



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

**“MICROORGANISMOS DE USO AGROINDUSTRIAL AISLADOS
DEL SUELO DE UN BOSQUE PRIMARIO DE LA PARROQUIA
PUNGALA CANTÓN RIOBAMBA”**

Trabajo de Titulación:

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS PECUARIAS

AUTOR: BRYAN DAVID DUCHI QUINZO

DIRECTOR: Ing. CÉSAR IVÁN FLORES MANCHENO PhD.

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, **Bryan David Duchi Quinzo**

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, Bryan David Duchi Quinzo, 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 autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba 20 de julio de 2022





Bryan David Duchi Quinzo

1750015313

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 “**MICROORGANISMOS DE USO AGROINDUSTRIAL AISLADOS DEL SUELO DE UN BOSQUE PRIMARIO DE LA PARROQUIA PUNGALA CANTÓN RIOBAMBA**” 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.

	FIRMA	FECHA
Bqf. María Verónica González Cabrera PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-07-20
Ing. César Iván Flores Mancheno PhD. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2022-07-20
Ing. Iván Patricio Salgado Tello MsC MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022-07-20

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se la dedico a mis Padres, por guiarme por el camino del bien, por su apoyo incondicional, sus consejos, a enseñarme valores, que se debe tener uno en la vida para alcanzar el éxito y darme ánimos para seguir adelante con mis metas a pesar de los errores que se comete. A Dios por seguir dándome fuerzas, esperanzas en la vida a pesar de los problemas que se tiene en el camino. A mis tíos que me recibieron en su hogar, por su apoyo y su preocupación hacia mí.

Bryan

AGRADECIMIENTO

A Dios por seguir dándome entendimiento, fuerzas y sabiduría en todo mi camino.

A mis padres por su apoyo a pesar de los errores que se comete siempre estuvieron apoyando en todo. Al Dr. Iván Flores director por su ayuda a cada momento y así poder culminar este trabajo de investigación.

Al Ing. Iván Salgado asesor mi trabajo de titulación, por su paciencia, consejos y supervisión del trabajo de titulación.

Bryan

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	3
1.1. Caracterización del medio biótico.....	3
1.1.1. Generalidades.....	3
1.1.2. Los bosques primarios.....	3
1.2. Muestreo.....	4
1.3. Horizontes de un suelo.....	4
1.4. Características del suelo.....	4
1.4.1. Propiedades físicas del suelo.....	4
1.4.2. Propiedades químicas del suelo.....	5
1.5. Microorganismos.....	6
1.5.1. Generalidades.....	6
1.5.2. La diversidad microbiana del suelo.....	6
1.5.3. Crecimiento de los microorganismos.....	8
1.5.4. Las Bacterias.....	8
1.5.4.1. Bacterias ácido lácticas.....	9
1.5.4.1.1. Lactobacillus.....	9
1.5.4.1.2. Bacillus.....	10
1.5.4.2. Acetobacter aceti.....	10
1.5.5. Hongos y levaduras.....	11
1.5.5.1. Levaduras (Saccharomyces).....	11
1.5.6. Aislamiento de microorganismos.....	12
1.5.7. Métodos de identificación.....	12
1.5.7.1. Tinción de Gram y morfología.....	12

1.5.7.2.	<i>Movilidad</i>	13
1.5.7.3.	<i>Prueba de Glucosa/ Lactosa</i>	13
1.5.8.	<i>Pruebas Bioquímicas</i>	14
1.5.8.1.	<i>Catalasa</i>	14
1.5.8.2.	<i>Oxidasa</i>	14

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	15
2.1.	Localización y duración del experimento	15
2.1.1.	<i>Localización del lugar del muestreo.</i>	15
2.2.	Unidades experimentales	16
2.3.	Materiales, equipos e instalaciones	16
2.3.1.	<i>Materiales</i>	16
2.3.2.	<i>Insumos de laboratorio</i>	18
2.3.3.	<i>Equipos</i>	18
2.3.4.	<i>Instalaciones</i>	19
2.4.	Tratamiento y diseño experimental	19
2.5.	Mediciones experimentales	19
2.6.	Técnicas estadísticas	20
2.7.	Metodología de la evaluación	20
2.7.1.	<i>Muestreo</i>	21
2.7.2.	<i>Muestreo al azar</i>	21
2.7.3.	<i>Recolección de las muestras en el suelo</i>	21
2.7.4.	<i>Suspensión y dilución</i>	22
2.7.5.	<i>Siembra y Aislamiento</i>	22
2.7.6.	<i>Conteo</i>	23
2.7.7.	<i>Resiembra y Aislamiento de microorganismos</i>	24
2.7.8.	<i>Pruebas bioquímicas</i>	24
2.7.8.1.	<i>Prueba de catalasa</i>	24
2.7.8.2.	<i>Prueba de oxidasa</i>	25
2.7.8.3.	<i>Prueba de tinción de Gram</i>	25
2.7.8.4.	<i>Prueba KOH</i>	25
2.7.8.5.	<i>Prueba de movilidad</i>	26
2.7.8.6.	<i>Prueba de fermentación de azúcares</i>	26

2.7.8.7.	<i>Prueba de fermentación de azúcares en bacterias acéticas y levaduras.</i>	27
2.7.8.8.	<i>Prueba bioquímica caldo YPD (Yeast Peptone Dextrose).</i>	28
2.8.	Conservación de especies aisladas.	29
2.9.	Pruebas físico químicas del suelo	29
2.9.1.	<i>Para la determinación de pH del suelo.</i>	29
2.9.2.	<i>Para la determinación de materia seca.</i>	30
2.9.3.	<i>Determinación de cenizas</i>	30
2.9.4.	<i>Para la determinación de la materia orgánica.</i>	31
2.9.5.	<i>Determinación de nitrógeno</i>	32
2.9.6.	<i>Cuantificación de minerales (Magnesio).</i>	33
2.9.7.	<i>Cuantificación de minerales Nitratos.</i>	33
2.9.8.	<i>Cuantificación de minerales (Potasio).</i>	34

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	35
3.1.	Ubicación de los puntos de muestreo en Alao Pungala	35
3.2.	Bacterias Acido Lácticas.	35
3.2.1.	<i>Identificación morfológica de las Bacterias Acido Lácticas.</i>	35
3.2.2.	<i>Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas de Bacterias acido lácticas</i>	36
3.2.3.	<i>Prueba de movilidad.</i>	37
3.2.4.	<i>Prueba de fermentación de azúcares</i>	37
3.3.	Bacterias Acéticas.	38
3.3.1.	<i>Identificación Morfológica de las Bacterias Acéticas.</i>	38
3.3.2.	<i>Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas</i>	39
3.3.3.	<i>Prueba de fermentación de azúcares de las BA.</i>	39
3.4.	Levaduras.	40
3.4.1.	<i>Identificación Morfológica de Levaduras.</i>	40
3.4.2.	<i>Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas</i>	40
3.4.3.	<i>Prueba de fermentación de azúcares de levaduras.</i>	41
3.5 .	Análisis físicos químicos del suelo.	42
3.5.1.	<i>pH.</i>	42
3.5.2.	<i>Humedad</i>	42
3.5.3.	<i>Cenizas.</i>	43

3.5.4.	<i>Materia orgánica</i>	43
3.5.5.	<i>Nitrógeno</i>	43
3.5.6.	<i>Nitratos</i>	43
3.5.7.	<i>Potasio</i>	44
3.5.8.	<i>Magnesio</i>	44
CONCLUSIONES		45
RECOMENDACIONES		46
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Porcentaje de Materia Orgánica en el suelo	5
Tabla 2-1:	Características físico química del suelo de los bosques Llucud y Palictahua	5
Tabla 3-1:	Clasificación de los suelos según su grado de acidez.....	6
Tabla 4-1:	Métodos de aislamiento más frecuentes	12
Tabla 1-2:	Condiciones meteorológicas de la zona.....	15
Tabla 2-2:	Bosque Nativo de Pungala (Alao)	15
Tabla 3-2:	Ingredientes de caldo rojo fenol	27
Tabla 4-2:	Ingredientes del TSI Agar por litro de agua purificada	27
Tabla 5-2:	Caldo YPD (Yeast Peptone Dextrose).....	28
Tabla 1-3:	Ubicación de los puntos de muestreo en Alao Pungala.....	35
Tabla 2-3:	Morfología de las especies aisladas de BAL	35
Tabla 3-3:	Identificación bioquímica de especies aisladas BAL	36
Tabla 4-3:	Resultados de la prueba de fermentación de azúcares.....	37
Tabla 5-3:	Morfología de las especies aisladas de Bacterias acéticas.....	38
Tabla 6-3:	Identificación bioquímica de especies aisladas de Bacterias acéticas	39
Tabla 7-3:	Pruebas bioquímicas en B. acéticas Fermentación de azúcares	39
Tabla 8-3:	Morfología de las especies aisladas de levaduras.....	40
Tabla 9-3:	Pruebas bioquímicas en Levaduras Caldo YPD	41
Tabla 10-3:	Pruebas bioquímicas de levaduras en Fermentación de azúcares.....	41
Tabla 11-3:	Estadística descriptiva del suelo del bosque primario de Pungala Alao.....	42

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1:	Caracterización morfológica de las bacterias en cultivos primarios	13
Gráfico 1-2:	Situación Geográfica del lugar del muestreo.....	16

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR MRS
- ANEXO B:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO MRS
- ANEXO C:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR *ACETOBACTER* GLUCOSA
- ANEXO D:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR SABORAU DEXTROSA
- ANEXO E:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR POTATO DEXTROSA
- ANEXO F:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO POTATO DEXTROSA BROTH
- ANEXO G:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO YPD
- ANEXO H:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA pH DEL SUELO BOSQUE PRIMARIO
- ANEXO I:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA HUMEDAD DEL SUELO BOSQUE PRIMARIO
- ANEXO J:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE CENIZAS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO
- ANEXO K:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO.
- ANEXO L:** ESTADÍSTICA NITRÓGENO DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO
- ANEXO M:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA CANTIDAD DE NITRATOS EN EL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO
- ANEXO N:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA CANTIDAD DE POTASIO EN EL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO
- ANEXO O:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA CANTIDAD DE MAGNESIO DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO
- ANEXO P:** LUGAR Y REALIZACIÓN DEL MUESTREO
- ANEXO Q:** PESAJE DE LAS MUESTRAS Y ESTERILIZACIÓN
- ANEXO R:** SIEMBRA LOS MICROORGANISMOS EN LOS AGARES ESPECIFICOS
- ANEXO S:** AISLAMIENTO Y CONTEO DE LAS ESPECIES
- ANEXO T:** SELECCIÓN DE ESPECIES MÁS TINCIÓN GRAM
- ANEXO U:** CONTEO DE LAS PLACAS IDENTIFICADAS DE LAS BAL
- ANEXO V:** CONTEO DE LAS PLACAS IDENTIFICADAS DE BA
- ANEXO W:** CONTEO DE LAS PLACAS IDENTIFICADAS DE LEVADURAS
- ANEXO X:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS APLICADAS A ESPECIES SELECCIONADAS
- ANEXO Y:** ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS DEL SUELO DE BOSQUE DE ALAO.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue aislar, purificar e identificar bacterias y levaduras de uso Agroindustrial a partir de un suelo del bosque primario de la Parroquia Pungala Cantón Riobamba y analizar sus propiedades físico-químicas; identificando a los microorganismos mediante pruebas bioquímicas y los análisis físico químicos del suelo mediante ensayos bromatológicos; el tipo de muestreo que se llevó a cabo fue al azar con la ayuda de un barreno, para después realizar una solución madre y allí comenzar con las diluciones, luego se realizó la siembra de los microorganismos en agar MRS, *Acetobacter* glucosa y Saborau, siendo incubadas por 48 horas a 37, 27 y 30°C, posteriormente se realizó el aislamiento y para conocer la identificación de cada microorganismo se realizó de acuerdo con su morfología, color, superficie, y tinción Gram, después se procedió con las pruebas bioquímicas como la catalasa, oxidasa para bacterias lácticas y acéticas, e hidróxido de potasio solo para BAL; pruebas de caracterización como la fermentación de carbohidratos y caldo YPD en levaduras; obteniendo 5 especies de bacterias ácido lácticas, 2 especies de bacterias acéticas y levaduras, siendo todas las bacterias lácticas positivo para tinción y negativo para oxidasa, catalasa y KOH; en cuanto a BA todas negativo para tinción y oxidasa, pero positivo para catalasa, en cuanto a la fermentación de sustratos ayudó a la posible identificación de cada especie y para los análisis físico químicos se realizó siguiendo las normas establecidas para cada mineral; se concluyó que el suelo del presente estudio es rico en minerales y que las especies aisladas pueden pertenecer al género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Acetobacter* y *Saccharomyces*, se recomienda emplear otras pruebas bioquímicas como las API 50 CHL, o en un PCR en tiempo real para una mejor identificación de cada uno de los microorganismos aislados.

Palabras claves: <MICROBIOLOGÍA>, <BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS >, <BACTERIAS ACÉTICAS>, <LEVADURAS >, <BOSQUE PRIMARIO>, <MINERALES>.


D.B.R.A.I.
Ing. Cristian Castillo



1690-DBRA-UTP-2022

ABSTRACT

The objective of this study was to isolate, purify and identify bacteria and yeasts for agroindustrial use from a primary forest soil of the Pungala Town in the Riobamba City and to analyze their physical-chemical properties by identifying the microorganisms through biochemical tests and the physical-chemical analysis of the soil through bromatological tests. The type of sampling that was carried out was at random with the help of an auger, to then make a stock solution and then start with the dilutions. Finally, the sowing of the microorganisms in MRS agar, *Acetobacter* glucose and Saborau was performed. It was incubated for 48 hours at 37, 27 and 30°C. Afterwards, the isolation was carried out and the identification of each microorganism was made according to its morphology, color, surface and Gram staining. The biochemical tests such as catalase, oxidase for lactic and acetic acid bacteria, and potassium hydroxide only for LAB were performed; characterization tests such as carbohydrate fermentation and YPD broth in yeasts. It was obtained 5 species of lactic acid bacteria, 2 species of acetic acid bacteria and yeasts. All lactic acid bacteria were positive for staining and negative for oxidase, catalase and KOH. As for LAB all negative for staining and oxidase, but positive for catalase, as for the fermentation of substrates helped to the possible identification of each species and for the physical-chemical analysis was performed following the standards established for each mineral. It was concluded that the soil of the present study is rich in minerals and that the isolated species may belong to the genus *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Acetobacter* and *Saccharomyces*. It is recommended to use other biochemical tests such as API 50 CHL, or in a real time PCR for a better identification of each of the isolated microorganisms.

Keywords: <MYCHROBIOLOGY>, <ACID-LACTIC BACTERIA>, <ACETIC BACTERIA>, <LEVADURES>, <PRIMARY FOREST>, <MINERALS>.



1690-DBRA-UTP-2022

MsC. Gloria Isabel Escudero Orozco
0602698904

INTRODUCCIÓN

Los bosques y suelos Primarios son nativos o naturales que se caracterizan por no haber sido convertidos o alterados nunca por ninguna industria. Por tal razón que la intervención humana ha sido nula, lo cual los Bosques Primarios son los únicos lugares que aún se mantienen en estado virgen, es decir, que ningún otro tipo de bosque y suelos se aproxima a la riqueza biológica o a la jerarquía ecológica de los Bosques Primarios (Aguirre, et al., 2007, p.13).

Según, (Pereira, 2015, p.2) en su estudio con el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria menciona que el suelo posee cuatro componentes que son materia mineral, materia orgánica, agua y aire, lo cual la materia mineral está formada por partículas que se agrupa según su tamaño en tres fracciones, el suelo arenoso esta de 2 a 0,05 mm, el limo de 0,05 a 2 mm y la arcilla menor a 0,2 mm. La materia orgánica es muy importante para la fertilidad del suelo lo que le da su color oscuro característico y los sólidos del suelo se ubican en poros ocupados por aire y agua de manera variable.

