas, 2012, p.83)

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

2.15.18.1. Procedimiento

Para determinar la materia orgánica se pesa 10 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 dos 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. Se toma el crisol con la muestra de suelo calcinado en su interior y se la lleva a la mufla a 400°C por 2 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 (Andrades, et al., 2015 p. 57).

$$\%MO = \frac{(M1 - M2)}{(M1 - Mo)} * 100$$

Fuente: (Andrades, et al., 2015 p. 57).

Realizado por: Allauca, Erika, 2023

Donde:

Mo = Peso en g del crisol

M1 = Peso en g del crisol y la muestra seca

M2 = Peso en g del crisol y la muestra tras su incineración (Andrades, et al., 2015 p. 57).

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

Para realizar la medición de nitrógeno se utilizó el método Kjeldahl en la presente 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 le va a 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 (Andrades, et al., 2015 p. 73).

Pasado el tiempo 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 (Andrades, et al., 2015 p. 73).

En otro matraz, tipo Erlenmeyer se va a colocar 100mL de (ácido bórico) al 25% y en este será en donde se recoja el líquido destilado. Se toma el matraz de balón con las muestras digeridas y se lo lleva hacia el destilador (en la parte de arriba se localiza) mientras que el matraz tipo Erlenmeyer (en la parte. 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 (Andrades, et al., 2015 p. 73).

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

Se utilizó una muestra de suelo fresco de 10g el cual debe estar de manera homogénea se va a mezclar con 15mL de agua destilada en un matraz pequeño y se lo va a agitar en un vórtex, después

se debe preparar los papeles filtro, embudos y matraces. Luego la mezcla del suelo con el agua se vacía 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 horas una vez que se ha 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 a adicionar el reactivo de lectura del mineral y se utiliza el reactivo de magnesio. 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 (HANNA INSTRUMENTS, 2021 p. 53).

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

Se selecciona el método de nitrato para realizar el procedimiento se agrega 10g de muestra lo cual debe estar de manera homogéneas se va a mezclar con 15mL de agua destilada en un matraz pequeño y se lo va a agitar en un vórtex. 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. 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 nitrato que viene en forma de polvo en un sobre. (HANNA INSTRUMENTS, 2021., p 59).

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

Para realizar el análisis del suelo de Baños se utiliza 10g de muestra y se va a mezclar con 15mL de agua destilada en un matraz pequeño y se lo va a agitar en un vórtex, 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, se va proceder a llevarlos hacia el equipo espectrofotométrico es de aproximadamente 10mL de muestra y a este se le va adicionar el reactivo de lectura del mineral en el reactivo de potasio que viene en forma de polvo en un sobre, finalmente se observa en la pantalla el resultado forma de mg/L (HANNA INSTRUMENTS, 2021., p 49).

2.15.23. Conservación de microorganismos de uso agroindustrial

2.15.23.1. Procedimiento

Las muestras de bacterias ácido lácticas, bacterias acéticas oleaduras 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 auto clavando. 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%.

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 (Vargas, 2018 p. 32).

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Análisis de resultados

3.1.1. Caracterización del suelo de bosque primario del Cantón Baños

En laboratorio de bromatología fueron tamizadas y homogeneizadas las muestras de suelo para la caracterización física química en la cual se tomaron 5 muestras para empezar las caracterizaciones, dándonos los siguientes resultados.

Tabla 1-3: Composición físico-químico del suelo de bosque primario.

	Media
pH	6,12
Humedad, %	60,43
Cenizas, %	22,91
Materia orgánica, %	70,80
Nitrógeno%	0,34
Nitrato mg/L	6,1
Potasio mg/L	10,84
Magnesio mg/L	8,53

Realizado por: Allauca, Erika, 2023

3.1.2. pH del suelo de bosque primario

Con los datos obtenidos se puede verificar que el pH del suelo del bosque primario del Cantón Baños posee un valor de 6.12, como lo revela la tabla 7-3, con lo que se considera una concentración moderadamente acida según por lo manifestado por (FAO y MAG, 2013 p. 23), que menciona que el pH 5,1 a 6,5 son ácidos, por tal razón fue muy factible encontrar bacterias, y en mayor medida a microorganismos fúngicos, esto se pudo constatar ya que se encontró bacterias ácido lácticas de aproximadamente 7 especies y en cambio para especies fúngicas como levaduras se obtuvo una especie, lo cual el pH obtenido en el presente estudio son similares a los reportados por (Amaguaya, 2015 p. 76), en su investigación en un bosque primario de Alausí que obtuvo un valor de pH de 6, concordando con los resultados obtenidos.

3.1.3. *Materia orgánica del suelo de bosque primario*

De acuerdo a lo que indica la tabla 7-3, el contenido de materia orgánica en el bosque primario en estudio obtuvo una media de 70.80% , considerada una concentración alta según lo manifestado por (FAO y MAG, 2013; p 23) que mencionan que cuando la cantidad de materia orgánica sobrepasa del 3% es considerado alto, cabe mencionar que la materia orgánica juega un papel clave en la fertilidad de los suelos como fuente de nutrientes para las plantas y fuente de energía para los microorganismos, y a través de funciones de tipo biológico, sin embargo la cantidad de materia orgánica obtenido en el presente estudio son similares a los obtenidos por (Duchi, 2019, p. 65), lo cual manifiesta que obtuvo un valor 48,62%, también considerada una concentración alta.

3.1.4. *Humedad del suelo de bosque primario*

La tabla 7-3 indica, que la humedad que se obtuvo en la presente investigación fue de una media 60,43 %, valores elevados debido a que es un bosque primario húmedo, en la cual el valor obtenido es elevado ya que la zona en la que se realizó la investigación son zonas tropicales húmedas, por lo que (Pérez, 2019, p.23) afirma que en este tipo de lugares tropicales existe una humedad alta en las que no existe una verdadera estación seca, por lo tanto según (Ramírez, et al., 2008 p. 36), este suelo es de gran importancia ya que hay presencia de agua para la biodegradabilidad y fundamentalmente para el crecimiento de microorganismos, lo cual el porcentaje de humedad obtenido en la presente investigación concuerdan con los resultados conseguidos por (Amaguaya, 2015 p. 76), en su estudio en un bosque primario de Alausí obteniendo un valor de 58.72%, siendo elevado la humedad.

3.1.5. *Ceniza del suelo de bosque primario*

La presente investigación se puede verificar que el porcentaje de ceniza es elevado con un 22,91%, como lo indica la tabla 7-3, debido a que es un bosque primario, tomando en cuenta que no es intervenido por la presencia humana. Resultados inferiores a los reportados por (Duchi, 2022 p. 69), en su investigación en un bosque primario de la Parroquia Pungala lo cual obtuvo un valor de 90.37%, esto posiblemente se deba a la cantidad de materia orgánica en concentraciones elevadas, por lo que según Díaz (2017) , menciona que la cantidad de cenizas representa el contenido total de minerales y la determinación del contenido de cenizas es importante por varias razones por una parte el análisis próximo para la evaluación nutricional dado que la suspensión de las cenizas en agua es baja de acuerdo a la escala utilizada para la calificación de suelos en relación

al contenido de sales, por tal motivo al incorporarse las mismas al suelo no produzcan salinización.

3.1.6. *Nitrógeno asimilable del suelo del bosque primario*

El nitrógeno obtenido que se obtuvo en la presente investigación fue de un promedio de 0,34%, como lo revela la tabla 7-3, que se considera una concentración alta según por lo manifestado por la (FAO y MAG, 2013 p. 23), que afirma que valores que van desde 0.25% a 0.40% o más, son rangos elevados, lo que se lo considera como suelo muy rico por lo descrito por (FAO, 2013 p. 33), ya que indica que el nitrógeno total si es mayor a 0.30%, es considerado muy rico en (N.), por lo tanto se puede afirmar que el suelo de bosque primario de Baños es muy rica en nitrógeno ya que ha elevada la cantidad nitrógeno mayor contenido de materia orgánica, lo cual los resultados obtenidos sobre la cantidad de nitrógeno son superiores a los reportados por (Duchi, 2022, p.60), en su investigación en un bosque primario en Cumandá que obtuvo un valor de 0.23%, esto posiblemente se deba a que la cantidad de materia orgánica en concentraciones elevadas.

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

De lo observado en la tabla 7-3 se puede verificar que se obtuvo una media de 10.84 mg/L de potasio ,lo cual el valor obtenido de este suelo se considera un suelo pobre en potasio ya que (Bernier, et al., 2007 p. 67), menciona que los valores por debajo de 150 mg/L son considerados suelos pobres es decir suelos bajos en potasio, lo cual los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad de potasio son similares a los descritos por (Orellana, 2022 p. 45), que menciona que obtuvo un valor de 9.3 mg/L, concordando con los resultados obtenidos.

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

Los resultados obtenidos sobre la cantidad Mg son valores que se encuentran debajo del límite de detección con una media 8.53mg/L ,por lo que según (Intagri, 2001 p. 16), la mayoría del magnesio presente en el suelo proviene de la descomposición de minerales, los suelos ubicados en climas templados presentan rangos de concentración de 5 a 50 mg/L, lo cual los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por (Delgado, 2022, p.24) que obtuvo un valor de magnesio de 9.5 mg/L.

3.1.9. Cantidad de nitrato, de las muestras de suelo de bosque primario

Los valores de nitrato resultantes en el análisis de laboratorio muestran un valor promedio de 6.1mg/L, ya que el suelo estudiado se considera un suelo pobre de este minerales ya que como lo da a conocer (Guzmán, 2020 p. 48); menciona que hallan valores de nitrato total más bajo de 4.8 g mg/kg a 6.6 mg/kg por lo cual concuerdan con los resultados obtenidos en la investigación , sin embargo comparando nuestros resultados, menciona que obtuvo una concentración de nitrato de 4.68 mg/kg, siendo un resultado similar al presente estudio.

3.2. Conteo de los microorganismos

Tabla 2-3: Conteo de microorganismos estadísticamente.

	Media	Desviación		
		estándar	Máximo	Mínima
Bacterias Ácido lácticas	5.2x10 ⁵ UFC/g	±0.28	5.6x10 ⁵ UFC/g	4.8.6x10 ⁵ UFC/g
Bacterias Acéticas	4.2x10 ⁵ UFC/g	±4.3	9x10 ⁵ UFC/g	1x10 ⁵ UFC/g
Levaduras	3.7x10 ⁵ UPC/g	±3.7	4x10 ⁵ UPC/g	3.4x10 ⁵ UPC/g

Realizado por: Allauca, Erika, 2023.

De acuerdo con que revela la tabla 8-3 hubo presencia de bacteria de ácido lácticas con una población de 5.2x10⁵ UFC/g ±0.28 registrándose variaciones 5.6x10⁵ UFC/g a 5.6x10⁵ UFC/g, mientras la bacteria acética obtuvo un valor 4.2x10⁵ UFC/g ± 4.3 y finalmente en las levaduras fue de 3.7x10⁵ UPC/g ±3.7 variando de 4x10⁵ UPC/g a 3.4x10⁵ UPC/g. siendo valores similares a los registrado por (Duchi, 2022 p. 60).

3.1. Bacterias Ácido lácticas

3.1.1. Aislamiento de las Bacterias Ácido Lácticas.

La tabla 9-3 demuestra los resultados sobre la identificación morfológicas de las bacterias ácido lácticas, donde se evaluó la calidad de la muestra siendo útil al momento de la observación para

determinar la presencia de bacterias, por tal motivo las bacterias pueden presentar ciertas variaciones morfológicas, obteniendo bacterias ácido lácticas de forma irregular y circular, de color crema y blanca, y de superficie cóncava y lisa, lo cual la investigación coincide con (Carolina & Jorge, 2016 ,p. 115-128) que menciona que para identificar a una bacteria ácido láctica macroscópicamente debe tener una forma circular e irregular, superficie lisa, convexa, y cóncava y color blanco-crema con pigmentos.

Tabla 3-3: Morfología de las especies aisladas de las BAL

# Especie	Forma	Color	Superficie
1	Irregular	Crema	Cóncavo
2	Irregular	Blanca	Lisa
3	Circular	Blanco	Lisa
4	Circular	Blanco	Cóncavo
5	Irregular	Crema	Cóncavo
6	Irregular	Crema	Cóncavo
7	Irregular	Crema	Lisa

Realizado por: Allauca, Erika, 2023

3.1.2. *Caracterización in vitro de los microorganismos aislados*

La capa de peptidoglicano en las bacterias es importante, debido a que es responsable de la rigidez de la pared celular bacteriana y determina la forma de la célula, lo cual todas las siete especies aisladas dieron positivo para tinción dando un color violeta, por lo que según (Jaramillo, 2020 p. 29), manifiesta que las bacterias ácido lácticas son Gram-positivas, formadoras de no esporas y anaerobias facultativas.

3.2. Caracterización de los microorganismos para uso agroindustrial

3.2.1. *Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas de Bacterias ácido lácticas.*

En la investigación se obtuvieron 7 especies 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 a las especies encontradas, como lo pueden observar en la tabla 10-3.

Tabla 4-3: Identificación bioquímica de las especies aisladas de BAL.

BAL	Tinción	Forma	Catalasa	Oxidasa	K(OH)
1	+	Bacilo	-	-	-
2	+	Bacilo	-	-	-
3	+	Bacilo	-	-	-
4	+	Bacilo	-	-	-
5	+	Bacilo	-	-	-
6	+	Bacilo	-	-	-
7	+	Bacilo	-	-	-

Realizado por: Allauca, Erika, 2023

3.2.1.1. Prueba bioquímica de Tinción Gram

Cuando se hizo la Tinción Gram se pudo ver que todas las 7 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 (Jiménez, et al., 2012 pp. 157-173). las bacterias ácido lácticas al hacerles la tinción dieron resultado positivo, es decir con coloración igual a la 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.

3.2.1.2. Pruebas bioquímicas de Catalasa

En la prueba de la catalasa las 7 especies encontradas dieron negativos a esta reacción, prueba que se lo realiza con agua oxigenada y todo microorganismo que posea una enzima llamada citocromo al entrar en contacto con el H_2O_2 es aerobio, lo cual cuando el resultado es negativos se debe a que existe la falta de esta enzima en los microorganismos, por lo tanto son de tipo anaerobios, resultados similares a los reportados por (Delgado, 2020 p. 61), donde manifiesta que para saber si un microorganismo es bacteria ácido láctica debe dar negativo a la prueba de catalasa.

3.2.1.3. Pruebas bioquímicas de Oxidasa

De las especies encontradas en la presente investigación se realizó la prueba de la oxidasa, dandocomo resultado que todas las especies aisladas dieron negativos a esta prueba, lo cual para saber si son positivas para catalasa debe originarse una coloración azulada o violeta azulada, lo más factible es hacer esta prueba con muestras frescas, por lo tanto los resultados obtenidos

concuerdan con el trabajo investigativo de (Valencia, 2020 p. 72), que 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.

3.2.1.4. Prueba bioquímica de KOH

En cuanto a la prueba bioquímica sobre el hidróxido de potasio todas las 7 especies dieron negativo a esta reacción, lo cual cuando se utiliza el KOH y este interacciona con las células la solución básica entra a la célula y si el microorganismo es Gram positivo no va a desprender un halo mucoso a la célula, pero por el contrario si existe un rastro mucoso significa que el microorganismo será Gram negativo (Latorre, 2011, p. 28).

3.2.2. Prueba de movilidad

Las pruebas de movilidad se las hizo con la ayuda del medio SIM en la cual se pudo ver que la reacción fue negativa a todas las especies aisladas, lo que significa que presentan ausencia de flagelos, que va más allá de la línea de siembra, coincidiendo con los resultados expuestos por (Puente, 2016 p. 29), que menciona que la familia de las bacterias ácido lácticas no presentan flagelos y son negativo para el medio sólido SIM.

3.2.3. Prueba de fermentación de azúcares

Tabla 5-3: Resultados de la prueba de fermentación de azúcares BAL.

#BAL	Especies	Glucosa	Lactosa	Manitol	Fructosa	Galactosa	SIM
1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+	+	+	-	+	-
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+	+	-
3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	+	-	+	+	+	-
4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	-	-	+	+	-
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	+	-	-	+	-
6	<i>Lactobacillus curvatus</i>	+	+	-	-	-	-
7	<i>Lactobacillus brevis</i>	-	+	-	-	-	-

Realizado por: Allauca, Erika, 2023.

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, con lo que se trabajó con 5 sustratos: lactosa,

fructuosa, manitol, glucosa y galactosa las cuales fueron inoculadas junto con las 7 especies aisladas de los microorganismos del bosque primario de Baños, 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 degradar azúcares, pero lo importante es saber si es que logran metabolizar la lactosa, ya que esta sería la principal fuente para producir ácido láctico en el caso de la familia de los *Lactobacillus*. Según (Eguchi, et al., 2021 pp. 1-5) y (Castillo, 2022 p. 31) manifiestan que la especie 1 posiblemente pueda pertenecer a la familia *Lactobacillus delbrueckii* ya que resulto positivo a todos los sustratos a excepción de la fructosa.