Las bacterias y los hongos son los dos grupos más numerosos en el suelo, pero la cantidad de microorganismos depende de la sensibilidad de grupos bacterianos muy variable al cambio de condiciones ambientales, lo cual pueden dejar de producir metabolitos y enzimas muy importante en el campo científico (Belsky et al., 2009, p.34). Debido a la enorme diversidad de la microbiota del suelo se ha estimado que en un suelo orgánico puede haber un total de $2,6 \times 10^{29}$ células microbianas y entre ellas, 1012 bacterias, 104 protozoos y 25 km de hifas de hongos (Voroney, 2007, p.23).

(García et al., 2013, p.67), en un estudio realizado sobre microorganismos eficientes del suelo, menciona la existencia de varios géneros de bacilos Gram positivos y *Lactobacillus*, así como bacilos esporulados en muestras de microorganismos eficientes tomadas del suelo.

Según (Fenchel y Kühn, 2000, p.35), afirma que los beneficios de los microorganismos benéficos de las bacterias del suelo son extensos que van desde la fijación de nitrógeno y la descomposición de la materia orgánica hasta la hidrólisis y producción subproductos metabólicos, y a nivel Agroindustrial para la realización de alimentos funcionales con componentes nutricionales para el beneficio del ser humano.

Una investigación realizada en la Provincia de Chimborazo en el cantón Cumandá y Guano en bosques de montaña y subtropical, al aislar microorganismos se encontraron bacterias gran +, *Lactobacillus* y bacilos esporulados, bacilos gran – como los *bacilos* cocos, y levaduras en germinación (Moreno y Velarde, 2016, p.76).

En vista de que no existen investigaciones de microorganismos benéficos en suelos vírgenes o primarios se plantea que en estos lugares puede existir la presencia de bacterias benéficas de uso Agroindustrial, porque ningún ser humano ha pisado estos lugares y por lo tanto no se intervienen industrialmente.

Por esta razón el presente estudio tiene como objetivo Aislar Microorganismos de uso Agroindustrial del suelo de un bosque primario de la Parroquia Pungala Cantón Riobamba y como objetivos específicos

Aislar y Purificar bacterias y levaduras de uso Agroindustrial a partir del suelo de un bosque primario de la Parroquia Pungala.

Identificar bacterias y levaduras de uso Agroindustrial obtenida del suelo del bosque primario.

Analizar las propiedades físico-químicas del suelo a partir del bosque primario en estudio.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Caracterización del medio biótico

1.1.1. Generalidades.

(PNUMA, 2020, p.3), define que los bosques proporcionan agua, mitigan el cambio climático y proporcionan hábitat a muchos polinizadores, que son esenciales para la producción alimentaria sostenible. Se estima que el 75% de los principales cultivos alimentarios del mundo, que representan el 35% de la producción mundial de alimentos, se vale de la polinización zoófila para la producción de frutas, hortalizas o semillas.

1.1.2. Los bosques primarios

Son ecosistemas que cubren un diez por ciento de la superficie terrestre, siendo ellos los únicos que se conservan en estado virgen y son lo suficientemente grandes como para garantizar la supervivencia de una gran diversidad de microorganismos (Quinto, 2016, p.65)

(Valero y Salas, 1997, p.12), en un estudio realizado en selección de prácticas Silviculturales para bosques tropicales menciona que lo bosques primarios son compuestos sesiónales, donde la interacción entre sus elementos constituye la mejor adaptación al medio en el que se desarrollan, el comportamiento de los organismos en la naturaleza corresponde a la interacción de las características genéticas, definidas a través de la evolución y de los factores ambientales.

Los bosques primarios o vírgenes, se consideran lugares propicios para los procesos ecológicos que no han sido alterados de forma significativa. Como tales, los bosques primarios son equiparados con altos niveles de diversidad biológica como plantas, animales y microorganismos (State of the tropic, 2010, p.34).

Según una investigación de un bosque primario de Yurimaguas en Perú posee una riqueza taxonómica de 25 unidades y una densidad de 446 individuos/m², con una biomasa de 57.9 g de peso fresco/m² (Quinto, 2016, p.56).

1.2. Muestreo

Según (Rodríguez, 2015, p.67), afirma que una muestra puede definirse como una parte que indica la calidad de un todo, siendo el objetivo del muestreo seleccionar una parte que puede ser una porción, un número de recipientes o unidades de producto que sea representativo de un todo: lote, depósito, etc.

1.3. Horizontes de un suelo

A cada capa donde se organiza el material del suelo, se denomina horizonte, y su superposición constituye el perfil de los suelos (García, 2009, p.12).

Según lo mencionado por (Mengual, 2013, p.10), el horizonte A es el más superficial porque se encuentra en la superficie de la tierra, y el más profundo es el horizonte C ya que se encuentra a más de 30 cm de profundidad de la tierra.

En el horizonte A, existe mayor cantidad de materia orgánica, es de color gris oscuro, es de estructura migajosa y granular, (García, 2009, p.13), se encuentra de 0 a 20 cm de profundidad y es el horizonte donde se encuentra raíces insectos y microbios. Se considera que en un gramo de suelo del horizonte A hay 2500 millones de bacterias, más medio millón de hongos, y más de 30000 protozoos (Henry y Heinke, 1999, p.23).

Con respecto a la capa u horizonte B según menciona, (Moncayo, 2000, p.14), la profundidad del suelo va desde 20 a 40 cm, lo cual los microorganismos existentes son 19750 de bacterias aeróbicas, 700000 bacterias anaeróbicas y 7250 de *Actinomycetes*, entre otros, lo que también el microbiota benéfico se encuentra en la Capa B ya que para extraer los microorganismos se toma la muestra desde 20 cm de profundidad en adelante.

1.4. Características del suelo

(Borges et al., 2012, p. 3), señala que las características físicas del suelo son la estructura, la densidad, la temperatura y el color en cambio las características químicas del suelo son el pH, la acidez, la materia orgánica, cenizas, carbono, nitrógeno fertilidad entre otros

1.4.1. Propiedades físicas del suelo

De acuerdo a lo manifestado por (Calderoli, 2016, p.35), la textura y estructura del suelo están determinados por el porcentaje de los minerales como: arena, limo y arcilla y sin olvidar el contenido de materia orgánica, estos se organizan a nivel micro y macro en agregados. Los

microorganismos se distribuyen heterogéneamente dentro de micro agregados y en las macros porosidades fuera de los micro agregados.

1.4.2. *Propiedades químicas del suelo*

Según (Jaurixje et al., 2013, p.19), señalan que las propiedades físico químicas de los suelos se ven mejoradas con el contenido de materia orgánica y el pH, lo cual la biomasa microbiana es mejor ya que son más estables, y esto se traduce en una mayor actividad biológica de los microorganismos.

(Amaguaya, 2015, p.76), en su investigación sobre las propiedades físico química en un suelo de bosque nativo en el cantón Alausí, reporta el 52,72% de humedad, siendo de gran importancia el agua para el crecimiento de los microorganismos, un valor de pH de 5.71, y con el 22.20% de materia orgánica.

Tabla 1-1: Porcentaje de Materia Orgánica en el suelo

% MATERIA ORGÁNICA	DENOMINACIÓN
0 – 1	Muy bajo
1,1 - 2,9	Bajo
3 – 5,9	Medio
> 6	Alto

Fuente: (Bertsioia y Departamento de Desarrollo Económico, 2017, p.12).

En el trabajo experimental realizado por (Patiño, 2018, p.67) en bosques nativos de Llucud y Palictahua en la Provincia de Chimborazo mostraron las siguientes propiedades físico- químicas: En el bosque Llucud presentaron como materia orgánica un rango muy alto (19.20 %), con un pH de 5.2, en minerales en contenido medio con 21.386 ppm de nitrógeno y en contenido alto de 473.9 ppm de potasio, en cambio, en el bosque Palictahua el contenido de la materia orgánica fue bajo de (0.43%), con un pH neutro de (6.87%), en minerales con un rango bajo de 10.038 ppm de nitrógeno y 150.8 ppm de potasio.

Tabla 2-1: Características físico química del suelo de los bosques Llucud y Palictahua

Ubicación	Materia Orgánica	pH	Nitrógeno ppm	Potasio ppm
Llucud	19.20%	5.52	21.386	473.9
Palictahua	0.43%	6.87	10.038	150.8

Fuente:(Patiño, 2018, p.67).

Otro estudio verificado por (Quinto, 2016, p.71), menciona que el porcentaje de materia orgánica en el bosque primario de Perú es de 3.69%, haciendo que sea un suelo bien estructurado y con buena reserva de nutrientes. del mismo modo el porcentaje de nitrógeno tiene correlación con la materia orgánica, por lo que presenta un nivel medio (0.17 %).

Según lo realizado por (Herrera, 2015, p.59), indica que la cantidad de magnesio experimentado un bosque primario en el Recinto de JAUNECHÉ” es de 143 ppm y la cantidad de potasio fue de 4,5 ppm.

Para la cantidad de nitratos NO₃⁻ en el suelo del bosque de encino en México presentó una concentración de 5,77 mg/Kg, y otro estudio realizado también en México en un bosque de Oyamel presento una concentración de nitratos de 0,79 mg/kg (Guzmán, 2015, p.48).

Tabla 3-1: Clasificación de los suelos según su grado de acidez

Fuertemente ácido	pH. < 5,0
Moderadamente ácido	pH. 5,1 - 6,5
Neutro pH.	pH. 6,6 - 7,3
Medianamente alcalino	pH. 7,4 - 8,5
Fuertemente alcalino	pH > 8,6

Fuente. (Milagro, 2019, p.1).

1.5. Microorganismos

1.5.1. Generalidades

(Raffino, 2020, p.4), define a los microorganismos que son aquellos organismos que, por su tamaño reducido, son imperceptibles a la vista, estos organismos cuentan con una organización biológica muy básica y además se caracterizan por existir numerosas variedades, de diferentes formas y tamaños. Los microorganismos pueden estar presentes en diferentes lugares como bosques, suelos, en el medio ambiente, agua, etc., lo cual desarrollan funciones diferentes en cada lugar en la que se encuentran (Raffino, 2020, p.5).

1.5.2. La diversidad microbiana del suelo

(Atlas y Bartha, 2002, p.34), indica en su estudio sobre microbiología ambiental que en la superficie del suelo viven poblaciones de bacterias, hongos, algas y protozoos, y su distribución depende de los nutrientes. Las bacterias y los hongos son los dos grupos más numerosos en el suelo. Estos microorganismos son esenciales para los procesos de los ciclos biogeoquímicos, tienen la

capacidad de degradar compuestos contaminantes (principalmente los actinomicetos) y son responsables de la degradación de la materia orgánica presente en el suelo (Lal, 2007, p.43).

Se considera al suelo como uno de los principales reservorios de diversidad microbiana, y consecuentemente de genes para la degradación o transformación de compuestos orgánicos sobre el planeta, representa un ambiente sumamente promisorio para el descubrimiento de capacidades metabólicas novedosas y determinantes genéticos que podrían tener aplicación en la industria biotecnológica (Nannipieri y Eldor, 2006, p.23) citado por (Patiño, 2018, p.23).

(Atlas y Bartha, 2002, p.12), menciona que los microorganismos presentes en el suelo son factores clave en los ciclos de la mayoría de los nutrientes presentes en la tierra, especialmente en el ciclo del carbono, nitrógeno, azufre y fósforo. En el caso del ciclo del carbono, son responsables de la descomposición de residuos orgánicos y de la degradación de compuestos orgánicos contaminantes presentes en el suelo, siendo muy frecuente la utilización de sustratos (Ros et al., 2010, p.87).

Otra propiedad de los microorganismos es la solubilización de los minerales. Los elementos contenidos en las materias minerales del suelo (K, Ca, Mn, Mg, etc.) pueden también ser solubilizados por los microorganismos edáficos y volverlos asimilables para las plantas; Fijan nitrógeno. Esto debido a que diversos grupos de bacterias, tanto libres como simbiotes, son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (Patiño, 2018, p.34).

(Patiño, 2018, p.37) en un estudio obtenido en bosques nativos de Lluçud y Palictahua, en la Provincia de Chimborazo, manifiesta que la cantidad de los microorganismos existentes, lograron identificar poblaciones de bacterias, hongos y actinomicetos lo cual encontraron en mayor cantidad las bacterias con $4,6875 \times 10^7$ (UFC/g), seguidos por actinomicetos con $1,0775 \times 10^6$ (UFC/g) y por último los hongos con $6,5 \times 10^4$ (UFC/g).

(Patiño, 2018, p.37), también menciona en su estudio sobre de la biodiversidad microbiana de los bosques nativos de Lluçud y Palictahua, en la Provincia de Chimborazo, que las bacterias crecen con rapidez a un pH de 6.0 y 8.0, las levaduras entre 4.5 y 6.0, los hongos filamentosos entre 3.0 y 4.0 y en el caso de los actinomicetos de 5.0 a 7.0. Si el pH se ve alterado los microorganismos reducen su capacidad de crecimiento (Calvo, Reymundo y Zúñiga, p.208).

Un estudio realizado por (Quinto, 2016, p.31), en un bosque nativos Pukallacta en Perú menciona que existe una alta diversidad de bacterias, que difieren de estudios realizados donde los filos comunes son *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroides*, y *Proteobacteria*; esto ha hecho deducir que la diversidad viene dada por la selectividad microbiana que depende del hospedero y suelo.

(Enríquez, Viera y Mendoza, 2010, p.81) afirma que existe una gran diversidad de microorganismos benéficos en el suelo, en los que se incluyen aeróbicos como anaeróbicos, entre estos se

encuentran bacterias ácido láctico y fotosintético, levaduras, hongos como los actinomicetos y hongos fermentadores, estos microorganismos existen en gran cantidad en la naturaleza y son usados para el procesamiento de alimentos para humanos y para animales.

1.5.3. Crecimiento de los microorganismos

(Tortora, Funke y Case, 2017, p.127) mencionan que el crecimiento de los microorganismos es el aumento en cantidad constituyente y estructural de las células, cuando hay crecimiento en ausencia de división celular hay aumento en el tamaño y peso de la célula. Mientras que cuando el crecimiento es seguido de división celular hay un aumento en el número de células. El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. El crecimiento de una población ocurre de una manera exponencial (Patiño, 2018, p.3).

La velocidad de crecimiento exponencial se expresa como tiempo de generación (G) y este se define como el tiempo que tarda una población en duplicarse, los tiempos de generación varían ampliamente entre los microorganismos, algunos crecen rápidamente y presentan tiempos de generación de unos 30 minutos y otros tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días (Tortora, Funke y Case, 2017, p.54) citado por (Patiño, 2018, p.4).

1.5.4. Las Bacterias

Según (Maier, Pepper y Gerba, 2009, p.23), en un estudio sobre Ambiental microbiología Academia estima que la población bacteriana del suelo puede llegar a exceder de las 10^{10} células por gramo de suelo.

(Janssen, 2006, p.2), mediante un análisis genético realizado en bacterias, manifiesta que la mayor parte de la microbiota de varios tipos de suelos está compuesta por bacterias de los filos *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* y *Firmicute*.

(Atlas y Bartha, 2002, p.89), en su publicación sobre ecología microbiana determina que los géneros bacterianos más frecuentes, en suelos son los *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Actinomicetes* o *Bacillus*, entre otros.

En una investigación realizado por (Moreno y Velarde, 2016, p.77) en suelos secundarios de bosque de montaña y subtropical en la Provincia de Chimborazo manifiesta que los microorganismos benéficos que se pudieron hallar con facilidad por la formación de micelios blancos son bacterias gran +, *Lactobacillus* y bacilos esporulados y mohos y levaduras en germinación.