Al realizar la prueba de fermentación de azúcares la especie 2, posiblemente pueda pertenecer al género *Lactobacillus plantarum* ya que dio positivo a todos los sustratos, como la glucosa, fructosa, lactosa, manitol y Galactosa coincidiendo con los resultados expuestos por (Carasi, et al., 2022).

Al realizar la prueba de fermentación de azúcares las especies tres y cuatro dieron positivo a los sustratos de glucosa, fructosa, galactosa pero negativo a lactosa, lo cual se observa que no todas las especies metabolizaron todos los azúcares, siendo resultados similares a los reportados por; (Soundharrajan, et al., 2021 pp. 1-2) y (Castillo, 2022 p. 31) donde explican que todas las especies de bacterias ácido lácticas (BAL) si utilizan como fuente principal la glucosa estas son homofermentativas, por tal motivo tanto la especie tres y cuatro posiblemente puedan pertenecer a *Lactobacillus reuteri* o *Lactobacillus fermentum*.

De acuerdo con los resultados de la fermentación de azúcares las especies 5 y 6, resultaron negativos a las reacciones de manitol y fructosa, lo cual probablemente pueda pertenecer a *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus acidiphilus*. ya que los resultados conseguidos son similares a los obtenidos por (Parras, 2010 p. 112) y (Coman et al., 2019.,p. 125) por lo tanto pueden pertenecer a la familia ya antes mencionado, lo que determina caracteres bioquímicos de hetero fermentativos por el ácido láctico.

De igual manera la especie 7, resulto negativo a los carbohidratos de glucosa, fructosa, manitol y galactosa, pero positivo a lactosa, siendo un resultado idéntico con el reportado por (Ale, et al., 2020 p. 32), por tal motivo posiblemente pueda pertenecer al género *Lactobacillus brevis*, en estos casos la fermentación generaría lactato como producto de la fermentación llevada a cabo.

3.3. Bacterias Acéticas

3.3.1. Aislamiento de Bacterias Acéticas

Los resultados de las características morfológicas de las bacterias acéticas donde se observó dos especies de microorganismos por el cual se observó que obtuvo una forma irregular, de color crema y de superficie lisa. Según (Gúzman, 2021, p.37) manifiesta que, al observar en el microscopio, las bacterias acéticas (BA) son Gram negativas y con forma irregular, lisas debido a que las acetobacterias o bacterias del ácido acético comprenden un grupo de bacilos Gram negativos, móviles y aeróbicos.

Tabla 6-3: Morfología de las especies aisladas de BA

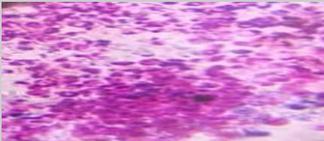
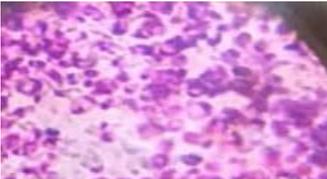
# BA	Forma	Color	Superficie
1	Irregular	Crema	Lisa
2	Irregular	Crema	Lisa

Realizado por: Allauca, Erika, 2023.

3.3.2. Selección de los grupos morfológicos a través de tinción Gram BA

A partir de la selección de los grupos morfológicos a través de la Tinción de Gram, se determinó la presencia de peptidoglicanos en las paredes de las células de las dos muestras identificadas, lo cual son bacterias aerobias, Gram negativas, de formas elipsoidales o cilíndricas que pueden encontrarse aisladas, en parejas o formas de cadenas, también (Dávalos, 2022 p. 88), identifico en su estudio sobre bacterias acéticas que son aerobias estrictas en forma de bastón, no patógena, Gram negativo.

Tabla 7-3: Caracterización microscópica de BA

Especies	Resultados	Imagen
1	Gram negativa	
2	Gram negativa	

Realizado por: Allauca, Erika, 2023.

3.3.3. Pruebas Bioquímicas de las muestras aisladas (*Bacterias Acéticas*)

En las pruebas bioquímicas se determinó las características metabólicas de las bacterias acéticas. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima (Catalasa y Oxidasa) preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas como lo revela la tabla 14-3.

Tabla 8-3: Identificación bioquímica de especies aisladas de BA

Especies	Tinción	Catalasa	Oxidasa
1	-	+	-
2	-	+	-

Realizado por: Allauca, Erika, 2023.

Pruebas bioquímicas de catalasa

En este tipo de prueba se quería evidenciar la presencia de la enzima catalasa en las bacterias acéticas, lo cual las dos especies aisladas resulto positivo para esta reacción, concordando con los resultados obtenidos por (Salazar, 2017 p. 93); que menciona que la característica de las bacterias acéticas es la de dar positivo a esta prueba.

Prueba bioquímica de Oxidasa

La prueba de oxidasa realizada a las dos especies bacterianas aisladas dio negativo, esto es por la no presencia de la enzima citocromo oxidasa, como lo demuestra (Mirás, 2019 p. 62); donde menciona que las bacterias acéticas dan negativas a las pruebas de oxidasa.

Pruebas bioquímicas de Tinción Gram

Con la prueba de la Tinción de Gram las dos especies identificadas de bacterias acéticas resultaron negativo, concordando por lo manifestado por (Dávalos, 2022, p.35) que menciona que una bacteria acética es negativa para tinción.

3.3.4. Prueba de fermentación de azúcares de las BA

Los resultados de fermentación de azúcares de las BA de las dos especies, sé realizó las siguientes pruebas la glucosa, la fructosa, la lactosa y el ácido sulfhídrico, como lo indica la tabla 15-3.

Tabla 9-3: Resultado de Fermentación de azúcares de BA

Especies	Lactosa	Glucosa	Fructosa	Galactosa	H ₂ S
1	-	+	+	-	-
2	-	+	+	+	-

Realizado por: Allauca, Erika, 2023.

En la prueba de fermentación de azúcares tanto las especies uno y dos de las bacterias acéticas dieron positivo a los sustratos de glucosa y fructosa, pero negativo a lactosa, siendo resultados similares a los obtenidos por (Caycedo, et al., 2020 p. 84), por tal motivo tanto la especie uno y dos de las bacterias acéticas es presumible a que pertenezcan a *Acetobacter pasteurianus*, *A. tropicalis* o *A. aceti*

3.3.4.1. Producción de ácido sulfhídrico

La presencia del ácido sulfhídrico indica que el sustrato no es consumible para el ser humano debido a la toxicidad que posee el compuesto como lo menciona (Angulo, 2021, p.47). Lo cual en la investigación estudiada dio resultados negativos a H₂S a las dos especies encontradas, por lo que se puede afirmar que las especies encontradas no son peligro para el ser humano.

3.4. Levadura

3.4.1. Aislamiento de Levaduras

Tabla 10-3: Morfología de la especie aislada de la levadura

# Levadura	Forma	Color	Superficie
1	Irregular	Crema	Lisa

Realizado por: Allauca, Erika, 2023.

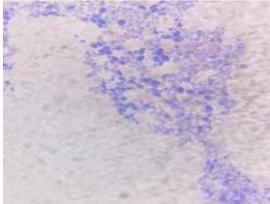
De lo observado se logró identificar una sola especie de levadura se observó morfológicamente su forma irregular, de color crema y de superficie lisa, resultado idéntico a los reportados por (Ibarra, 2019 p. 67), en su investigación sobre levaduras presentes en el suelo, lo cual menciona que las levaduras son hongos unicelulares, también denominados hongos imperfectos porque no desarrollan micelio con una morfología esférica, lisa, irregular o elíptica y su tamaño vario constantemente.

3.4.2. Selección de los grupos morfológicos a través de Tinción Gram

Se realizó la Tinción de Gram de la cepa, lo cual se realizó con azul de metileno ya que esta

permite diferenciar la forma que posee una levadura como lo indica (Arias, et al., 2019 pp. 55-64), por lo que en la investigación realizada se observa la presencia de una levadura y esto indican que existe la presencia de este tipo de organismo, el cual también son importantes dentro de los procesos de los microorganismos eficientes, debido a que estos microorganismos son muy abundantes en la naturaleza y se encuentran tanto en los suelos.

Tabla 11-3: Caracterización microscópica de la Levadura

Especie	Resultado	Imagen
1	Levadura	

Realizado por: Allauca, Erika, 2023.