1.5.4.1. Bacterias ácido lácticas

(Otero, 2011, p.34) afirma que las BAL, son bacterias estrictamente fermentativas, que crecen a un pH entre 4,8 y 9,6 y no forman esporas, pueden ser bacilos y cocos Gram positivos, inmóviles, catalasa y oxidasa negativos, anaerobias aerotolerantes, poseen la capacidad de suprimir microorganismos debido a la producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico.

Las bacterias ácido lácticas, comúnmente producen sustancias que aceleran la descomposición de la materia orgánica, este tipo de microorganismos además producen sustancias que ayudan a controlar cierto tipo de patógenos que atacan a diversas plantas (Guaman, 2015, p.23).

Dentro de las BAL se encuentran más de 12 géneros bacterianos: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* y *Weisella* (Holzapfel et al., 2001; y Rondón et al., 2008, p.15).

Para identificar bacterias ácido lácticas en las placas de agar MRS, deben formar colonias cuyo tamaño sea de 1 a 2 mm, de color blanco cremoso, forma redonda, puntiformes, bordes enteros, superficie convexa, consistencia butirosa o consistencia húmeda o lisa (Ortiz, 2006, p.36).

Un estudio realizado por (Otero, 2011, p.37) sobre un Aislamiento, Selección e Identificación de Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas en un suelo de bosque tropical en Colombia, manifiesta que lograron identificar una gran cantidad de bacterias ácido lácticas como *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, entre otras.

1.5.4.1.1. *Lactobacillus*

(Guaman, 2015, p.38), afirma que los *Lactobacillus* tienen una función importante de suprimir microorganismos causantes de enfermedades, como los hongos del género *Fusarium*, que debilitan las plantas, exponiéndolas al ataque de otras enfermedades y plagas.

Referente a su temperatura óptima de aumento, tienen la posibilidad de ser mesófilos o termófilos. Acostumbran crecer entre 2 °C y 53 °C, aun cuando su temperatura óptima es de 30-40 °C. El pH ideal oscila entre 5,5 y 6,2. Son anaerobios aerotolerantes y la capacidad de aumento se ve reflejado en atmosfera microaerofila con un 5-10% de CO₂ (Del y Natural, 2020, p.14).

(Toalombo, 2012, p.68), realizó una investigación en un bosque Secundario en la Provincia de Tungurahua en el cantón Tisaleo, lo cual identificaron bacterias ácido lácticas como el *Lactobacillus plantarum*.

En una investigación realizada por (James, Velastegui y Cruz, 2017, p.91), sobre la evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus* a nivel de laboratorio señala que los *Lactobacillus* pueden crecer a pH entre 6 a 7,5; lo cual la materia orgánica fue medio ya que a profundidades de suelos más bajas existe poca presencia de materia orgánica.

1.5.4.1.2. *Bacillus*

Las especies de *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial debido a su habilidad para formar endosporas, característica que les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats, tanto ecosistemas acuáticos como terrestres, e incluso en ambientes bajo condiciones extremas, en este último caso, se han demostrado las potencialidades de las especies del género *Bacillus* para la producción de antibióticos, enzimas, la solubilización de fosfatos y la fijación biológica del nitrógeno (Tejera, Heydrich y Rojas, 2011, p.23).

Según (Calvo y Zúñiga, 2010, p.67) en un estudio realizado sobre la caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* en Perú, manifiesto que el 100% de las cepas de *Bacillus* aisladas crecieron bien a pH 4 y 5.5, lo que indica una buena adaptación del crecimiento en suelos de pH ácidos, en cuanto a la materia orgánica los *Bacillus* pueden crecer en un rango medio de 3-5,9 %.

1.5.4.2. *Acetobacter aceti*.

Según, (Corrigan, 2013, p.2) el *A aceti* no forma endosporas, esta bacteria es omnipresente en el medio ambiente, existente en el suelo, el agua, las flores, los frutos y sobre las abejas melosas; en esencia, dondequiera que se produzca la fermentación del azúcar, *A Aceti* produce ácido acético a partir de etanol en nichos alcohólicos en el medio ambiente; Acetato y lactato son oxidados a CO₂ y H₂O por el organismo. *Acetobacter aceti* es una bacteria Gram-negativa que se desplaza utilizando sus flagelos peritricos.

En un estudio realizado por (Velásquez y Alemán, 2014, p.89), en bosques terciarios en Venezuela encontraron la presencia de *Acetobacter aceti*.

Otro estudio realizado por (Delgado, 2019, p.23) sobre los mecanismos del suelo en la nutrición vegetal las bacterias del género *Acetobacter* fueron encontrados en suelos ácidos a un pH de 5.5, pero son más numerosos a pH neutros.

Según (Bastidas, 2019, p.45), en estudios sobre el proceso de fermentación con microorganismos de montaña en Chile menciona que se encontraron *Acetobacter aceti* con materia orgánica baja 2% y un pH de 6.

1.5.5. Hongos y levaduras.

(Thorn y Lynch, 2007, p.90), en su libro sobre el reino fungí establece que los principales grupos de hongos encontrados en el suelo son *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*, Dentro de estos grupos más comunes, los géneros más frecuentemente encontrados en el suelo son *Penicillium* y *Aspergillus* (Maier, Pepper y Gerba, 2009, p.75).

(Yurkov, Kemler y Begerow, 2012, p.45), menciona que, en suelos con diferentes tipos de manejo, es decir al cambio a largo plazo de bosque por pastizales determinó que en suelos con pastizales albergan predominantemente levaduras *Ascomycetes*, a diferencia de los suelos de bosque en donde la estructura de las comunidades de levaduras es más heterogénea.

(Moreno y Velarde, 2016, p.67), en un estudio realizado en los bosques de montaña y subtropical en la Provincia de Chimborazo lograron observar la morfología de algunas levaduras y hongos miceliales demostrando así la presencia de este tipo de hongos y levaduras en las muestras analizadas los mismos que son encargados de degradar proteínas complejas y carbohidratos, produciendo sustancias bioactivas que pueden estimular el crecimiento y actividad de otras especies

Para identificar la presencia de levaduras en las placas de agar Saborau las especies deben formar colonias de 1 cm y 2-5 mm de diámetro, con forma circular, con bordes enteros, ondulado, convexa, opaca, color blanco y beige, elevación plana, superficie lisa, lo que corresponde a sus características reportadas por (Salazar, 2017, p.34).

1.5.5.1. Levaduras (*Saccharomyces*)

Según (Escalona, 2015, p.60), en su investigación de microorganismos efectivos, extracción y uso, manifiesta que las levaduras sintetizan tanto sustancias antimicrobiales, como compuestos útiles para el crecimiento de las plantas, partiendo de aminoácidos y azúcares (secretados por las bacterias fotosintéticas), así como de materia orgánica, los elementos producidos por las levaduras (hormonas y enzimas), promueven la división activa de células, siendo también, sustratos útiles para las bacterias ácido lácticas y los actinomicetos.

En el trabajo experimental realizado por (Guaman, 2015, p.56) sobre la evaluación de la eficiencia de microorganismos nativos, señala que las levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae*, cumple la función de degradar proteínas complejas y carbohidratos lo cual pueden crecer a un pH de 3, 4.5 y 6 lo que pueden resistir a pH ácidos (Uribe et al., 2014, p.13).

(Toalombo, 2012, p.85) realizó un estudio en un bosque secundario de la provincia de Tungurahua lo cual pudo identificar levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*.

1.5.6. *Aislamiento de microorganismos*

Cuando aislamos un microorganismo desde una muestra implica que este está vivo. No obstante, la interpretación de las pruebas de aislamiento microbiano debe ser interpretada con cautela (Valladares, 2010, p.23). El aislamiento de un microorganismo no implica justamente su papel como patógeno en un proceso de la enfermedad, puede rara vez tratarse de flora saprofita o un representante vacunal (Valladares, 2010, p.25). El microorganismo aislado puede pedir de una tipificación siguiente, como una tipificación antigénica, la demostración de elementos de virulencia, etc. Así mismo, la falta aislamiento del microorganismo no implica claramente que éste no sea la causa de la enfermedad en bacteriología se aplican medios enriquecidos y selectivos artificiales, pruebas bioquímicas y en algunos casos identificación por medio de antiseros. Los resultados se expresan como género y especie bacteriana aislada y en ocasiones su cantidad relativa ((Valladares, 2010, p.25) citado por (Chasy, 2015, p.15).

Tabla 4-1: Métodos de aislamiento más frecuentes

Tipo de Siembra	Mecanismo	Técnica
Agotamiento por estrías	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 en superficie	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 inoculo.	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.11)

Realizado por (Moreno y Velarde, 2016, p.27).

1.5.7. *Métodos de identificación.*

Los métodos de identificación de microorganismos más frecuentes son la tinción gran, la prueba de movilidad, entre otras (Martínez y Steven, 2019, p.24).

1.5.7.1. *Tinción de Gram y morfología*

La identificación morfológica es el paso fundamental para el aislamiento de colonias bacterianas, mediante la observación de forma, consistencia, y color, (Gráfico 1-1); En el caso de la tinción

Gram permite obtener una clasificación generalizada en dos grandes grupos mediante su forma. Las Gram positivas (+) y las Gram negativas (-) proporcionan también un control de pureza de la colonia bacteriana, donde la gran mayoría de bacterias Gram - resultan ser patógenas, mientras que las Gram + no proporcionarían un peligro para el ser humano, en el que se encuentran las bacterias ácido-lácticas y levaduras (Fernández & García, 2010, citado por Martínez y Steven, 2019, p.24).

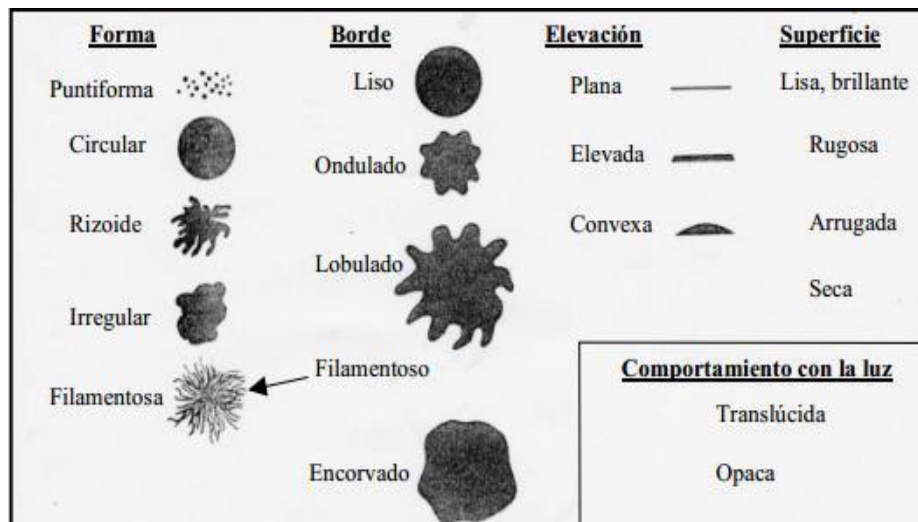


Gráfico 1-1. Caracterización morfológica de las bacterias en cultivos primarios

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

1.5.7.2. *Movilidad*

La bacteria habitualmente tiene una pared celular y uno o varios flagelos que utilizan para moverse en el medio donde se encuentran, esta facilidad de moverse les proporciona un alto beneficio ya que pueden transportarse hacia lugares más cómodos para su desarrollo, donde las condiciones o las fuentes de alimento son mayores (Pino, 2012, p.18) citado por (Chasy, 2015, p.28).

El agar es el representante solidificante y a esta concentración le da al medio la propiedad de ser semisólido, condición primordial para identificar movilidad, que se prueba por el enturbiamiento del medio o por aumento que difunde más allá de la línea de siembra (Pino, 2012, p.19), citado por (Chasy, 2015, p.28).

1.5.7.3. *Prueba de Glucosa/ Lactosa*

(Arellano y Yambay, 2016, p.29), en su tema de investigación de caracterización de cepas bacterianas en suelos afirma que la prueba de glucosa y lactosa evalúa la reacción del organismo al colocarlo en un medio de crecimiento básico en el que se incorporan hidratos de carbono específicos (glucosa y lactosa), con una posible producción de gas y ácido sulfhídrico (H₂S). La fermentación de los carbohidratos incorporados, producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo

de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido, existe un proceso de reducción, el tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro. (Arellano y Yambay, 2016) citado por (Moreno y Velarde, 2016, p.29).

1.5.8. Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas realizadas en microorganismos son un paso fundamental para conocer el tipo de cepa encontrada en un lugar determinado, muestra, lugar, etc.; (Fernández et al., 2010, p.7)

1.5.8.1. Catalasa

Se trata de una adaptación de los microorganismos al H₂O₂ (Peróxido de hidrógeno), la catalasa es una enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos, las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas (Fernández et al., 2010, p.8). La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, el desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva. (Salazar, 2017, p.25) citado por (Kraeva & Horáková, 2017, p.35).

1.5.8.2. Oxidasa

La prueba de oxidasa permite la identificación de la enzima oxidasa, debido a la reacción con el citocromo oxidasa, La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie (Fernández et al., 2010, p.8). La muestra se pone en contacto con la tira o disco impregnado con el reactivo para-aminoN-dimetil-anilina, se debe observar una coloración morada en un lapso no mayor a 30 segundos para que sea positivo, de lo contrario el resultado es negativo (Salazar, 2017, p.26) citado por (Kraeva & Horáková, 2017, p.35).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Localización y duración del experimento

El desarrollo de la presente investigación se realizará en los laboratorios de: Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias, y Bromatología y Nutrición Animal de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en la Provincia de Chimborazo, localizada en la región central de la serranía ecuatoriana; la misma que tendrá una duración de 120 días, cuyas condiciones meteorológicas se reportan en la tabla 1-2.

Tabla 1-2: Condiciones meteorológicas de la zona

VALORES PROMEDIO	
Heliofilia (: h.luz ⁻¹)	165,1
Temperatura (°C)	13,8
Precipitaciones (mm/año)	465,0
Humedad Relativa (%)	63,2
Altitud (msnm)	2820

Fuente: Estación Agro meteorológica de la Facultad de Recursos Naturales ESPOCH, 2016.

2.1.1. Localización del lugar del muestreo.

Se encuentra a 26 km de la ciudad de Riobamba. en el extremo sureste. Es conocida como “Puertas al Oriente” por su ingreso a las aguas termales El Placer y al Volcán Sangay.

Tabla 2-2: Bosque Nativo de Pungala (Alao)

Tipo_ ecosistema	Fisonomía_ ecosistema	Ecosistema
Terrestre	Bosque	Bosque Nativo de Pungala

Realizado por: Duchi, B. 2022

Información geográfica de Alao Parroquia Pungala.

- Latitud: -1.9
- Longitud: -78.4833333
- Humedad Relativa 72 %



Gráfico 1-2. Situación Geográfica del lugar del muestreo

Fuente: Google maps citado por Duchi, B 2022

El muestreo se realizará en la Parroquia de Pungala Alao con la ayuda de un barreno, lo cual se utilizará un GPS para la ubicación de los sitios exactos en la toma de muestras del suelo con sus respectivas coordenadas y proceder con los análisis en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Pecuarias.

2.2. Unidades experimentales

Toda la información será recopilada y analizada de las muestras de suelo lo que para el presente estudio se utilizará 500 g de suelo por cada repetición, lo cual se lo realizará 5 repeticiones y 2500 g por total de la unidad experimental.

2.3. Materiales, equipos e instalaciones

2.3.1. Materiales

- Gradillas
- Tubos de ensayo
- Espátulas
- Asa de siembra

- Fundas de Siplok
- Frascos térmicos
- Cámara
- GPS
- Barreno
- Esfero
- Materiales de oficina
- Kuler
- Pipetas de vidrio
- Mecheros.
- Papel aluminio
- Fósforos
- Tanque de gas
- Vaso termo resistente
- Varillas de agitación magnética
- Pipetas de 10 ml
- Pipetas de 5 ml
- Bureta
- Enler Meyer
- Puntas de 1 ml
- Cajas Petri vidrio
- Probeta de 10 ml
- Probeta de 100 ml
- Tubos Burnham
- Pinzas
- Piseta
- Porta objetos
- Pera de succión
- Desecador
- Franela
- Papel Aluminio
- Botellas de plástico
- Toalla de mano
- Guantes
- Cofia

- Uniforme
- Mandil

2.3.2. Insumos de laboratorio

- Agar MRS
- Medio Sim
- Caldo MRS
- Peptona
- Tiras de oxidasa
- Glicerol
- Ácido clorhídrico
- Ácido Bórico
- Hidróxido de sodio.
- Papel Filtro
- Papel indicador
- Rojo fenol
- Azúcares para fermentación (lactosa, glucosa, maltosa, manitol y fructosa)
- *Agar Acetobacter*
- *Caldo Actetobacter*
- Agar PDA
- Agar Saborau
- Caldo PDA
- Lugol
- Safranina
- Alcohol cetona
- Yodo
- Peróxido de hidrógeno
- Agua destilada
- Alcohol
- Amonio cuaternario.

2.3.3. Equipos

- Autoclave

- Microscopio
- Estufa
- Estufa de cultivo bacteriano anaeróbico
- Agitador magnético
- Balanza Electrónica
- Computadora
- Cámara fotográfica.
- Bortex
- Cámara de flujo laminar
- Lámpara de desinfección.
- Baño María.
- Espectrofotómetro
- Celdas de vidrio colorímetro
- pH metro
- Mufla
- Reverbero

2.3.4. Instalaciones

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

2.4. Tratamiento y diseño experimental

No se utilizará diseño experimental.

2.5. Mediciones experimentales

Análisis físico-químico del suelo:

pH, Materia orgánica, humedad, cenizas, nitrógeno, potasio, magnesio y nitratos.

Aislamiento, purificación e Identificación de Microorganismos de uso Agroindustrial del suelo

BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

Lactobacillus, Bacillus.

BACTERIAS ACÉTICAS

Acetobacter spp

LEVADURAS

Saccharomyces spp.

Caracterización de Bacterias Acido lácticas, *Acetobacter spp* y Levaduras como *Saccharomyces spp* mediante tinción Gram de muestras obtenidas del suelo de bosque primario de la Parroquia Pungala Cantón Riobamba.

- Gram positiva
- Gram negativa

Caracterización bioquímica de las diferentes especies encontradas.

- Catalasa
- Oxidasa
- Peróxido de potasio
- Prueba de movilidad
- Fermentación de carbohidratos
- Prueba del CO₂ en Caldo YPD
- Producción de ácido Sulfhídrico.

2.6. Técnicas estadísticas

Estadística descriptiva: media, y desviación estándar.

2.7. Metodología de la evaluación

En la presente investigación se utilizará el siguiente procedimiento:

2.7.1. Muestreo

Existen diferentes maneras de realizar la toma de una muestra representativa del área de interés, pero en cualquiera de ellas, debe considerarse la importancia de la homogeneidad de la muestra que se va a analizar (Schweizer, 2010, p.18).

2.7.2. Muestreo al azar

Se utilizó este tipo de muestreo porque el lote fue homogéneo lo cual se puede utilizar un patrón de muestreo al azar que consiste en tomar submuestras en todo el campo y mezclarlas muy bien para obtener una muestra compuesta de aproximadamente 500 g o un 1 kg para analizar. Para realizarlo, se toman submuestras en muchas oportunidades se sigue un camino en zigzag (Schweizer, 2010, pp.11-17) Incluso un muestra al azar se lo puede realizar cuando no se tiene suficiente información del lugar donde se va a realizar la muestra como tipo de suelo, topografía, entre otros (Rodríguez, 2015, p.41), De cada división se obtiene una muestra compuesta de submuestras tomadas al azar. Este procedimiento incrementa la precisión del muestreo (Schweizer, 2010, pp.11-17).

2.7.3. Recolección de las muestras en el suelo

La profundidad del muestreo está determinada por el tipo de cultivo y el propósito del análisis de suelo, por lo que la profundidad tomada para el muestreo fue de 10 a 20 cm ya que en esa es la profundidad exacta para encontrar microorganismos benéficos.

El instrumento a utilizar fue el barreno de cilindro abierto (colocho) se usan en suelos compactos u homogéneos o arcillosos, en los cuales es difícil sacar la muestra con cilindros cerrados. (Mendoza y Espinoza, 2017, p.19).

Procedimiento:

Enterrar el barreno haciéndolo girar, el penetra el suelo como si fuera un tornillo, hasta los 20 cm y extraer la muestra, después depositar la muestra de suelo en un balde plástico identificado con la profundidad. Este debe estar limpio de impurezas tales como, fertilizantes, cal, estiércol, cemento, entre otros, por lo que el distanciamiento entre una observación y otra depende del objetivo del muestreo, tamaño del lote y del método de muestreo seleccionado (Mendoza y Espinoza, 2017, p.21).

Precauciones

No se debe empacar o envolver las muestras en papel, en especial papel periódico, ya que los residuos de este material pueden alterar el resultado del análisis (Mendoza y Espinoza, 2017, p.22).

Depositar la muestra en la bolsa plástica, amarrar el extremo sacando todo el aire posible, pegar la etiqueta por fuera de la bolsa, depositarla en otra bolsa de plástico (doble bolsa) que permita ubicar la etiqueta entre el plástico, y amarrar nuevamente (Mendoza y Espinoza, 2017, p.22).

En el transporte se utilizó una caja de cartón o Kuler para que la muestra evite el contacto con materiales tales como combustible, fertilizantes, cal, estiércol u otro producto que la pueda contaminar para sus respectivos análisis de las características químicas y físicas (Mendoza y Espinoza, 2017, p.22).

Una vez realizado la toma de muestras en el suelo de bosque Primario de Pungala se lo llevo inmediatamente al laboratorio para los análisis respectivos.

2.7.4. Suspensión y dilución

El procedimiento de preparación de las diluciones de las muestras se realizó pesando 10g de cada muestra y colocando en un matraz de Erlenmeyer conteniendo 90 ml de agua peptonada previamente esterilizada, agitar el envase hasta su homogenización, como en el suelo la cantidad de microorganismos es muy grande se deben realizar diluciones de la suspensión/dilución para obtener un número factible de microorganismos que pueda ser contado. Por ejemplo, cuando se realizan métodos de recuento en medio sólido, el número factible de microorganismos que puede ser contado en una caja de Petri debe estar en el rango de 30 a 300 colonias por caja, (UNC, 2015, p.40) Por lo que se diluyo a 1:10, después transferir 1 ml de la dilución anterior a un tubo de ensayo con 9 ml de agua peptonada, obteniendo de esta manera la dilución 1:10000 (Vargas, 2018, p.28).

2.7.5. Siembra y Aislamiento

Para la siembra y aislamiento en BAL se utilizó Agar MRS, se prepara 67,15 gramos del Agar MRS y se disuelve en 1000 ml de agua purificada a un pH de 5, se homogeniza y se esteriliza en la autoclave a 121°C por 15 minutos, (Francisco Galindo Montero, 2016, p.23) citado por (Vargas, 2018, p. 28).

Para la siembra y aislamiento en Bacterias Acéticas se utilizó Agar *Acetobacter* glucosa lo cual 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 la siembra y aislamiento en Levaduras se utilizó Agar Saborau lo cual se prepara 65 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 (Francisco Galindo Montero, 2016, p.23), citado por (Vargas, 2018; p.28).

Las siembras se realizan en la cámara de flujo laminar, con todos los objetos necesarios completamente esterilizados para evitar cualquier tipo de contaminación en el momento de la siembra de las especies (Francisco Galindo Montero, 2016, p.23) citado por (Vargas, 2018, p.28)

Procedimiento:

Limpieza y desinfección del laboratorio de Ciencias Biológicas, a continuación, los cálculos para la siembra del Agar, después con el pesaje de las muestras de 10 g para 90 ml de agua de peptona y la dilución de las muestras a la -1, -2, y -3, -4 y -5. Se utilizará 75 cajas Petri para las cada una de repeticiones, 25 para *Lactobacilos*, 25 para *Acetobacter*, y 25 para levaduras para la preparación del agua destilada con la mezcla en los medios de cultivos, para diferentes tubos de ensayo, mezcla de los agares con el agua destilada o purificada.

Utilización de Agar MRS para Bacterias Acido lácticas con agua destilada a un de pH de 5, el Agar Saborau para Levaduras con cloranfenicol al 0.005% y Agar *Acetobacter* glucosa con etanol al 10% para el crecimiento de los microorganismos benéficos, limpieza y desinfección de los materiales para la siembra en el Autoclave, para lo cual se colocará el agar de 10ml en las diferentes cajas Petri para su solidificación, se lo llevara a la cámara de flujo laminar para la siembra respectiva con las muestras, para culminar se colocará en la estufa en 37°C para *Lactobacilos*, y *Acetobacter* y 30°C para levaduras por 48 horas para el crecimiento respectivo (Francisco Galindo Montero, 2016, p.24).

2.7.6. Conteo

El conteo de unidades formadoras de colonia es un proceso que se basa brevemente en: tomar un mililitro de una muestra y depositarlo usando para ello una pipeta en un tubo conteniendo 9 ml de una solución estéril, después de lo cual se lleva a vortex por 10 segundos, posterior a esto, 1 ml de este tubo se remueve y se introduce en un segundo tubo conteniendo también 9 ml de solución estéril. Este procedimiento se repitió hasta que la muestra estuviera diluida suficientemente (Peña et al., 2011, p.8).

Una vez sembradas las placas se llevan a incubar a 37°C durante 48 h para el recuento de las bacterias mesófilas (Peña et al., 2011, p.8).

Recuento en placa a las 48 horas

Para el conteo, se escogió las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, para ello se colocaron la placa Petri invertida con la superficie de vidrio hacia arriba. Con un contómetro manual se hizo el recuento de las colonias presentes en la placa, asimismo se observó la morfología de las colonias de bacterias como: forma, tamaño, borde, consistencia, color. Se utilizó la siguiente fórmula para realizar el conteo en placas (Ruíz, 2012, p.4).

Fórmulas para conteo de UFC:

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

UFC/ml o UFC/g = No. de colonias por placa X el factor de dilución / ml de la muestra sembrada (Ruíz, 2012, p.4).

2.7.7. Resiembra y Aislamiento de microorganismos

Seleccionar las colonias con características macroscópicas pertenecientes a las BAL de las placas que fueron utilizadas para el recuento en agar MRS, tomar cada colonia con el asa de inoculación y sembrar en 5 ml de caldo MRS esterilizado, incubar a 37°C por 24h, luego del periodo de incubación, tomar una muestra con el asa y sembrar por el método de agotamiento por estría en agar MRS, pH 5,4; Incubar las placas en posición invertida a 37°C por 48h en condiciones anaeróbicas (Vargas, 2018, p.28)

El mismo procedimiento se realizará para bacterias del género *Acetobacter* seleccionando las colonias con características macroscópicas pertenecientes a las bacterias acéticas, lo cual aquí se utilizará caldo *Acetobacter* o agua de peptona y se pondrá en la estufa a 30 °C por 24 h. esta se debe estar en condiciones aeróbicas, el mismo procedimiento se realizará para levaduras lo cual se seleccionará las colonias con características macroscópicas pertenecientes a levaduras aquí se utilizarán el caldo Potato Dextrosa Agar y se pondrán en la estufa a 30 °C por 24h.

2.7.8. Pruebas bioquímicas

2.7.8.1. 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 (Jaimes and Zulay 2011, p. 52).

2.7.8.2. *Prueba de oxidasa*

Se toma con un palillo grueso de madera una muestra bacteriana a partir de una colonia aislada proveniente de un cultivo de 24 horas, por lo que pasado 30 segundos aproximadamente si cambia de color la prueba es positiva (Salazar, 2017, p.26).

2.7.8.3. *Prueba de tinción de Gram*

Una vez aislado e identificado los microorganismos macroscópicamente se realizará el método de la tinción Gram.

Procedimiento

Hacer el frotis de manera regular para luego fijarlo a la flama y cubrir con cristal violeta durante 1 minuto, después lave ligeramente con agua corriente, para cubrir con yodopovidona (Lugol) durante 1 minuto a continuación lavar con agua corriente, decolorar con alcohol-acetona (1:1) y lavar con agua corriente, cubrir con safranina durante 30 segundos, lavar con agua corriente para secar y observar al microscopio (Rodríguez y Arenas, 2018, p.167).

Los organismos que retienen el color violeta se designan como Gram-positivas y aquellos que pierden el color violeta después de la decoloración con alcohol (acetona), y se tiñen con el siguiente colorante (safranina) y aparecen como rojos, se denominan Gram-negativas, una reacción positiva o negativa a la Tinción de Gram es realmente importante, ya que nos puede dar una idea clara de una primera clasificación de las bacterias en estudio (Francisco Galindo Montero, 2016, p.24).

Después de 48 horas en la incubadora a 37 °C, se observa notablemente el crecimiento de cada una de las cepas en los diferentes pH, por lo que fue necesario realizar una Tinción de Gram y observar en un microscopio, para comprobar o diferenciar cada una de las cepas (Francisco Galindo Montero, 2016, p.25).

2.7.8.4. *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 (Latorre, 2011, p.28).

Material y reactivos

Hidróxido de potasio (KOH) de Panreac (181521.1211).

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 portaobjeto. Se le añade una gota de KOH al 3% y se observa la aparición de hilo mucoide (Latorre, 2011, p. 28).

2.7.8.5. Prueba de movilidad

Se observa la movilidad las especies en el medio semisólido Sim para motilidad.

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 (Vargas, 2018, 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, p.30).

2.7.8.6. 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, p.30).

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 el cuadro 3 El caldo rojo fenol posee un color naranja- rojizo y un pH final de 7,4; que se ajustó con NaOH 2N (Vargas, 2018, p.30).

Tabla 3-2: Ingredientes de caldo rojo fenol

INGREDIENTES	CANTIDAD
Peptona	12 g
Extracto de carne	1 g
NaCl	5 g
Rojo Fenol	0.018 g
Glucosa	10 g
Agua destilada	1000 ml

Fuente: (Vargas, 2018, p.42) citado por (Castillo C, 2021. p.40).

Procedimiento:

Colocar 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. Auto clavar 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. 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.30).

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

Para la prueba de fermentación de azúcares en levaduras y bacterias acéticas se utilizará AGAR TSI (agar triple azúcar hierro), lo cual contiene tres azúcares (dextrosa, lactosa y sucrosa), rojo fenol para detectar la fermentación de carbohidratos, y sulfato ferroso para la detección de producción de ácido sulfhídrico (el oscurecimiento de la base del tubo) (Dickinson, 2015, p.2)

Tabla 4-2: Ingredientes del TSI Agar por litro de agua purificada

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

Fuente: (Dickinson, 2015, p.2)

Procedimiento

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, se deben estudiar por separado varias colonias de cada placa primaria dado que es posible que se produzcan infecciones mixtas (Dickinson, 2015, p.2).

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, 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, 2015, p.2).

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, 2015, pp.1-4).