3.4.3. Pruebas Bioquímicas de las muestras aisladas

De la especie aislada se realizó las pruebas bioquímicas en caldo YPD, lo cual se verifico que pasado las 24 horas hubo presencia de fermentación con la aparición de CO₂, con un pH de 5,5; esto debido a que el tono del caldo cambio de color de rojo ha amarillento ya que (CONDALAB, 2021 p. 2), manifiesta que cuando existe este tipo de reacción hay presencia de fermentación; luego pasada las 48 horas de igual manera existió presencia de fermentación, pero con un pH de 5, sin embargo (Escribano, 2021 p. 81), menciona que este tipo de líquido es específicamente para la especie de *Sacharomyces* entonces existe la presencia de este tipo de género en la investigación realizada.

Tabla 12-3: Pruebas bioquímicas en la Levadura Caldo YPD

Microorganismos	24 h	48h
Especie	Fermentación pH.	Fermentación pH.
1	Presencia 5,5	Presencia 5

Realizado por: Allauca, Erika, 2023.

3.4.4. Prueba de fermentación de azúcares de levaduras

La tabla 19-3 revela que la especie identificada de levaduras dio positivo a los sustratos de Glucosa, Fructosa y Galactosa, pero negativo a lactosa, resultados similares a las descritos por (Marrero, et al., 2004 p. 28) y (Lemus, 2020 p. 41), en su investigación sobre levaduras presentes en el suelo, lo cual con las reacciones dadas, posiblemente la levadura encontrada pueda pertenecer a

Sacharomyces cerevisiae.

Tabla 13-3: Pruebas de fermentación de azúcares de la levadura

Especie	Glucosa	Fructosa	Lactosa	Galactosa	H ₂ S
I	+	+	-	+	-

Realizado por: Allauca, Erika, 2023.

Se puede observar en la presente investigación que la especie de levadura no logró degradar la lactosa y esto se debe a que el proceso de glucólisis de las levaduras lo realiza de mejor manera con moléculas complejas como la glucosa.

3.4.5. Prueba de producción ácido sulfhídrico

En este tipo de prueba se logró verificar que la levadura identificada no presentó liberación de ácido sulfhídrico lo que es un detalle muy relevante ya que al no haber liberación H₂S no causa peligro para el ser humano como lo señala (Angulo, 2021 p. 83), en su investigación sobre levaduras fermentadoras.

CONCLUSIONES

Se analizó los parámetros físico químicos del suelo de bosque primario de Baños registrándose un pH 6.12, humedad 60.43%, ceniza 22.91%, materia orgánica 70.80 %, nitrógeno 0.34%, nitrato 6.12mg/L, potasio 10.84 mg/L y magnesio 8.53 mg/L por lo que significa que posee un suelo moderadamente ácido por lo cual los resultados obtenidos en el análisis físico químico son favorables para el crecimiento de microorganismos de acuerdo con lo que establece la FAO y MAG.

Al realizar la cuantificación de los microorganismos, a través del conteo bacteriano se establecieron los siguientes valores para bacterias ácido lácticas se obtuvo valores de 4.8×10^5 UFC/g a 5.6×10^5 UFC/g ,mientras que para bacterias acéticas se encontraron datos de 9×10^5 UFC/g a 1.2×10^5 UFC/g y finalmente en cuanto a levaduras se obtuvo rangos de 4×10^5 UPC/g a 3.4×10^5 UPC/g.

Al momento de la caracterización in vitro se logró verificar que las especies de bacterias ácido lácticas pueden pertenecer a los géneros *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, las Bacterias acéticas al género *Acetobacter* y Levaduras al género *Sacharomyces* por lo cual se determina que las especies aisladas pueden aportar un gran potencial en el campo Agroindustrial.

RECOMENDACIONES

Realizar varias técnicas de investigación en otros tipos de suelos de bosques primarios secundarios para determinar la presencia de una mayor cantidad de microorganismos benéficos útiles en la biotecnología y Agroindustria. Analizar más al fondo los microorganismos aislados aplicando varias pruebas de uso alimentario para conocer si son de uso agroindustrial alimentaria.

Aplicar pruebas API a las especies aisladas y agares específicos por lo que se podrá identificar de una forma más concreta para la obtener microorganismos benéficos para la agroindustria.

BIBLIOGRAFÍA

ABIS. *Lactobacillus koreensis*. s.l. : REGNUM PROCARIOTAS, 2020.

ALE, ELISA, ET AL. *Lactobacillus fermentum* : ¿Podría la capacidad de producción de EPS ser responsable de las propiedades funcionales? s.l. : Microbiología de los Alimentos, 2020. 90.

ALLAUCA, MIRYAN. *Inventario de recurso hídrico existente en el paramo de la comunidad San Isidro, cant+on Pujilí, Provincia Cotopaxi*. Latacunga : Universidad Técnica de Cotopaxi, 2018.

AMAGUAYA, LLAMUCA JOSÉ LUIS. *DETERMINACIÓN DE CARBONO EN EL SUELO DE BOSQUE NATIVO DE CEJA ANDINA EN EL SECTOR GUANGRA, PARROQUIA ACHUPALLAS, CANTÓN ALAUSÍ, PROVINCIA DE CHIMBORAZO*. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. Riobamba : s.n., 2015. pp. 46.

Análisis estadísticos de los datos climáticos históricos de la SPAM MFL. **Cedeño, Galo, Guanoluiza, AXEL Y VALDIVIESO, CRISTIAN.**, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabi. 2021. pp. 2-8.

ANDRADES, RODRÍGUEZ MARISOL, MOLINER, ARAMENDÍA ANA AND MASAGUER, RODRÍGUEZ ALBERTO. *PRÁCTICAS DE EDAFOLOGÍA : MÉTODOS DIDÁCTICOS PARA ANÁLISIS DE SUELOS*. [Online] 2015. [Cited: 10 1, 2022.] <https://publicaciones.unirioja.es/catalogo/monografias/mdaa15.shtml>.

ANGUISACA, CRISTIAN. *Identificación molecular de consorcios bacterianos resistentes a metales pesados provenientes de aguas residuales de una industria hidrocarburífera en la provincia de Esmeraldas Ecuador*. Quito : Universidad Politecnica Salesiana, 2017.

ANGULO, CYNTHIA. *Importancia clinica de los metodos fenotipicos utilizasos en la identificación bacteriana*. Machala : Universidad Técnica de Machala, 2021.

APP. *Plan de desarrollo provincial y de ordenamiento territorial*. Napo : APP, 2019.

ARIAS, EDNA AND PIÑEROS, PAOLA. *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde*. Bogota : Pontificia Universidad Javeriana, 2018.

ARIAS, OCHOA ANDRÉS, ET AL. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LEVADURAS DEL GÉNERO SACCHAROMYCES PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA. Perriera, Barranquilla, Colombia : s.n., 2019. Vol. 8.

ARMOA, JISSEL. *Produccion de exopolisacaridos a partir de bacterias acido lacticas utilizando tusa de maiz como fuente de carbono.* San Lorenzo : Universidad Nacional de Asunción, 2020.

ARTIGAS, SPINOGLIO FLORENCIA AND MACHADO, DAY VIRGINIA SALOME. Aislamiento, selección e identificación de levaduras nativas con propiedades enológicas en uvas Tannat. Uruguay : s.n., 2017.

BERMUDEZ Y ROJAS. Contaminación odófora: causas, efectos y posibles soluciones a una contaminación invisible. 2019.

BERNIER, RENÉ, UNDURRAGA, PABLO AND MENESES, GUSTAVO. *Evaluación de la capacidad tampón de fósforo de un suelo volcánico serie Osorno, del sur de Chile.* Centro Regional de Investigación INIA Remehue, Instituto Internacional de Nutrición de Plantas. Acassuso – Argentina : s.n., 2007. pp. 28.

BONIFAZ, NANCY AND LEÓN, RAMIRO. *Pastos y forrajes del Ecuador.* Cuenca : Universidad Politecnica Salesiana, 2020.

BRITANIA. T.S.I. Agar (Triple Sugar Iron Agar). [Online] 2021. [Cited: 9 21, 2022.] https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070971eb11bd.pdf.

CAMACHO, LOPEZ C ORLANDO. Caracterización y evaluación de bacterias para producción de bioplástico de origen microbiano utilizando como sustrato agua residual de la industria láctea, 2015. [Online] 04 1, 2016. [Cited: 7 28, 2022.] <https://www.semanticscholar.org/paper/Caracterizaci%C3%B3n-y-evaluaci%C3%B3n-de-bacterias-para-de-L%C3%B3pez-Orlando/db8351ef72b6307e9f34433ae757333143af4>.