2.7.8.8. Prueba bioquímica caldo YPD (*Yeast Peptone Dextrose*).

En esta prueba luego del aislamiento se procede a enriquecer las muestras que se aisló en agua de peptona y se las deja por 24 o 48 horas, luego se prepara el caldo YPD en el cual se va a agregar los azúcares que fermentan la familia de las levaduras *Saccharomyces* el caldo YPD se prepara de esta forma:

Tabla 5-2: Caldo YPD (*Yeast Peptone Dextrose*)

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

Fuente (Condalab, 2019, p.1).

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

Es por tanto por lo que se utiliza más la dextrosa para hacer el caldo y se lo coloca en tubos de ensayo y se lo esteriliza en el autoclave posteriormente se agrega 1mL de la muestra enriquecida y se deposita dentro de los tubos con el caldo YPD estéril de color naranja y este al cabo de 24 o 48 horas el tono del caldo se torna amarillo quiere decir que existe fermentación es decir resultado positivo si el tubo con el caldo YPD no cambio de color y se mantiene naranjado quiere decir que da negativo a fermentación (Condalab, 2019, p.1).

2.8. Conservación de especies aisladas.

Para el almacenamiento a largo plazo, los cultivos puros de BAL, BAA y Levaduras se conservaron en caldo MRS, agua de peptona y caldo PDA que contenían glicerol al 30% (v/v) a -20°C (Vargas, 2018, p.32).

Procedimiento

Se realizó el cultivo overnight a 33°C en caldo MRS de las colonias bacterianas aisladas, se mezclaron volúmenes iguales de cultivo overnight y de glicerol al 30%, previamente esterilizado a 121°C y 1 atm de presión, luego de colocar las especies de BAL, BA y Levaduras aisladas sobre el glicerol, se agita de manera constante para lograr una mezcla uniforme, al final se distribuye 1mL la mezcla en tubos Eppendorf, para su conservación en un ultracongelador a -20°C , (Vargas, 2018, p.32).

2.9. Pruebas fisico químicas del suelo

2.9.1. Para la determinación de pH del suelo

La norma, (NTE INEN-ISO 10390, 2014, p.6), describe un método instrumental para la determinación rutinaria del pH empleando un electrodo de vidrio en una suspensión 1:5 (fracción en volumen) de suelo en agua (pH en H_2O), en una solución de cloruro potásico de 1 mol/l (pH en KCl) o en una solución de 0,01 mol/l de cloruro cálcico (pH en Ca Cl_2).

Se prepara una suspensión de suelo con cinco veces su volumen de una de las siguientes sustancias: en este caso agua y con el pH metro se mide el valor.

2.9.2. Para la determinación de materia seca.

La norma (NTE INEN-ISO 11461, 2014, p.5) menciona que es aplicable a todo tipo de suelos no expansivos o no contractivos en los que puedan utilizarse cilindros de muestreo, no es aplicable en suelos pedregosos, en suelos con raíces duras o en suelos con cualquier otro elemento que impida el muestreo del suelo, se utiliza como método de referencia (por ejemplo, la calibración de los métodos indirectos de determinación del contenido de humedad).

Preparación

Muestras de suelo de volumen conocido se secan hasta pesada constante a $(105 \pm 5) ^\circ\text{C}$. La diferencia entre la masa de la muestra de suelo antes y después del secado, se toma como una medida del contenido de humedad, el contenido de humedad se calcula como fracción en volumen, (NTE INEN-ISO 11461, 2014, p.5)

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

Fuente: (NTE INEN-ISO 11461, 2014, p.6)

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.6)

$$\%HUMEDAD = 100 - \%SS$$

2.9.3. Determinación de cenizas

Para obtener el porcentaje de cenizas se emplea la fórmula utilizada por (Dueñas, 2012, p.82), el cual cita a la norma peruana (NTE 0.544 2006).

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

Fuente: Norma Peruana (NTE 0.544, 2006)

Realizado por: (Dueñas, 2012, p.83).

Donde

- %C = Contenido de cenizas en porcentaje de masa.
- w = Masa de la cápsula vacía en g
- CC = Masa de la cápsula con la muestra después de la incineración en g
- CS = Masa de la cápsula con muestra antes de la incineración en g (Dueñas, 2012, p.83)

Procedimiento

Se toma crisoles de porcelana de 50 ml, se los etiqueta y se los pesa en la balanza analítica, después se anota el peso con 2 cifras significativas en Peso crisol, lo cual se procede a aforar el crisol con la muestra húmeda y se anota el valor con 2 cifras significativas en Peso crisol + muestra, a continuación se introduce los crisoles en la mufla automática, se programa la mufla a 500 °C durante un periodo de 4 horas, para que 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 (Cano, 2016, p.32) citado por (Tobar, 2015, p.14).

2.9.4. Para la determinación de la materia orgánica.

Para obtener el porcentaje de materia orgánica se emplea la fórmula utilizada por (Andrades, Moliner y Masaguer, 2015; p 57) el cual cita a la norma mexicana (NMX-AA-21, 1985).

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

Fuente: (NMX-AA-21, 1985),

Realizado por: (Andrades, Moliner y Masaguer, 2015, p.57)

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, Moliner y Masaguer, 2015, p.57).

Procedimiento

En primer lugar, se secan tres crisoles, previamente numerados en su base con lápiz de grafito, en un horno de mufla a 400°C durante dos horas, transcurrido este período de tiempo, cuando la

mufla se puede abrir, usando guantes resistentes a la temperatura y pinzas, se sacan los crisoles y se dejan en un desecador hasta que alcanzan temperatura ambiente.

Seguidamente, se pesan los crisoles vacíos (M₀) en una balanza de precisión de 0,1 mg y se anotan los resultados. Se pesan aproximadamente 2 gramos de suelo seco al aire en cada crisol, y se anotan de nuevo los datos obtenidos (M₀₁), se introducen los crisoles con las muestras de suelo en el horno mufla y se programa la siguiente curva de temperaturas para alcanzar los 400°C de forma escalonada: 15 minutos 100°C, 15 minutos 200°C, 15 min 300°C y, finalmente, 4 horas a 400°C, finalizado el programa, se dejan los crisoles en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. Finalmente se realiza una nueva pesada (M₂) de los crisoles en la balanza de precisión de 0,1 mg (Andrades, Moliner y Masaguer, 2015, p.57)

Otro método para la determinación de Materia orgánica es 100-% cenizas

2.9.5. Determinación de nitrógeno

Para la determinación de nitrógeno se utilizará el método Kjeldahl, aunque este método es muy utilizado para determinar proteína en alimentos también es muy utilizado para nitrógeno. Para obtener el porcentaje nitrógeno se emplea la fórmula utilizada por (Andrades, Moliner y Masaguer, 2015, p.73), el cual citada a la norma mexicana (NOM-021-RECNAT-2002).

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

Fuente: (Andrades, Moliner y Masaguer, 2015, p.73)

Donde

- T= ml del HCL en valoración de la muestra
- B= ml del HCL en valoración del blanco
- N= Normalidad del valor
- W= peso de la muestra mg. (Andrades, Moliner y Masaguer, 2015, p.73)

Procedimiento

Moler la muestra usando un molino de laboratorio adecuado. Asegurar una molida precisa, pasando a través de un tamiz de 0,14 mm la tierra. Mezclar el material tamizado antes de analizar. Pesar de 1.0 - 2.0 g (Andrades, Moliner y Masaguer, 2015, p.72).

Añadir 2 pastillas catalizadoras Kjeldahl. Añadir 12 ml de H₂SO₄. Agitar suavemente para humedecer la muestra. Colocar el aspirador y encenderlo. Digerir durante 60 minutos, y en caso de salir espumas añadir 2 o 3 gotas de octanol o una emulsión anti espuma, quitar la gradilla con el tubo y dejar enfriar 15 minutos, precalentar el bloque digestor a 420°C y ajustar los tubos y observar que a los 5 minutos de estar a pleno rendimiento sale humo (Andrades, Moliner y Masaguer, 2015, p.72).

En algunos sistemas parte o todo se realiza automáticamente, diluir la digestión enfriada con 75 ml de agua destilada. Añadir 25 ml de la disolución receptora en el matraz correspondiente, añadir 50 ml de NaOH al 40 % para basificar la digestión, dejar que la reacción se lleve a cabo lentamente, destilar durante el tiempo descrito y valorar el destilado con un compuesto estandarizado (HCl 0,1 N), la normalidad de este compuesto debe darse con 4 decimales, hacer un blanco antes de cada grupo de muestras (Andrades, Moliner y Masaguer, 2015, p.72).

2.9.6. Cuantificación de minerales (Magnesio)

Para realizar el análisis de suelos se usó la metodología que se establece en el manual de instrucciones del Fotómetro multiparamétrico para análisis de nutrientes HI83325

Se procede a seleccionar el método de análisis de magnesio, se agrega 1 ml del reactivo A de magnesio HI93752A-Mg en una celda usando una jeringuilla, posteriormente se utiliza un pipeteador para completar los 10 ml con el reactivo B de magnesio HI93752B-Mg, se cierra la celda con el tapón y la tapa y se mezcla, después se inserta la celda en el espectrofotómetro y se encera. Se retira la celda y se agrega 0.5 ml de la muestra usando una jeringuilla, se tapa la celda y se mezcla, finalmente se inserta nuevamente la celda en el espectrofotómetro se presiona en tiempo y se espera 15 segundos y se procede a dar lectura (HANNA INSTRUMENTS, 2021, p.53).

2.9.7. Cuantificación de minerales (Nitratos)

Se procede a seleccionar el método de análisis de Nitratos, se agrega 10 ml de muestra en la celda y se agrega el tapón y la tapa, se inserta la celda en el espectrofotómetro y se encera, después se retira la celda y se agrega un sobre del reactivo de nitrato HI93728-0, se tapa y se mezcla la solución, se realiza dos mezclas la primera con movimientos de arriba abajo por 10 segundos, y la otra por 50 segundos con movimientos envolventes y Finalmente se inserta en el espectrofotómetro y se presiona en tiempo y se espera 4 minutos con 30 segundos y se procede a leer (HANNA INSTRUMENTS, 2021, p.59).

2.9.8. Cuantificación de minerales (Potasio)

Se selecciona el método de determinación de potasio. En la celda se pone 10 ml de las muestras, posteriormente se agrega 6 gotas del reactivo A de potasio HI93750A-0 se tapa y se mezcla, se inserta la celda en el espectrofotómetro y se procede a encerrar, después se retira la celda y se agrega un paquete del reactivo B de potasio HI93750B-0 se tapa y se mezcla por un minuto y Finalmente se inserta la celda con la solución y se presiona en tiempo, y se espera por 3 minutos y se procede a dar lectura (HANNA INSTRUMENTS, 2021, p.49).

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Ubicación de los puntos de muestreo en Alao Pungala

Tabla 1-3: Ubicación de los puntos de muestreo en Alao Pungala

Identificación de la muestra	COORDENADAS		ALTITUD	EXACTITUD
	E	N		
Muestra 01	-78.492908	-1.885844	3277 m	10 m
Muestra 02	-78.494447	-1.887668	3276 m	10.5 m
Muestra 03	-78.495698	-1.885158	3275m	10 m
Muestra 04	-78.497377	-1.887263	3272m	10.5 m
Muestra 05	-78.498751	-1.885253	3270m	10 m

Realizado por: Duchi B, 2022

3.2. Bacterias Acido Lácticas

3.2.1. Identificación morfológica de las Bacterias Acido Lácticas.

Las características morfológicas de 6 especies identificadas de BAL, que involucran el color, tamaño, forma, se muestran en la tabla 2-3

Tabla 2-3: Morfología de las especies aisladas de BAL

# ESPECIE	FORMA	COLOR	SUPERFICIE
1	Circular	Crema	Cóncavo
2	Irregular	Blanca	Cóncavo
3	Irregular	Crema	Liza
4	Irregular	Crema	Convexo
5	Circular	Crema	Liza
6	Irregular	Blanca	Convexo

Realizado por: Duchi B, 2022

De lo observado la especie 1 tuvo una forma circular, color crema y superficie cóncava; la especie 2 de forma irregular, de color blanco y superficie cóncavo; registrándose similares características de esta última especie, para las especies 3,4,5,6 en cuanto a su forma y color, mientras que varían en su superficie. Los resultados de la presente investigación son similares a los reportados por (Cortez, Rodrigo & Aranguren, 2014, pp.5-6), y (Ortiz, 2006, p.45) en su estudio sobre aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de productos lácteos, el cual describe color crema o blanco; forma circular, irregular o puntiforme y superficie convexa o cóncava.

3.2.2. Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas de Bacterias ácido Lácticas

En la identificación bioquímica realizada en el Laboratorio de Ciencias biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias se obtuvieron los siguientes resultados como se describe en la tabla 3-3

Tabla 3-3: Identificación bioquímica de especies aisladas BAL

ESPECIE	TINCIÓN	CATALASA	OXIDASA	K(OH)
1		+	-	-
2		+	-	-
3		+	-	-
4		+	-	-
5		+	+	-
6		+	-	-

Realizado por: Duchi B, 2022

De las 6 especies de BAL identificadas, fueron en su totalidad Gram positivas, de acuerdo a las pruebas bioquímicas básicas realizadas, las especies 1, 2, 3, 4, 6; dieron negativo a oxidasa y catalasa a excepción de la especie 5, que resultó la prueba positiva. Resultados similares a los registrados por (Almeida, 2017, p.28) citado por (Vargas, 2018, p.57), en su investigación sobre evaluación microbiológica del queso en Latacunga, lo cual es importante resaltar para que una bacteria sea considerada ácido láctica debe ser Gram positiva y las pruebas para catalasa y oxidasa deben ser negativas.

En relación a la prueba hidróxido de potasio, las especies 1, 2, 3, 4, 5 y 6, la reacción fue negativa, Con el que concuerdan por el criterio de (Latorre, 2011, p.28) y (Almeida, 2017, p.28), que consideran

que estas cepas sean considerados Gram positivas debe ser negativo a esta reacción, de acuerdo en su investigación titulada caracterización bioquímica y tecnológica de cepas ácido lácticas De igual manera, (Sánchez y Ochoa, 2016, p.8) luego de realizar su investigación sobre Identificación de *lactobacillus* en el tracto digestivo de un cerdo, manifiestan que las bacterias ácido lácticas deben teñirse de azul, para que puedan ser consideradas como tal, criterio similar a lo encontrado en la presente investigación.

3.2.3. Prueba de movilidad.

En la prueba realizada sobre la movilidad todas las bacterias ácido lácticas no presentaron turbidez en el medio semisólido (SIM) a excepción de la quinta especie. De acuerdo al estudio realizado por (Chasy, 2015, p.28), no encontró turbidez al aislar BAL, lo cual coincide con el resultado de la presente investigación. Siendo un indicador la ausencia de turbidez para que sea considerada como BAL.