CARASI, P, MALAMUD, M AND SERRADELL, M. Potencialidad de cepas de *Lentilactobacillus kefir* aisladas en alimentos como probióticos: estado del arte y perspectivas. [Online] 2022. [Cited: Octubre 18, 2022.] <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-021-02728-x>.

CASTILLO, CARLOS, ET AL. Caracterización bioquímica de bacterias del ácido láctico del intestino delgado de lechones como posibles cepas probióticas Caracterización Bioquímica de Bacterias Acido Lácticas Procedentes de Intestino Delgado de Lechones Como Posibles Cepas Probiótica. 2022.

CASTILLO, FABRICIO. *Aislamiento e identificación molecular de mohos y levaduras procedentes del material lignocelulósico de caña de azúcar recolectado en el área de molinos del Ingenio Azucarero del Norte.* Sangolqui : Universidad de las Fuerzas Armadas, 2022.

CAYCEDO, LILIANA, CORRALES, LUCIA AND TRUJILLO, DIANA. Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la nutrición. Colombia : NOVA, 2020. Vol. 19, 36.

CHASI, CHELA WILSON FABIAN. “AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS DEL TRACTO INTESTINAL DE Gallus gallus EN TRES ESTADÍOS FISIOLÓGICOS DE POLLOS”. *dspace.esPOCH*. [Online] 7 21, 2015. [Cited: 07 28, 2022.] <https://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5234/1/TESIS.pdf>.

CHIMBO, CHIMBO DARWIN VINICIO AND CRUZ, FREIRE JUAN DIEGO. “DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL PISO (FONDO PLANO CON DIFUSORES) PARA UN VEHÍCULO DE COMPETENCIA TIPO FÓRMULA “SAE” EN FIBRA NATURAL PARA LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO”. 2016.

CHINGANA, AMALFY, ET AL. *Morfología y clasificación de los hongos.* Bogota : Universidad Nacional de Colombia, 2017.

CONDALAB. Caldo YPD; Para mantener y desarrollar levaduras en procedimientos de biología molecular. [Online] 6 17, 2021. [Cited: 9 22, 2022.] <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-microbiologia/1224-14494-caldo-ypd.html>.

COMAN, M.M., VERDENELLI, M.C., CECCHINI, C., BELÀ, B., GRAMENZI, A., ORPIANESI, C., CRESCI, A. & SILVI, S. Probiotic characterization of Lactobacillus isolates from canine faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 2019 vol. 126, no. 4, pp. 1245-1256. ISSN 13652672. DOI 10.1111/jam.14197.

DÁVALOS, PATRICIA. *Aislamiento y caracterización de cepa nativas de Komagataeibacter xylinus y comparación de su crecimiento en diferentes sustratos.* Ambato : Universidad Técnica de Ambato, 2022.

DELGADO, LUIS. Incorporación de bacterias ácido lácticas como probióticos en el cultivo de camarón blanco en la camarónera "Las Aminas", El Salvador. [Online] 2020. [Cited: Octubre 18, 2022.] <file:///C:/Users/dcdec/Downloads/14427.pdf>.

DÍAZ, LESLIE. *Aislamiento y caracterización de microorganismos biocatalizadores de ceniza volcánica en suelos agrícolas de Tungurahua.* Quito : Universidad Central del Ecuador, 2017.

DÍAZ, NAVA LIBIA ELENA. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE LEVADURAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL DURANTE LA FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA DE JUGO DE SORGO DULCE. [Online] 6 2014. [Cited: 9 16, 2022.] <https://rinacional.tecnm.mx/bitstream/TecNM/2482/1/2014%20Libia%20%20Elena%20Diaz%20Nava.pdf>.

DICKINSON AND COMPANY. PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD BBL TSI agar slants. BBL TSI Agar Slants. [Online] 2015. [Cited: 9 22, 2022.] <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22772#:~:text=La cantidad pequeña de ácido,cambie a un pH alcalino.>

DOMINGUEZ, RAFAEL, ET AL. *Recursos Naturales, medio ambiente y sostenibilidad.* América Latina y el Caribe : CEPAL, 2019.

DUCHI, QUINZO BRYAN DAVID. Microorganismos de uso agroindustrial aislados del suelo de un bosque primario de la parroquia Pungala cantón Riobamba. [Online] 2022. [Cited: 8 10, 2022.] <https://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/17808/1/27T00553.pdf>.

DUEÑAS, D. Cuantificación del porcentaje de humedad y porcentaje de cenizas contenido en los residuos sólidos urbanos del Distrito metropolitano de Quito. [Online] 2012. [Cited: 9 20, 2022.] https://rraae.cedia.edu.ec/Record/REPSEK_2bac7995b31fa4b61e0f61e3368f39e0.

EGUCHI, NAOTO, ET AL. *Ligilactobacillus agilis* BKN88 posee filamentos flagelares heteropoliméricos termoestables/ácidos. [Online] 1 27, 2021. [Cited: 10 11, 2022.] <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.001020?TRACK=RS>.

ESCRIBANO, ROCÍO. *Selección de levaduras no-Saccharomyces para la elaboración de vinos tintos de calidad.* España : Universidad de la Rioja, 2021.

ESPITIA, KELLYS. *Acompañamiento en las practicas de fertilizacion y acondicionamiento de suelos bananeros en la finca la Victoria en Carepa Antioquia.* Monteria : Universidad de Cordova, 2020.

FAO. *El manejo del suelo en la producción de hortalizas con buenas prácticas agrícolas.* ORGANIZACIONES DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA – FAO. Paraguay : s.n., 2013. pp. 33.

FAO y MAG. El manejo del suelo en la producción de hortalizas con buenas prácticas agrícolas. *ORGANIZACIONES DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA Agricultura – FAO.* [Online] 2013. [Cited: 10 1, 2022.] <https://www.fao.org/3/i3361s/i3361s.pdf>.

FERNÁNDEZ, ANIBAL. *Transformación de subproductos y residuos de agroindustria de cultivos templados, subtropicales y tropicales en carne y leche bovina.* Bordenave : Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2019.

FERRARI, ALEJANDRO, VINDEROLA, GABRIEL AND WEILL, RICARDO. *Alimentos fermentados: microbiología, nutricion, salud y cultura.* Buenos Aires : Instituto DANONE, 2020.

GAD Baños de Agua Santa. DIAGNÓSTICO DEL CANTÓN BAÑOS DE AGUA SANTA ACTUALIZACIÓN DEL PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL (2014 – 2019). [Online] 2014. [Cited: 4 22, 2022.] https://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/1860000480001_Diagn%C3%B3stico%20GADBAS%20VF_16-03-2015_03-31-23.pdf.

GAMBOA, ANGULO MARCELA, ET AL. Bacteria y Hongos microscópicos. [Online] 2019. [Cited: Mayo 11, 2022.] <https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap4/04%20Bacterias%20y%20hongos.pdf>.

GARCÍA, LICETH CRISTINA ZAPATA, VÉLEZ CARDONA, NATALIA Y RITTER, NATALY. MICROORGANISMOS EFICIENTES EN EL SUELO. [En línea] 2013. [Citado el: 15 de Octubre de 2016.] <https://microindustrialasalle.wordpress.com/elaborado-por/>.

GAVÍN, ROSALINA. *Carcaterización genética y fenotípica del flagelo de Aeromonas.* Barcelona : Universitat de Barcelona, 2018.

GENESIS, NOEMY. Guía de laboratorio de Microbiología y Parasitología. *Studocu.com.*

[Online] 2019. [Cited: 7 29, 2022.] <https://www.studocu.com/cl/document/universidad-autonoma-de-chile/microbiologia-y-parasitologia/guia-morfologia-agrupaciones-y-estructuras-bacterianas/5313721>.

GERARD, LILIANA MABEL. CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO DESTINADAS A LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES DE FRUTAS. [Online] 12 2015. [Cited: 9 16, 2022.] <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/59401/GERARD%20-%20Caracterizaci%C3%B3n%20de%20bacterias%20del%20%C3%A1cido%20ac%C3%A9tico%20destinadas%20a%20la%20producci%C3%B3n%20de%20vinagres%20de....pdf?sequence=1#:~:text=Las%20bacterias%20del%20%C3%A1ci>.

GOBIERNO PROVINCIAL PASTAZA. *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la provincia de Pastza al año 2025*. Pastaza : Gobierno Provincial Pastaza, 2019.

GONZÁLEZ, DE LA CRUZ J ULISES, ET AL. Identificación genética de bacterias ácido lácticas nativas en leche cruda de vaca y queso Poro artesanal. México : s.n., 2 21, 2021. Vol. 18, 1.

GUERRA, P MATÍAS AND CASTRO, F JEAN FRANCO. Evaluación de viabilidad de microorganismos. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA*. [Online] 2020. <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6945/NR42414.pdf?sequence=13&isAllowed=y#:~:text=La%20evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20viabilidad,38%20%C2%B0C%20para%20bacterias..>

GUERRERO, JAIMES YARY ZULAY. Aislamiento, identificación y caracterización molecular de *Lactobacillus* sp, provenientes de diferentes fuentes animales y ensilados : su evaluación como potencial probiótico para nutrición animal. [Online] 2011. [Cited: 9 20, 2022.] <http://bdigital.ula.ve/storage/pdf/36860.pdf>.

GUEVARA, GRANJA MARÍA FERNANDA. Aislamiento E Identificación De Microorganismos Solubilizadores De Potasio a Partir De Muestras De Suelo Y Raíces De Cultivosde Alcachofa De La Localidad De La Remonta,Cantón Cayambe. [Online] 6 25, 2010. [Cited: 06 25, 2022.] <https://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/930/T-ESPE029607.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

GUZMÁN, FLORES CONRADO MANUEL. LA DESNITRIFICACIÓN EN UN SUELO FORESTAL. “PINAL DEL ZAMORANO”, QUERÉTARO. [Online] 8 13, 2020. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1621/SSIT0013863.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

GÚZMAN, MÓNICA. *Resistencia de microorganismos aislados de kombucha a condiciones del tracto gastrointestinal in vitro.* Zapopan : Centro de Unvestigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C, 2021.

GUZMÁN, TRAMPE SILVIA. Los microbios y la ecología. 2017. Vol. 68, 2, pp. 50-19.

HANNA INSTRUMENTS. HI-83325-02 FOTÓMETRO MULTIPARAMÉTRICO CON MEDIDOR DE PH PARA ANÁLISIS DE NUTRIENTES DE PLANTAS. *Multiparameter Photometer for Nutrient Analysis HI8332.* [Online] 2021. [Cited: 10 1, 2022.] <https://www.hannainstruments.co.uk/photometers/2226-hi-83325-02-multi-parameter-photometer-with-ph-meter-for-plant-nutrient-analysis#:~:text=The%20HI%2D83325%20offers%20an,own%20concentration%20versus%20absorbance%20mode..>

HEREDIA, K. Medio de cultivo ypd yeast extract peptone dextrose. Quito : s.n., 2017. pp. 1-55.

IBARRA, ANA. *Evaluación de la actividad antimicrobiana de dos envases activos con aceite esencial de azahar en la vida de Anaquel de la tortilla de maíz.* Hermosillo : Centro de Investigación en Alimentacion y Desarrollo, 2019.

INEN. CALIDAD DEL SUELO. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL SUELO EXPRESADO COMO FRACCIÓN EN VOLUMEN UTILIZANDO CILINDROS DE MUESTREO. MÉTODO GRAVIMÉTRICO (ISO 11461:2001, IDT) . *NTE INEN-ISO 11461* . [Online] 2014. [Cited: 9 22, 2022.] https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_11461extracto.pdf.

INTAGRI. El Magnesio en el Suelo y su Efecto en las Raíces. [Online] 2001. [Cited: 10 10, 2022.] <https://www.intagri.com/articulos/suelos/el-magnesio-en-el-suelo-y-su-efecto-en-las-raices>.

JARAMILLO, LENIN. *Diseño y construcción de un biorreactor tipo Batch para la producción de bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de hojarasca de la parroquia Mindo, Provincia de Pichincha, Ecuador.* Sangolqui : Universidad de las Fuerzas Armadas, 2020.

JARAMILLO, LENNIN. *Diseño y construcción de un bioreactor tipo Bach para la producción de bacterias ácido laticas aisladas de hojadera de la parroquia Mindo Provincia de Pichincha,*

Ecuador. Sangolqui : Universidad de las Fuerzas Armadas, 2020.

JIMÉNEZ, TOBÓN GUILLERMO ANTONIO AND VÉLEZ, HOYOS ALEJANDRO.

Tinción de Gram de tejido: alcances y limitaciones. 2012. Vol. 18,pp. 1-2.

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

LEIVA Y MOROCHO. Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. [Online] 2019. [Cited: Mayo 11, 2022.] <https://scielo.sld.cu/pdf/cag/v46n2/0253-5785-cag-46-02-93.pdf>.

LEMUS, SANTIAGO. *Optimización de un proceso de fermentación artesanal para elaboración de vinagre y estudio del inóculo empleado.* Puebla : Universidad Autónoma de Puebla, 2020.

LEYVA. Análisis bioinformático del sistema flagelar de la alphaproteobacteria tipo rickettsia *Candidatus Hepatobacter penaei*. [Online] 2017. [Cited: Mayo 11, 2022.] <https://scielo.conicyt.cl/pdf/revbiolmar/v52n1/art10.pdf>.

LÓPEZ, PEDRO AND FERRO, ALEJANDRO. *Derecho ambiental.* México : Printed, 2018.

MAE. *Sistema Nacional de Áreas protegidas del Ecuador.* Ecuador : Áreas protegidas, 2018.

MALDONADO, YAJAIRA. *Elaboración de un protocolo y metodología de recolección de especies de hongos en la estructura del sustrato vegetal del bosque siempre verde pie montano de la cordillera occidental de los Andes en el recinto los Laureles entre le centón Pangua y La Mana.* Latacunga : Universidad Técnica de Cotopaxi, 2020.

MARRERO, YOANDRA, ET AL. Nuevo método para determinar la asimilación de azúcares en levaduras. San José de Lajas, Habana, Cuba : Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 2004. Vol. 38, 3, pp. 273-278.

MAU, SILVIA, VEGA, KAREN AND SÁNCHEZ, MÓNICA. Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales. [Online] 12 2011. [Cited: 4 20, 2022.] <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/ambientales/article/view/7704>.

MESTRE, FERNANDO. *Metodología para el levantamiento de información base para la generación de agricultoras sustentables ante el cambio climático.* Machala : Universida Tecnica de Machala, 2016.

MIRÁS, IRENE. *Estudio de la población de bacterias ácido lácticas de un embutido cárnico mediante MALDI TOF.* Valladolid : Universidad de Valladolid, 2019.

MORA Y MOROCHO. Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. [En línea] 2019. [Citado el: 20 de Abril de 2022.] https://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852019000200093.

MORALES, IRIS. *Efeccto de labranzas y mejorador orgpanico en las propiedades biológicas del suelo, mediante la cuantificación de bacterias y hongos.* Saltillo : Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, 2019.

NAVARRO, GÍNES AND NAVARRO, SIMÓN. *Química agrícola. Química del suelo y de los nutrientes esenciales para las plantas.* España : PRINTED, 2013.

NTE INEN-ISO 11461. NORMA TÈCNICA ECUATORIANA. CALIDAD DEL SUELO. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL SUELO EXPRESADO COMO FRACCIÓN EN VOLUMEN UTILIZANDO CILINDROS DE MUESTREO. MÉTODO GRAVIMÉTRICO (ISO 11461:2001, IDT). [En línea] Enero de 2014. https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_11461.pdf.

OLMOS, ANA FERNÁNDEZ, ET AL. Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. España : s.n., 2010.

ORELLANA, VALDIVIA ERICK DANILO. RESERVA DE CARBONO DE LOS SUELOS EN LA CUENCA MANGLARALTO, PENÍNSULA DE SANTA ELENA. [Online] 2022. [Cited: 10 10, 2022.] <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/7588/1/UPSE-TIA-2022-0036.pdf>.

PARRAS, HUERTAS RICARDO ALDO. Bacterias acido lacticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.* Colombia : s.n., 6 16, 2010. Vol. 8, 1, pp. 93-105.

PEREZ, ELVIA. *Micropagacion y biotizavion de jojoba mediante bacterias endofitas*

promotoras de crecimiento vegetal. La Paz : Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C, 2017.

PÉREZ, ROCIO FERNÁNDEZ. Identificación Taxonómica y clonal de bacterias acéticas,y estudios del efecto de la nisina frente a biofilms de bacterias enológicas . [En línea] 2015. file:///C:/Users/ERIKA%20ALLAUCA/Downloads/Dialnet-IdentificacionTaxonomicaYClonalDeBacteriasAceticas-45994%20(3).pdf.