3.2.4. Prueba de fermentación de azúcares

La prueba de fermentación de azúcares ayuda a la identificación de las especies de Bacterias ácido Lácticas que pueden existir en el suelo de bosque primario de Pungala (Alao), las cuales pasaron todas las pruebas anteriores de oxidasa, catalasa y movilidad a excepción de la especie 5, descartándolo para este tipo de prueba y así la especie 6 se lo añadió como la cepa quinta. Obteniéndose los siguientes resultados como se describe en la tabla 4-3

Tabla 4-3: Resultados de la prueba de fermentación de azúcares

ESPECIE	GLUCOSA	FRUCTOSA	LACTOSA	MANITOL	MALTOSA	SIM
1. <i>L. curvatus</i>	+	+	-	-	+	-
2. <i>L. raffinolactis</i>	+	+	+	+	+	-
3. <i>B. angalatum</i>	-	+	+	-	+	-
4. <i>E. faecium</i>	+	+	+	-	+	-
5. <i>L. plantarum</i>	+	+	+	+	+	-

Realizado por: Duchi B, 2022

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de fermentación de azúcares; la especie 1 proporcionó resultados positivos a las reacciones de fructosa, maltosa, glucosa y negativo a manitol y lactosa, por lo que se presume que corresponde a *Lactobacillus curvatus*, de acuerdo a los resultados obtenidos por (García, 2007, p.70), (Huang et al., 2020, p.3) y (Ahmad et al., 2018, p.3), en su investigación sobre la Identificación de Bacterias ácido lácticas y *Lactobacillus*; la especie 2 dio positivo a los sustratos de lactosa, maltosa, glucosa, fructosa y manitol, posiblemente corresponda al género de *Lactococcus raffinolactis*; concordando con los resultados realizados por (García, 2007, p.70) y (Coman et al., 2019, p.1252), en su estudio sobre fermentación de carbohidratos con bacterias; la especie 3 negativo a glucosa y manitol y positivo a fructosa, lactosa y maltosa, lo cual se sospecha que pertenezca a *Bifidobacterium angulatum*; siendo también resultados similares a los reportados por (García, 2007, p.70) y (Coman et al., 2019, p.1252); la especie 4, positivos a lactosa, fructosa, maltosa y glucosa, y negativo a manitol, por lo que se presume que corresponda a *Enterococcus faecium*; concordando con los resultados obtenidos por (Salazar et al., 2010, p.60) y (Huang et al., 2020, p.3); especie 5, positivos a los sustratos como la lactosa, fructosa, maltosa, glucosa y manitol, posiblemente corresponda al género de *Lactobacillus plantarum*, por lo que coincide con los resultados encontrados por, (Peralta, 2014, p.47), y (Ahmad et al., 2018, p.3), en su estudio sobre Identificación de *lactobacillus*.

3.3. Bacterias Acéticas.

3.3.1. Identificación Morfológica de las Bacterias Acéticas.

Las características morfológicas de 2 especies identificadas de BA, que involucran el color, tamaño, forma, se muestran en la tabla 5-3

Tabla 5-3: Morfología de las especies aisladas de *Bacterias acéticas*

# ESPECIE	FORMA	COLOR	SUPERFICIE
6	Circular	Crema-blanco	Lisa brillante
7	Irregular	Beige	Lisa brillante

Realizado por: Duchi B, 2022

De lo observado la especie 6 tuvo una forma circular, de color crema-blanco y superficie brillante, la especie 7 posee una forma irregular de color beige y con la misma superficie de la anterior; por lo que los resultados obtenidos de la presente investigación concuerdan con (Porcel, 1947, p.4), en

su estudio morfológico, fisiológico y bioquímico de bacterias acéticas, lo cual, afirma que para identificar morfológicamente a las bacterias Acéticas deben tener un color crema o blanco, formas alargadas, filamentosas, puntiforme o irregular y superficies lisas. (con ramificaciones).

3.3.2. Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas

En la identificación bioquímica realizada en el Laboratorio de Ciencias biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias se obtuvieron los siguientes resultados como se describe en la tabla 6-3.

Tabla 6-3: Identificación bioquímica de especies aisladas de *Bacterias acéticas*

# ESPECIE	TINCIÓN	CATALASA	OXIDASA
6	-	+	-
7	-	+	-

Realizado por: Duchi B, 2022

De las 2 especies de BA identificadas, fueron Gram negativas, de acuerdo a las pruebas bioquímicas básicas realizadas, las especies 6 y 7; dieron negativo a oxidasa y positivo a catalasa. Resultados similares a los registrados por (Salazar, 2017, p.4). En su trabajo de titulación sobre Aislamiento y caracterización de microorganismos, lo cual para que sea considerada bacteria acética debe ser catalasa positiva, oxidasa negativa y Gram negativo.

3.3.3. Prueba de fermentación de azúcares de las BA

La prueba de fermentación de azúcares ayuda a la identificación de las especies de Bacterias Acéticas que existe en el suelo de bosque primario de Pungala (Alao) las cuales pasaron las pruebas anteriores de oxidasa, catalasa, y tinción gran obteniéndose los siguientes resultados como se describe en la tabla 7-3.

Tabla 7-3: Pruebas bioquímicas en B. Acéticas Fermentación de azúcares

# ESPECIE	GLUCOSA	FRUCTOSA	LACTOSA	DEXTROSA	H2S
6	+	+	-	-	-
7	+	+	-	-	-

Realizado por: Duchi B, 2022

De acuerdo a los resultados conseguidos en la prueba de fermentación de azúcares, las especies 6 y 7 proporcionaron resultados positivos a los sustratos como la glucosa, fructosa, y negativo a dextrosa y ácido sulfhídrico, siendo resultados similares a los obtenidos por (Salazar, 2017, p.66), en su estudio realizado sobre caracterización de microorganismos, los cuales tanto la especie 6 como la especie 7 posiblemente pueden pertenecer al género *A. ghanensis*, *A. oeni*, y *A. aceti*.

3.4. Levaduras.

3.4.1. Identificación Morfológica de Levaduras.

Las características morfológicas de 2 especies identificadas de Levaduras, que involucran el color, tamaño, forma, superficie, se muestran en la tabla 8-3

Tabla 8-3: Morfología de las especies aisladas de levaduras

# ESPECIE	FORMA	COLOR	SUPERFICIE
8	Circular	blanco	Lisa
9	Irregular	Crema	Lisa

Realizado por: Duchi B, 2022

De lo observado la especie 8 posee una forma circular, de color blanco y superficie lisa, mientras que la especie 9 con una forma irregular, de color beige y superficie lisa, resultados que son similares a los reportados por (ECUARED, 2007, p.5) y (Salazar, 2017, p.34); En su trabajo de titulación sobre aislamiento y caracterización de microorganismos. Para indicar que las levaduras morfológicamente deben tener un color crema o blanco, forma circular u ovoide, piriforme, cilíndrica, e incluso alargada, irregular, con superficie lisa.

3.4.2. Pruebas Bioquímicas de las especies aisladas

La identificación bioquímica de levaduras estudiadas se muestra en la tabla 9-3.

Tabla 9-3: Pruebas bioquímicas en Levaduras Caldo YPD

ESPECIE	24 H		48 H	
	FERMENTACIÓN	pH.	FERMENTACIÓN	pH.
8	Presencia	5	Presencia	5
9	Presencia	5	Presencia	4,5

Realizado por: Duchi B, 2022

La identificación bioquímica de las levaduras estudiadas se muestra en la tabla 9-3; la cual revela que para la especie 8 y 9 dio una reacción positiva a la fermentación ya que medio se tornó amarillo claro, con un pH de 5 y 4.5. Resultados que concuerdan con los reportados por (Orellana, 2021, p.67) y (Salazar, 2017, p.34), en su estudio sobre fermentación de levaduras extraídas de una fruta. De acuerdo a las reacciones producidas se estima que el género es *Saccharomyces*.

3.4.3. Prueba de fermentación de azúcares de levaduras

Tabla 10-3: Pruebas bioquímicas de levaduras en Fermentación de azúcares

ESPECIE	GLUCOSA	FRUCTOSA	LACTOSA	DEXTROSA	H2S
8	+	+	-	+	-
9	+	+	-	+	-

Realizado por: Duchi B, 2022

De acuerdo a los resultados revelados en la tabla 10-3, la especie de levadura 8 y 9 tuvieron una reacción positiva a glucosa, fructosa, dextrosa, pero negativa para lactosa y ácido sulfhídrico. Resultados similares a los obtenidos por (Arias et al., 2019, p.52), en su estudio realizado sobre identificación morfológica, fisiológica y molecular de levaduras, por lo que la especie 8, como la especie 9 probablemente pertenezcan a los géneros de *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus* y *S. carisbergensi*.

3.5. Análisis físicos químicos del suelo

Tabla 11-3: Estadística descriptiva del suelo del bosque primario de Pungala Alao

	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MÍNIMO	MÁXIMO
pH	6,94	± 0.14	6.74	7.2
Humedad %	9,30	± 1.05	8.11	12.24
Cenizas %	90,82	± 1.10	87.73	92.46
Materia Orgánica %	9,17	± 1.10	7.53	12.26
Nitrógeno %	0,22	± 0.09	0.06	0.37
Nitratos (mg/L)	3,23	± 1.16	1.90	5.30
Potasio (mg/L)	1,25	± 0.96	0.50	3.20
Magnesio (mg/L)	42,20	± 8.89	27	56

Realizado por: Duchi B, 2022

3.5.1. pH

De acuerdo a lo que indica la tabla 11-3, el pH del suelo de bosque primario de la Parroquia Pungala posee un valor de 6,94 \pm 0,144, registrándose variaciones de 6.72 a 7.2, lo cual se considera una concentración neutra según lo manifestado por la (FAO y MAG, 2013, p.23). Resultados similares a los encontrados en los estudios realizados por (Milagro, 2019, p.46), (6,6 a 7,3) en suelos de bosques, y (Patiño, 2018, p.40), (6.87) en un suelo de bosque primario de Palictahua por lo tanto se consideran pH neutros.

3.5.2. Humedad

De acuerdo a los análisis físicos químicos del suelo de bosque primario de Pungala, posee una humedad de 9,30%, \pm 1.05, registrándose variaciones de 8.11 a 12.24, como lo pueden apreciar en la tabla 11-3. Determinándose que estos valores son inferiores a los reportados por (Amaguaya, 2015, p.65), en un estudio realizado en un suelo de bosque primario en Alausí, el cual identificó un porcentaje de 52,72, esto debido posiblemente a que la humedad relativa es diferente y por el tipo de suelo, ya que el suelo de Alao Pungala es arenoso a diferencia del suelo de Alausí que es franco limosa.

3.5.3. Cenizas

Con lo referente al análisis de cenizas se obtuvo un valor de 90.82%, $\pm 1,10$. variando de 92.46 a 87.63, como lo revela la tabla 11-3, el cual comparando los resultados obtenidos en la presente investigación con el estudio realizado por (Allauca, 2022, p.61) en su investigación elaborado en un suelo de bosque primario en el cantón Baños obtuvo un porcentaje de cenizas de 22.12%, sin embargo, en otra investigación realizada en un bosque primario del cantón Cumandá por (Delgado, 2022, p.57) identifico un 50% de cenizas con lo que se aproxima con la investigación realizada en el bosque de Pungala Alao.

El porcentaje de cenizas fue elevado, posiblemente por la presencia de minerales (oro), encontrado en las muestras del suelo al momento de la calcinación y a altas temperaturas en la mufla a 550°C.

3.5.4. Materia orgánica

De acuerdo a lo que indica la tabla 11-3. la cantidad de materia orgánica fue de 9,17%, $\pm 1,10$. registrándose diferenciaciones de 12.26 a 7.43, que se considera una concentración alta, por lo manifestado por la (FAO y MAG, 2013, p.19), donde afirman que mayor de 3% es alto en Materia Orgánica, mientras que es inferior al reportado por (Amaguaya, 2015, p.62), en su estudio en bosques primario en Alausí. ya que obtuvo un 22.20%, esto probablemente por los diferentes tipos de suelo.

3.5.5. Nitrógeno

La cantidad de nitrógeno encontrado en el presente estudio fue de 0,23% $\pm 0,09$, de acuerdo a lo que indica la tabla 11-3, que se considera una concentración media; de acuerdo a lo manifestado por (FAO y MAG, 2013, p.19) que considera que valores 0,15 al 0,25%, son rangos medios; mientras que son valores superiores a los reportados por (Quinto, 2016, p.64) en su estudio realizado en un bosque primario en Perú que obtuvo un 0.17%, esto debido a la presencia de materia orgánica en concentraciones elevadas.

3.5.6. Nitratos

Con los datos obtenidos se verifico que los nitratos del suelo en estudio poseen un valor de 3,23 mg/L $\pm 1,15$ registrándose variaciones de 0.90 a 5.30, de acuerdo a lo que indica la tabla 11-3. En cuanto a la cantidad de nitratos encontrados en el presente estudio, se ratificó que los datos

obtenidos concuerdan con la investigación realizada por (Guzmán, 2015, p.45) que afirma que la cantidad de nitratos NO_3^- encontrados en el suelo del bosque de encino en México presentó una concentración de 5,77 mg/Kg, siendo similar al dato obtenido en el bosque primario de Pungala.

3.5.7. Potasio

Con los estudios realizados se logró identificar que la cantidad de potasio existente en el suelo de bosque primario de Pungala es de 1,25 mg/L, ± 0.96 registrándose diversificaciones de 0.50 a 3.20 como lo pueden apreciar en la tabla 11-3, la cantidad de potasio encontrado en el presente trabajo tiene similitud con los datos obtenidos por (Herrera, 2016, p.61), en su estudio realizado sobre suelos que encontró una cantidad de 4,5 mg/L.

3.5.8. Magnesio

En cuanto a la cantidad de magnesio obtenido en el suelo de bosque primario de Pungala adquirió una cantidad de 42,20 mg/L, ± 8.89 variando de 27 y 56, tal como se les puede apreciar en la tabla 11-3, en cuanto a la cantidad de magnesio encontrado no concuerda con estudio realizado en un suelo de bosque primario del Recinto de JAUNECHÉ” por (Herrera, 2016, p.66) que fue de 143 mg/L, lo que significa que el bosque primario de Pungala Alao posee una cantidad baja de este tipo de mineral, esto posiblemente por una mayor cantidad de minerales encontrados en el suelo.

CONCLUSIONES

Al aislar bacterias ácido lácticas, acéticas y levaduras, mediante las pruebas bioquímicas se hallaron que las BAL dieron positivos, a tinción Gram, y negativos a oxidasa, catalasa; las bacterias acéticas positivo a catalasa, pero negativo a oxidasa y tinción Gram, y las levaduras positivo para caldo YPD, por lo que considera que cada una de las especies aisladas son del género ya antes mencionado.

Al realizar la identificación de las especies aisladas, se concluye que las Bacterias ácido lácticas pueden pertenecer al género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, las BA al género *Acetobacter* y Levaduras al género *Saccharomyces*, por la prueba de fermentación de azúcares antes realizada que los identifican a los géneros ya antes indicados.

De acuerdo a los análisis físicos químicos del suelo de bosque primario de Pungala se registraron un pH de 6.94, humedad higroscópica de 9,30%, cenizas 90.36%, materia orgánica 9.30%, nitrógeno 0.23%, nitratos 3,23 mg/L, potasio 1,25 mg/L, y magnesio 42,20 mg/L por lo que significa que el suelo de bosque Primario de Pungala posee un rango elevado de minerales, de acuerdo a lo que establece la FAO en bosques de la Republica de Paraguay.

RECOMENDACIONES

Con el afán de haber una mayor exactitud en cuanto a las pruebas bioquímicas de las especies aisladas en el suelo de bosque primario de Pungala Alao, se propone la utilización de pruebas API CHL 50 específica para los microorganismos aislados, o la utilización de un PCR, o un agar específico, los cuales ayudarían con más exactitud a una mejor identificación.

Realizar este tipo de investigación en otros tipos de bosques que no sean Primarios para determinar la existencia de una mayor cantidad de microorganismos benéficos útiles en la biotecnología y Agroindustria. Se debería realizar con los microorganismos aislados más pruebas de uso alimentario para conocer a fondo si son de uso Agroindustrial alimentaria o no.

BIBLIOGRAFÍA

AGUIRRE, IÑAK; ALBELDA, JOSÉ ; CASAUPÉ, CARMEN; ESCRIHUELA, ANNA & GARCÍA, JULI. Un paseo didáctico por los bosques primarios GREENPEACE. *Escuelas Amigas de los Bosques. Guía de recursos didácticos, Greenpeace., 2007* [En línea]. <http://archivo-es.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/bosques/un-paseo-didactico-por-los-bos.pdf>.

AHMAD, M.S., ZARGAR, M., MIR, S., BHAT, N., BABA, Z., KANT, R., HABIB, DAR, Z.M., KHAN, I.J. & BANDEY, S. Morphological and Biochemical Studies For The Identification of *Lactobacillus plantarum* sp. nov., and *Lactobacillus fermentum* sp. nov., From Municipal Waste. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2018. vol. 7, no. 5, pp. 1421-1424. ISSN 2278-4136. DOI 10.13140/RG.2.2.13721.06240.

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

AMAGUAYA, J. Determinación de carbono en el suelo de bosque nativo de Ceja Andina en el sector Guangra, Parroquia Achupallas, Cantón Alausí, Provincia de Chimborazo [en línea]. (Trabajo de Titulación).: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2015 pp 46 Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3883/1/33T0135.pdf>.

ANDRADES, M., MOLINER, A. & MASAGUER, A. Prácticas de edafología : métodos didácticos para análisis de suelos. Material didáctico. Agricultura y alimentación [en línea], 2015 vol. 15, no. 7, pp. 57. Disponible en: [file:///C:/Users/USER/Downloads/Dialnet-PracticasDeEdafologia-580696\(5\).pdf](file:///C:/Users/USER/Downloads/Dialnet-PracticasDeEdafologia-580696(5).pdf).

ARELLANO, D.V. & YAMBAY, C.R. Caracterización de cepas bacterianas aisladas a partir de suelos, con potencial para degradar PCB's presentes en aceites dieléctricos provenientes de la Central Hidroeléctrica "Alao" de la Empresa Eléctrica Riobamba S.A [en línea].trabajo de titulación S.l.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo 2016 pp 67-68 Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4955>.

ARIAS, A., BARRIOS, A., SIMONSEN, E. & TEJADA, S. Identificación morfológica, fisiológica y molecular de levaduras del género *Saccharomyces* para la elaboración de cerveza. *Mente Joven* [en línea], 2019 vol. 8, pp. 61. Disponible en: https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/mente_joven/article/view/7554.

ATLAS, R. & BARTHA, R. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 2002 Madrid

BASTIDAS, J. Evaluación de un proceso de fermentación con microorganismos de montaña, como postratamiento para efluente producido en un biodigestor anaerobio [en línea]. Trabajo de titulación.: Universidad Central del Ecuador. 2019 pp 34-47 Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/20563/1/T-UCE-0012-FIG-175.pdf>.

BELSKY, R., AMUNDSON, J., DUXBURY, S., RIHA, A. & MWONGA, A. The Effects of Trees on Their Physical, Chemical and Biological Environments in a Semi-Arid Savanna in Kenya. *Special Publication Number 35* 2009 Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/2403708>.

BERTSIOA, E. & DEPARTAMENTO DE DESARROLLO ECONÓMICO, S. M.A. Medio Ambiente Suelo. [Consulta: *Noviembre* 2021]. Disponible en: <https://www.euskadi.eus/informacion/suelo/web01-a2inglur/es/>.

BORGES, J., BARRIOS, M., ESPARTACO, S., YANIRETH, B. & MÁRQUEZ, O. No Características físico-químicas del suelo y su asociación con macroelementos en áreas destinadas a pastoreo en el estado Yaracuy. 2012 BIOAGRO, 1-2. Title. , vol. 24.

CALDEROLI, P. Análisis de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo aplicando procedimientos metagenómicos (Tesis Doctoral).: Universidad Nacional de la Plata. 2016 pp 176-180 Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/52022/Documento_completo___.pdf?sequence=3&isAllowed=y.

CALVO, P., REYMUNDO, L. & ZÚÑIGA, D. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada* [en línea], 2008. vol. 7, no. 1-2, pp. 141. ISSN 1726-2216. DOI 10.21704/rea.v7i1-2.369. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v7n1-2/a17v7n1-2.pdf>.

CALVO, P. & ZÚÑIGA, D. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada* (2010) vol. 9, pp. 31-39. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172622162010000100004&script=sci_arttext&tln g=en.

CAMACHO, O. Caracterización y evaluación de bacterias para producción de bioplástico de origen microbiano utilizando como sustrato agua residual de la industria láctea, en el 2015 [en línea]. (Trabajo de titulación).S.l.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2016. pp. 45-67 Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4962>.

CANO, L. Cuantificación del porcentaje de humedad y cenizas contenidos en los residuos sólidos urbanos del distrito metropolitano de Quito año 2015-2016 [en línea]. (Trabajo de titulación) S.l.: Universidad Internacional SEK. 2016. pp. 45-49 Disponible en: [https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/2364/3/Mauricio Garces_Tesis_Cuantificación del %20Humedad y Cenizas de los RSU del DMQ 2015-2016.pdf](https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/2364/3/Mauricio%20Garces_Tesis_Cuantificaci3n%20del%20Humedad%20y%20Cenizas%20de%20los%20RSU%20del%20DMQ%202015-2016.pdf).

CHASY, W.F. Aislamiento de microorganismos probióticos del tracto intestinal de Gallus gallus en tres estadios fisiológicos de pollos” [en línea]. (Trabajo de titulación) S.l.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2015. pp. 23-24 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.056><https://academic.oup.com/bioinformatics/article-abstract/34/13/2201/4852827><http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2013.02.005><http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2013.02.005>

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.

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

CORRIGAN, B. Acetobacter aceti. [consultado en Abril 2021]. 2009 Disponible en: <https://eol.org/pages/976494/articles>.

CORTEZ, RODRIGO & ARANGUREN, A. Aislamiento e identificación de bacterias ácido láctico del género Lactobacillus spp a partir de heces de perros (Canis Lupus Falmiliaris) mestizos lactantes. *Rvsp*, 2014. vol. 19, pp. 5-10.

DEL, A.I. & NATURAL, M. Inclusión de subproductos de pulpa de cítricos en dietas de cerdos de cebo: rendimientos productivos y estudio de la salud intestinal. (Tesis doctoral) Universidad Politécnica de Valencia pp. 12, 2020. Disponible: en <http://hdl.handle.net/10251/150936>.

DELGADO, M. Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal Inngeniante.com. [Consultado en Mayo 2021]. 2019 Disponible en: https://oriusbiotech.com/escrito?nom=Los_microorganismos_del_suelo_en_la_nutrición_vegetal.

DICKINSON, B. Procedimientos de control de calidad BBL TSI agar slants. Octubre 2015 [Consultado en Mayo 2021]. 2015 Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22772#:~:text=La cantidad pequeña de ácido,cambie a un pH alcalino.>

DUEÑAS, D. Cuantificación del porcentaje de humedad y porcentaje de cenizas contenido en los residuos sólidos urbano del Distrito metropolitano de Quito. S.l.: [en línea]. (Trabajo de titulación) Universidad Internacional SEK 2012 pp 23.

ECUARED. Levadura. [Consultado en Mayo 2021]. 2007. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Levadura>.

ENRÍQUEZ, J., VIERA, J. & MENDOZA, F. Caracterización preliminar de aislamiento de microorganismos mediante la técnica de E . M ., a nivel de comunidades vegetales en dos zonas de vida ecológicamente diferentes ” [en línea]. (Trabajo de titulación) S.l.: Escuela Superior Politecnica del Litoral. 2010 pp. 12 Disponible en: [https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/9017/1/Caracterización preliminar de aislamiento de microorganismos.pdf](https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/9017/1/Caracterización_preliminar_de_aislamiento_de_microorganismos.pdf).

ESCALONA, M. Microorganismos efectivos: su extracción y uso. 2015 [en línea]. Disponible en: <https://www.uv.mx/personal/asuarez/files/2011/02/Microorganismos-efectivos.pdf>.

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

FENCHEL, T. & KÜHL, M. Artificial cyanobacterial mats: Growth, structure, and vertical zonation patterns. *Microbial Ecology*, 2000 vol. 40, no. 2, pp. 85-93. ISSN 00953628. DOI 10.1007/s002480000062.

FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, C., SÁEZ, J.A. y VALDEZATE, S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En: E. Cercenado y R. Cantón (eds.), *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [en línea]. S.l.: s.n., 2010 pp. 8. ISBN 9788461479320. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.

FRANCISCO GALINDO MONTERO, V. Facultad de ciencia y tecnología. Google academico [en línea], pp. 111 pag. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/6858>.

GARCÍA, C., VÉLEZ, N., RITTER, N. & RESTREPO, N. Microorganismos eficientes del suelo [En línea]. Caldas Colombia. Mayo 2013 Disponible en: <https://microindustrialasalle.wordpress.com/>.

GARCÍA, G. Introducción a la edafología [en línea]. S.l.: (Master) Universidad de Sevilla. 2009 pp 65 Disponible en: <https://www.us.es/centros/departamentos/cristalografia-mineralogia-y-quimica-agricola>.

GARCÍA, J.A. Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación . [en línea]. S.l.: (Trabajo de titulación) Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. 2007 pp 34-48 Disponible en: http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/381/Identificacion_bioquimica.pdf?sequence=1.

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

GUZMÁN, C. La desnitrificación en un suelo forestal. “Pinal del Zamorano”, Querétaro [en línea]. S.l.: Centro de investigación y de estudios avanzados del IPN. 2015 pp. 45 Disponible en: <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1621/SSIT0013863.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

HANNA INSTRUMENTS. Multiparameter Photometer for Nutrient Analysis HI83325 INSTRUCTION MANUAL.. [Consultado en Marzo 2021]. 2021 Disponible en: <https://hannainst.com.au/mwdownloads/download/link/id/2407>.

HENRY, G. & HEINKE, G. Ingenieria-Ambiental_Glynn.Pdf [en línea]. 1999. S.l.: s.n. ISBN 970-17-0266-2. 1999. pp 12 Disponible en: https://www.u-cursos.cl/usuario/037b375d320373e6531ad8e4ad86968c/mi_blog/r/ingenieria-ambiental_glynn.pdf.

HERRERA, J. Erosión del suelo por fertilizantes de la agricultura convencional, efecto en el cultivo de maíz versus bosque primario en jauneche [en línea]. S.l.: (Trabajo de titulación) Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. 2016 pp 73 Disponible en: [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/11539/1/TESIS Danilo Herrera. CORRECCION FINAL.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/11539/1/TESIS%20Danilo%20Herrera.%20CORRECCION%20FINAL.pdf).

HUANG, J., ZHANG, W., HU, Z., LIU, Z., DU, T., DAI, Y. & XIONG, T. Isolation, characterization and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from feces of wild boar, native pig and commercial pig. *Livestock Science*, 2020 vol. 237, no. 235, pp. 104036. ISSN 18711413. DOI 10.1016/j.livsci.2020.104036.

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

JAMES, M., VELASTEGUI, E. & CRUZ, A. Evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* a nivel de laboratorio, con inulina como fuente de carbono. *Revista Bionatura* 2017. [en línea], pp. 11. Disponible en: <http://www.revistabionatura.com/2017.02.01.4.html>.

JANSSEN, P. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol* [en línea]. S.l.: s.n., 2006 pp. 1719-1728. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>.

JAURIXJE, M., TORRES, D., MENDOZA, B., HENRÍQUEZ, M. & CONTRERAS, J. Relación Con La Actividad Biológica Bajo Diferentes. *Biaogro* 2013 [en línea], vol. 25, pp. 47-56. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85726736002>.

LAL, R. Carbon management in agricultural soils. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change. 2007 S.l.: s.n.,

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.

MAIER, R., PEPPER, L. & GERBA, C. Earth environments. En Environmental microbiology [en línea]. Segunda. Oxford: s.n. 2009. ISBN 9780123705198. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123705198000043>.

MENDOZA, R. & ESPINOZA, A. Guía Técnica para muestreo de suelos. Universidad Nacional Agraria 2017 pp 39 [en línea]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/151729876.pdf> <http://repositorio.una.edu.ni/3613/1/P33M539.pdf>.

MENGUAL, M. El perfil del suelo y sus horizontes. [Consultado en Noviembre 2021]. 2013 Disponible en: <https://historia-vcenenario.wikispaces.com/file/view/El+perfil+del+suelo+y+sus+horizontes.pdf>.

MILAGRO. Clasificación PH del suelo. [Consultado en Diciembre 2021]. 2019 Disponible en: <https://www.subtil.net/es/view/0fc2d841-5b4e-4982-8f52-0f833b1429e7>.

MONCAYO, G. UNIDAD IV: ecología microbiana [en línea]. S.l.: s.n. ISBN 9788490225370. 2000 Disponible en: <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/unidad-4-ecologia.pdf>.

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

MORENO, J. & VELARDE, K. Aislamiento, caracterización y usos potenciales de microorganismos de tierra de montaña y subtrópico durante el periodo 2016 [en línea]. S.l.: (Trabajo de titulación) ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO. 2016 pp 35-65 Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6276/1/236T0245.pdf>.

NANNIPIERI, P. & ELDOR, P. Soil Biology and Biochemistry. 2006, vol. 41, no. 12.

NTE INEN-ISO 10390. *Calidad del suelo. Determinación del pH, Norma Técnica Ecuatoriana.* Enero 2014 [en línea]. Disponible en: https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_10390_extracto.pdf.

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

ORTIZ, M. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo [en línea]. S.I. (Trabajo de Titulación): Universidad Autónoma del estado de Hidalgo Instituto. 2006 pp 23 Disponible en: http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/381/Identificacion_bioquimica.pdf?sequence=1.

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

PATIÑO, B. Determinación de la biodiversidad microbiana de los Bosques Nativos Lluçud y Palictahua de la Provincia de Chimborazo [en línea]. S.I.: (Trabajo de Titulación): Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2018 pp 34-45 Disponible en: <http://dspace.espech.edu.ec/bitstream/123456789/8766/1/33T0188.pdf>.

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

PERALTA, L.P. Actividad antagónica de bacterias ácido lácticas aisladas de queso fresco artesanal frente a *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad nacional de San Antonio Abad del Cusco 2014 pp 34,

PEREIRA, C. NIA Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA Semana de la Ciencia y Tecnología Jornada de Puertas Abiertas. *Mayo* 2015 [en línea]. Disponible en: http://inia.uy/Documentos/Públicos/INIA_Tacuarembó/2015/El_Suelo_20_de_mayo.pdf.

PINO, F. Características de las bacterias. batnaga, 1. . S.I. 2012:

PNUMA & ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. El estado de los bosques del mundo 2020. [Consultado en Septiembre 2021]. 2020 Disponible en: <https://doi.org/10.4060/ca8642es>.

PORCEL, M. Estudio morfológico, fisiológico y bioquímico de bacterias acéticas [en línea] (Tesis doctoral). S.I.: Universidad de Buenos Aires Este. 1947 pp 13 Disponible en: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n0514_Porcel.pdf.

QUINTO, C. Propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo bajo la influencia de tres sistemas de uso de la tierra en el distrito José Crespo y Castillo, Leoncio Prado” [en línea]. S.I.: (Trabajo de titulación). Universidad Nacional Agraria de la Selva. 2016 pp. 34 Disponible en: https://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/1303/QCCE_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

RAFFINO, M. Microorganismos Consultado: 11 de mayo de 2021 <https://concepto.de/microorganismo/>

RODRIGUEZ, J. Muestreo y preparación de la muestra [Consultado el 20 Abril 2022]. S.I.: s.n. 2015 pp 44 Disponible en: <https://elibro.net/es/ereader/epoch/43107>.

RODRÍGUEZ, P.A. & ARENAS, R., Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Medica y Quirúrgica* [en línea], 2018 vol. 16, no. 2, pp. 166-167. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>.

RONDÓN, A., MILIÁN, G., SAMANIEGO, L., BOCOURT, R., LAURENCIO, M. & PÉREZ, M. Aditivos alimentarios sustituyentes de los antibióticos en la avicultura moderna. uso de las bacterias ácido lácticas como probióticos. *Monografías, Centro de Estudios Biotecnológicos*, Universidad de Matanzas, Cuba, 2008 vol. 2008, no. c.