PORCEL, MATILDE. Estudio morfológico, fisiológico y bioquímico de bacterias acéticas. [Online] 1947. [Cited: 09 10, 2022.] https://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0514_Porcel.pdf.

POZO, HUGO. *Ordenanza que aprueba la actualización del plan de desarrollo y ordenamiento territorial PDOT 2019.2023 y el plan de uso y gestión del suelo PUGS 2019-2031 anexo 1 y 2.* Quito : Corte Constitucional del Ecuador, 2020.

Producción de microorganismos de montaña para el desarrollo de una agricultura orgánica.

RODRÍGUEZ, NELSON Y TAFUR, ZAIDA. IV CONACIN. 2020. pp. 1.

PUENTE, FLORES MARCO AURELIO. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE BACTERIAS BENÉFICAS PARA MAÍZ A PARTIR DE MAÍCES CRIOLLOS. [Online] 2016. [Cited: 10 11, 2022.] <https://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/42379/tesis%20%20de%20doctorado%20marco%20aurelio%20puente%20flores.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

RAMÍREZ, FABIÁN, ET AL. *ACTUALIZACIÓN DEL PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DE LA PARROQUIA RÍO NEGRO -CANTON BAÑOS DE AGUA SANTA.* BAÑOS : s.n., 2015.

RAMÍREZ, LÓPEZ CAROLINA AND VÉLEZ, RUIZ JORGE F. Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. 12 13, 2016. Vol. 27, 6, pp. 115-128.

RAMÍREZ, PALACIO ÁLVARO ANDRÉS AND MORENO, HURTADO FLAVIO HUMBERTO. RESPIRACIÓN MICROBIAL Y DE RAÍCES EN SUELOS DE BOSQUES TROPICALES PRIMARIOS Y SECUNDARIOS (PORCE, COLOMBIA). [Online] 2008. [Cited: 10 1, 2022.] <https://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v61n1/a14v61n1.pdf>.

REYNOSO, MARÍA, ET AL. Manual de microbiología general. pp. 5 - 26, 2015.

RÍOS, TOBÓN SANDRA, AGUDELO, CADAVID RUTH M AND GUTIÉRREZ, BUILES LINA A. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. [Online] 2017. [Cited: Abril 20, 2022.] <https://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v35n2/0120-386X-rfnsp-35-02-00236.pdf>.

RAMOS. Contaminación odorífera: Causas, efectos y posibles soluciones a una contaminación invisible. [En línea] 2018. [Citado el: 11 de Mayo de 2022.] https://innovacionyciencia.com/articulos_cientificos/contaminacion-odorifera-causas-efectos-y-posibles-soluciones-a-una-contaminacion-invisible.

SALAZAR, ALVAREZ LILIAN GABRIELA. Aislamiento y caracterización de microorganismos durante el proceso de fermentación de Theobroma cacao L. de la variedad "Chuncho" obtenida en Cuzco, Perú. [Online] 2017. <https://hdl.handle.net/20.500.12866/1436>.

SERRANO, VINCENTI SHELIA, ET AL. Análisis estadístico de datos meteorológicos mensuales y diarios para la determinación de variabilidad climática y cambio climático en el distrito Metropolitano de Quito. Cuenca, Ecuador : LA GRANJA, 2012. Vol. 16, 2, pp. 23-47.

SIGMA, ALDRICH. PD Agar YEPD Agar. [Online] 2022. [Cited: 9 22, 2022.] https://www.sigmaaldrich.com/DK/en/product/sial/y1500?gclid=Cj0KCQjwmPSSBhCNARIsAH3cYgZq9CaCEpTd-mMq9WbunS8SitGDm-bVmVzjtnSPNmOtlvI58L-eBhEaAjkJEALw_wcB..

SOUNDHARRAJAN, ILAVENIL, CHOON, KI AND SOO, HYUNG. Application and Future Prospective of Lactic Acid Bacteria as Natural Additives for Silage Production—A Review. s.l. : Applied Sciences, 2021. pp. 11.

SUÁREZ, MACHÍN C, GARRIDO, CARRALERO N A AND GUEVARA, RODRÍGUEZ C A. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. ICIDCA. Sobre los derivados de la aña de Azúcar. 2016. Vol. 50, 1, pp. 20-28.

URIBE, EDUARDO. *El cambio climático y sus efectos en la biodiversidad en América Latina.* Chile : CEPAL, 2015.

VALENCIA, CAROLINA. *Determinación de la capacidad conservadora de bacterias ácido*

lácticas y mesofials aplicadas en salami para evitar el uso de conservantes artificiales. Cuenca : Universidad Politecnica Salesiana, 2020.

Valladares, de la Cruz Juan Carlos. Elementos requeridos para un diagnóstico de Laboratorio. *Engormix.com.* [Online] 6 21, 2010. [Cited: 07 20, 2022.] <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/elementos-requeridos-diagnostico-laboratorio-t28363.htm>.

VARELA, ANDREA L AND RON, SANTIAGO R. Geografía y clima del Ecuador. *BIOWEB.* [Online] Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2018. [Cited: 08 01, 2022.] <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/GeografiaClima/>.

VARGAS, CALI JHOHANA PAOLA. “EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA COMPARATIVA DEL QUESO DE HOJA TRADICIONAL ELABORADO EN UNA PLANTA INDUSTRIAL Y EN UNA ARTESANAL DE LA CIUDAD DE LATACUNGA”. Riobamba : s.n., 2018.

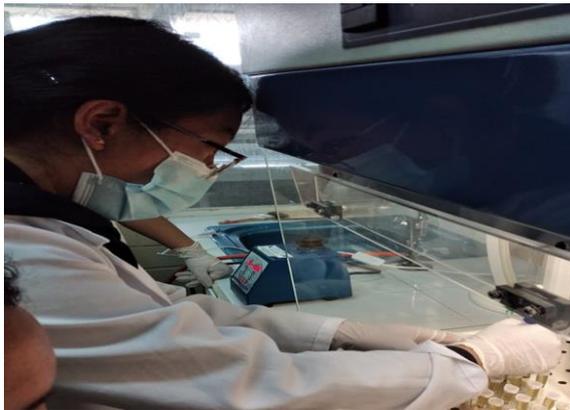


ANEXOS

ANEXO A: GEOREFERENCIACIÓN DEL LUGAR DE MUESTREO



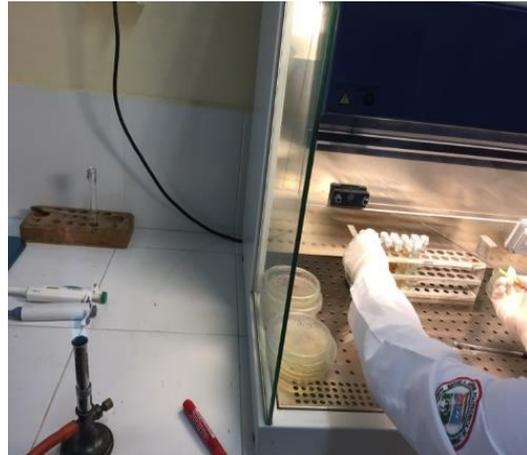
ANEXO B. PESAJE DE LAS MUESTRAS Y ESTERILIZACIÓN



ANEXO C. SIEMBRA LOS MICROORGANISMOS EN LOS AGARES ESPECIFICOS



ANEXO D. AISLAMIENTO Y CONTEO DE LAS CEPAS



ANEXO E. SELECCIÓN DE BACTERIAS

CODIGO DE LA MUESTRA	DILUCIÓN	IMAGEN
----------------------	----------	--------

M5R5	10^{-5}	
------	-----------	--

M4R3	10^{-5}	
------	-----------	--

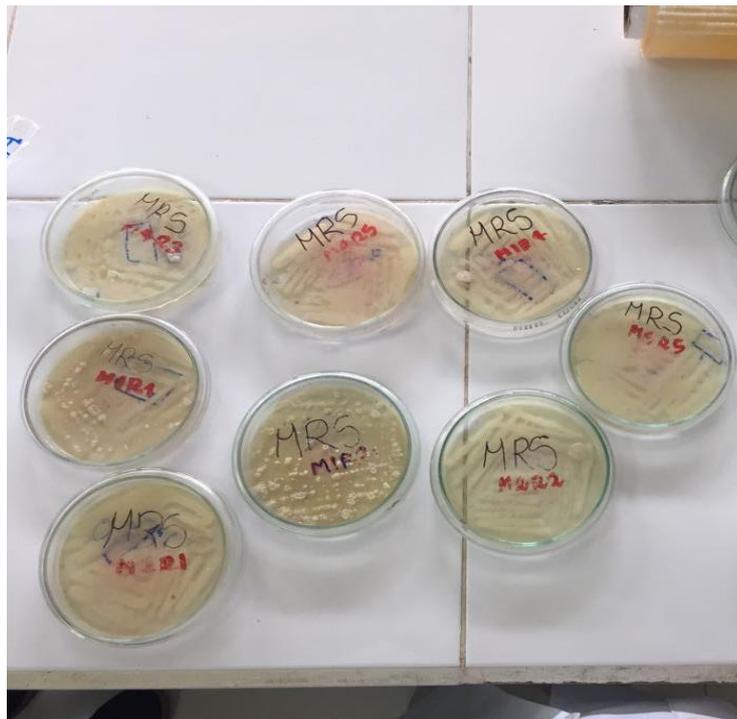
M4R5	10^{-5}	
------	-----------	--

M1R2	10^{-5}	
------	-----------	--

M1R1	10^{-5}	
------	-----------	--

M1R4	10^{-5}	
------	-----------	--

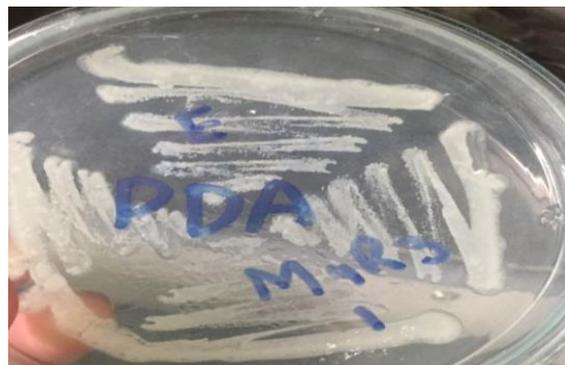
M2R1	10^{-5}	
------	-----------	--



M3R2 10⁻⁵

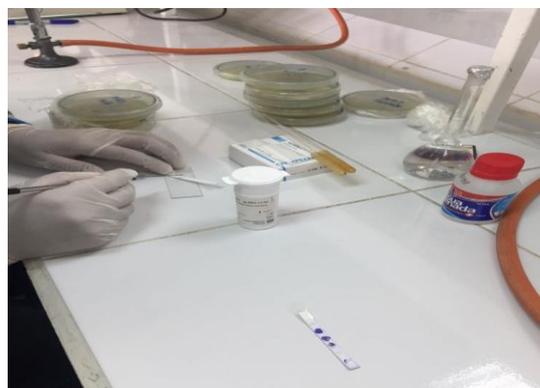


M5R4 10⁻⁵



M4R3 10⁻⁵

ANEXO F. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.





ANEXO G. ANÁLISIS



BROMATOLÓGICOS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO



ANEXO H. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR MRS.

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

ANEXO I. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO MRS

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

ANEXO J. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR ACETOBACTER GLUCOSA.

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

ANEXO K. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR SABORAU DEXTROSA.

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

ANEXO L. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR POTATO DEXTROSA.

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

ANEXO M. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO POTATO DEXTROSA BROTH.

Composición	Instrucciones
--------------------	----------------------

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

ANEXO N. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO YPD.

Composición		Instrucciones
Extracto de levadura	10,0g	1. Suspender 70 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
Dextrosa	20,0 g	
Peptona	20,0 g	
Cloranfenicol	0.5 g	
pH final: 6.5 ± 0.2		

ANEXO O. POBLACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARO BAÑOS.

Muestra	Bacterias Ácido Lácticas	Bacterias Ácido Acéticas	Levaduras
1	#colonias 48	# colonias11	# colonias37
	4.8x10 ⁵ UFC/g	1.1x10 ⁵ UFC/g	3.7x10 ⁵ UPC/g
2	#colonias 56	# colonias 12	# colonias34
	5.6x10 ⁵ UFC/g	1.2x10 ⁵ UFC/g	3.4x10 ⁵ UPC/g
3	#colonias 52	# colonias9	# colonias35
	5.2x10 ⁵ UFC/g	9x10 ⁵ UFC/g	3.5x10 ⁵ UPC/g
4	#colonias 53	# colonias9	# colonias40
	5.3x10 ⁵ UFC/g	9x10 ⁵ UFC/g	4x10 ⁵ UPC/g
5	#colonias 52	# colonias10	Colonias 39
	5.2x10 ⁵ UFC/g	1x10 ⁶ UFC/g	3.9x10 ⁵ UPC/g

ANEXO P. CONTEO DE LAS PLACAS BAL.

MUESTRAS	CONCENTRACIÓN	# TOTAL DE COLONIAS
1	1X10 ⁻⁵	47
	1X10 ⁻⁵	51
	1X10 ⁻⁵	48
2	1X10 ⁻⁵	55
	1X10 ⁻⁵	57
	1X10 ⁻⁵	57
3	1X10 ⁻⁵	52
	1X10 ⁻⁵	52
	1X10 ⁻⁵	52
4	1X10 ⁻⁵	55
	1X10 ⁻⁵	51
	1X10 ⁻⁵	53
5	1X10 ⁻⁵	50
	1X10 ⁻⁵	54
	1X10 ⁻⁵	52

ANEXO Q. CONTEO DE LAS PLACAS BA.

MUESTRAS	CONCENTRACIÓN	# TOTAL DE COLONIAS
1	1X10 ⁻⁵	11
	1X10 ⁻⁵	10
	1X10 ⁻⁵	12
2	1X10 ⁻⁵	12
	1X10 ⁻⁵	12
	1X10 ⁻⁵	13
3	1X10 ⁻⁵	10
	1X10 ⁻⁵	9
	1X10 ⁻⁵	10
4	1X10 ⁻⁵	10
	1X10 ⁻⁵	10
	1X10 ⁻⁵	9
5	1X10 ⁻⁵	12
	1X10 ⁻⁵	8
	1X10 ⁻⁵	10

ANEXO R. CONTEO DE LAS PLACAS LEVADURAS.

MUESTRAS	CONCENTRACIÓN	# TOTAL DE COLONIAS
1	1X10 ⁻⁵	35
	1X10 ⁻⁵	40
	1X10 ⁻⁵	38
2	1X10 ⁻⁵	34
	1X10 ⁻⁵	33
	1X10 ⁻⁵	36
3	1X10 ⁻⁵	34
	1X10 ⁻⁵	37
	1X10 ⁻⁵	36
4	1X10 ⁻⁵	40
	1X10 ⁻⁵	40
	1X10 ⁻⁵	40
5	1X10 ⁻⁵	39
	1X10 ⁻⁵	41
	1X10 ⁻⁵	37

ANEXO S. ESTADISTICA DE BACTERIAS ÁCIDO LACTICAS.

<i>BAL</i>	
Media	5,22
Error típico	0,128062485
Mediana	5,2
Moda	5,2
Desviación estándar	0,286356421
Varianza de la muestra	0,082
Curtosis	1,668649613
Coficiente de asimetría	-0,332180263
Rango	0,8
Mínimo	4,8
Máximo	5,6
Suma	26,1
Cuenta	5

ANEXO T. ESTADISTICA DE BACTERIAS ÁCETICAS

<i>BA</i>	
Media	4,26
Error típico	1,93535526
Mediana	1,2
Moda	9
Desviación estándar	4,32758593
Varianza de la muestra	18,728
Curtosis	-3,33155356
Coefficiente de asimetría	0,60736217
Rango	8
Mínimo	1
Máximo	9
Suma	21,3
Cuenta	5

ANEXO U. ESTADISTICA DE LAS LEVADURAS.

<i>LEVADURAS</i>	
Media	3,7
Error típico	0,11401754
Mediana	3,7
Moda	#N/A
Desviación estándar	0,25495098
Varianza de la muestra	0,065
Curtosis	-2,26035503
Coefficiente de asimetría	-4,2327E-15
Rango	0,6
Mínimo	3,4
Máximo	4
Suma	18,5
Cuenta	5



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 20 / 04 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: ERIKA JACQUELINE ALLAUCA MANYA
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: CIENCIAS PECUARIAS
Carrera: INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS
Título a optar: INGENIERA EN INDUSTRIAS PECUARIAS
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz


Cristhian Fernando Castillo Ruiz



0644-DBRA-UTP-2022