ROS, M., RODRÍGUEZ, I., GARCÍA, C. & HERNÁNDEZ, T. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. [en línea], 2010 vol. 101, no. 18, pp. 6916-6923. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852410006401>.

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

SALAZAR, L. Aislamiento y caracterización de microorganismos durante el proceso de fermentación de Theobroma Cacao L. de la variedad «Chuncho» obtenida en Cuzco, Perú [en línea]. S.l.: (Trabajo de titulación) Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2017 pp 34-52 Disponible en: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/1436/Aislamiento_SalazarAlvarez_Lilian.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

SÁNCHEZ, H. & OCHOA, G. Molecular identification of lactobacilos of the digestive tract of piglet (*Sus scrofa domesticus*). *Manglar*, 2016 vol. 13, no. 1, pp. 3-16. ISSN 18167667. DOI 10.17268/manglar.2016.002.

SCHWEIZER, S. Muestreo y análisis de suelos para diagnóstico de fertilidad. San José, Costa Rica.: s.n. 2010 pp 67 ISBN 978-9968-586-08-5.

STATE OF THE TROPIC. Bosques primarios. [Consultado en Abril 2021]. 2010 Disponible en: <https://www.jcu.edu.au/state-of-the-tropics/publications/2014-state-of-the-tropics-report/spanish-versions/Insight-Primary-Forests-Spanish.pdf>.

TEJERA, B., HEYDRICH, M. & ROJAS, M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* [en línea], 2011 vol. 42, no. 3, pp. 131-138. ISSN 0253-5688. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>.

THORN, R. & LYNCH, M. Fungi and eukaryotic algae. In *Soil microbiology, ecology and biochemistry* [en línea]. Tercera. Oxford: s.n. 2007. pp 8 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008047514150010X>.

TOALOMBO, R. Evaluación de microorganismos eficientes autoctonos aplicados en el cultivo de cebolla blanca (*Allium fistulosum*) [en línea]. S.l.: (Trabajo de titulación) Universidad Técnica de Ambato. 2012 pp 56-67 Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/2217/1/Tesis-22agr.pdf>.

TOBAR, N. Determinación del porcentaje de cenizas y humedad contenido en los residuos sólidos Urbanos del Distrito Metropolitano de Quito [en línea]. S.l.: (Trabajo de titulación) Universidad Internacional SEK. 2015 pp 54-55 Disponible en: [https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/1741/1/PLAN DE INVESTIGACIÓN DE FIN DE CERRERA NATALIA TOBAR.pdf](https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/1741/1/PLAN%20DE%20INVESTIGACI%C3%93N%20DE%20FIN%20DE%20CERRERA%20NATALIA%20TOBAR.pdf).

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

UNC. Guía de actividades prácticas microbiología agrícola. [en línea]. 2015 Disponible en: <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/Guia-de-Trabajos-Practicos.pdf>.

URIBE, L., GUTIERREZ, C., QUEJADA, Y. & GRAJALES, N. Efecto del pH sobre el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Pseudomonas* sp. *Octubre* 2014 pp 34 Disponible en: <https://prezi.com/tkg1imjg0szk/efecto-del-ph-sobre-el-crecimiento-de-la-levadura-saccharomyces-cerevisiae-y-pseudomonas-sp/>.

VALERO, J. & SALAS, C. Selección de prácticas Silviculturales para bosques tropicales, *Manuak Técnico*. . Santa Cruz- Bolivia: 1997.

VALLADARES, J.C. Elementos requeridos para un diagnóstico de Laboratorio. [Consultado en Abril 2021]. 2010 Disponible en: <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/elementos-requeridos-diagnostico-laboratorio-t28363.htm>.

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

VELÁSQUEZ, L. & ALEMÁN, A. Elaboración de vinagre a partir de chirimoya (*annona cherimola* mill) que se produce en la zona de Urcuquí [en línea]. (Trabajo de titulación) S.l.: Universidad Técnica del Norte. 2014 Disponible en: [http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/2686/2/03 EIA 350 artículo científico.pdf](http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/2686/2/03%20EIA%20350%20art%C3%ADculo%20cient%C3%ADfico.pdf).

VORONEY, R. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Academic Press, Elsevier. 2007,

YURKOV, A., KEMLER, M. y BEGEROW, D. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *fungus ecology* [en línea], 2012 vol. 5, no. 1, pp. 24-35. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1754504811000754>.


DBRA
Ing. Esteban Castillo



ANEXOS

ANEXO A: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR MRS

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

ANEXO B: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO MRS

Composición		Instrucciones
Proteasa peptona	10,0g	1. Suspender 55,15 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
Extracto de carne	10,0g	
Extracto de levadura	5,0g	
Dextrosa	20,0 g	
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 C: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR ACETOBACTER GLUCOSA

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

ANEXO D: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR SABORAU DEXTROSA

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

ANEXO E: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR POTATO DEXTROSA

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

ANEXO F: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO POTATO DEXTROSA BROTH

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

ANEXO G: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO YPD

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

ANEXO H: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA pH DEL SUELO BOSQUE PRIMARIO

pH	
Media	6,942
Error típico	0,037
Mediana	6,96
Moda	6,8
Desviación estándar	0,144
Rango	0,46
Mínimo	6,74
Máximo	7,2

Suma	104,13
Cuenta	15

ANEXO I: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA HUMEDAD DEL SUELO BOSQUE PRIMARIO

%HUMEDAD	
Media	9,30
Error típico	0,210
Mediana	8,998
Moda	#N/D
Desviación estándar	1,050
Rango	4,137
Mínimo	8,110
Máximo	12,247
Suma	232,380
Cuenta	25

ANEXO J. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE CENIZAS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO

%CENIZAS	
Media	90,8220
Error típico	0,2208
Mediana	91,1753
Moda	#N/D
Desviación estándar	1,1040
Rango	4,7290
Mínimo	87,7370
Máximo	92,4660
Suma	2270,5505
Cuenta	25

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

%MATERIA ORGÁNICA	
Media	9,178
Error típico	0,22079504
Mediana	8,8247
Moda	#N/D
Desviación estándar	1,10397519
Rango	4,72896441
Mínimo	7,53400143
Máximo	12,2629658
Suma	229,449501
Cuenta	25

ANEXO L: ESTADÍSTICA DE NITRÓGENO DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO

%NITRÓGENO	
Media	0,227
Error típico	0,024
Mediana	0,243
Moda	#N/D
Desviación estándar	0,092
Rango	0,313
Mínimo	0,056
Máximo	0,369
Suma	3,411
Cuenta	15

ANEXO M: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA CANTIDAD DE NITRATOS EN EL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO

NITRATOS Mg/L	
Media	3,233
Error típico	0,299
Mediana	2,8

Moda	2,5
Desviación estándar	1,1561
Rango	3,4
Mínimo	1,9
Máximo	5,3
Suma	48,5
Cuenta	15

ANEXO N: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA CANTIDAD DE POTASIO EN EL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO

POTASIO (K) mg/L	
Media	1,253
Error típico	0,248
Mediana	0,9
Moda	0,5
Desviación estándar	0,961
Rango	2,7
Mínimo	0,5
Máximo	3,2
Suma	18,8
Cuenta	15

ANEXO O: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA CANTIDAD DE MAGNESIO DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO

MAGNESIO (Mg) mg/L	
Media	42,200
Mediana	41
Moda	36
Desviación estándar	8,8898
Rango	29
Mínimo	27
Máximo	56
Suma	633
Cuenta	15

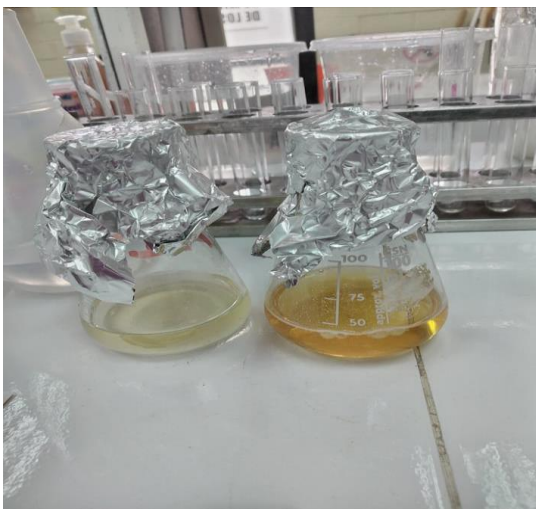
ANEXO P: LUGAR Y REALIZACIÓN DEL MUESTREO



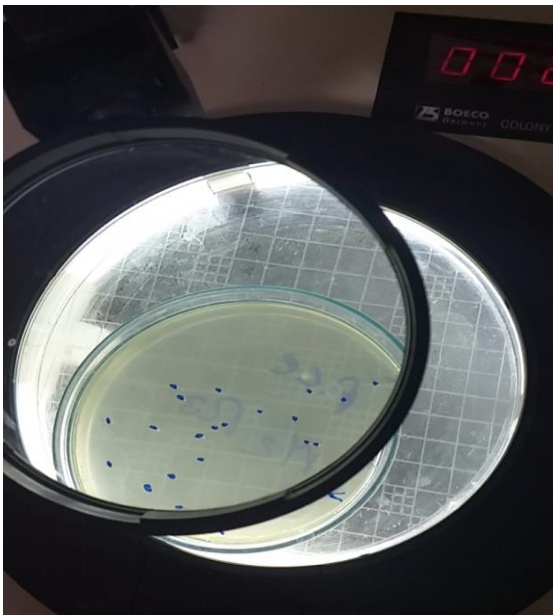
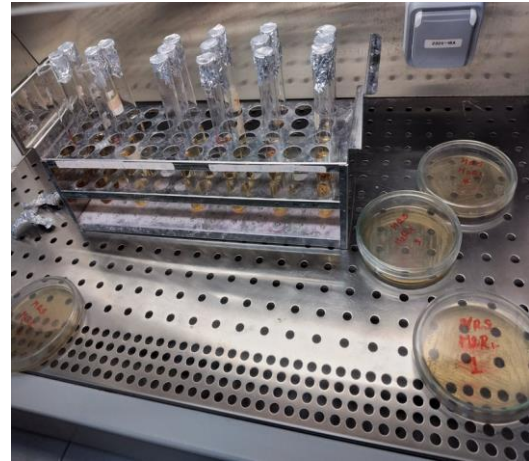
ANEXO Q: PESAJE DE LAS MUESTRAS Y ESTERILIZACIÓN



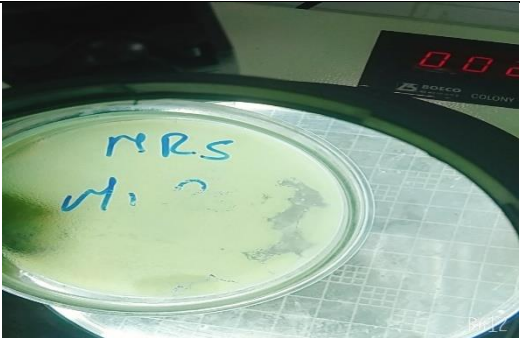
ANEXO R: SIEMBRA LOS MICROORGANISMOS EN LOS AGARES ESPECÍFICOS

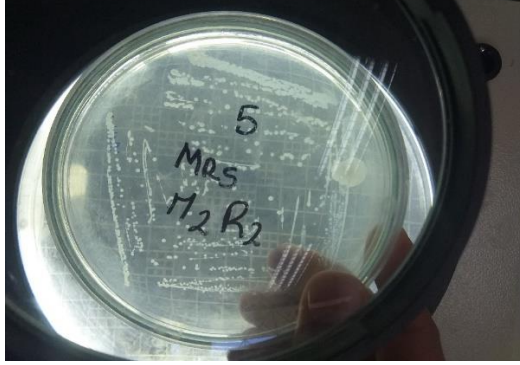
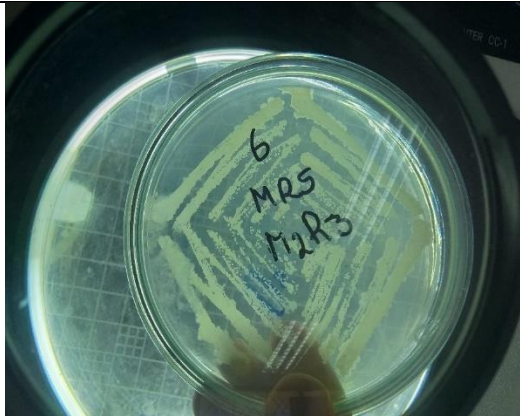
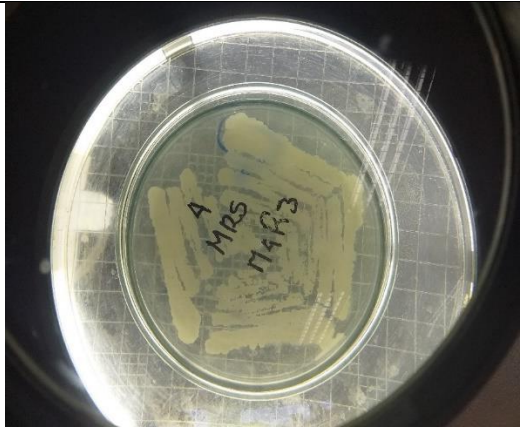



ANEXO S: AISLAMIENTO Y CONTEO DE LAS ESPECIES

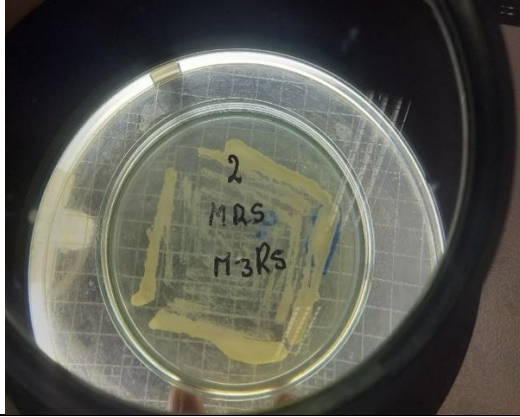


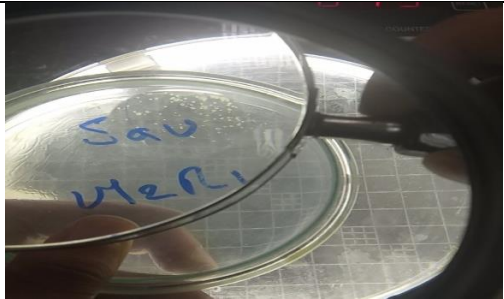
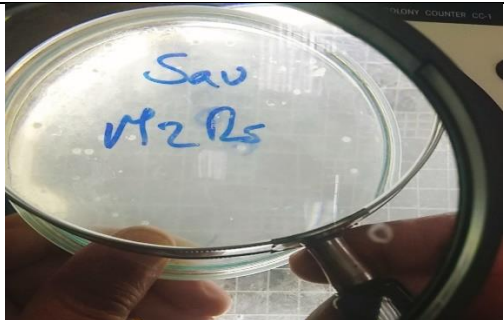



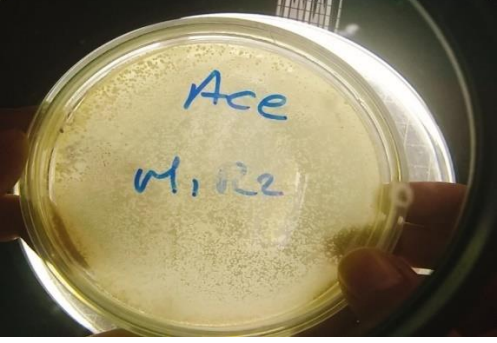
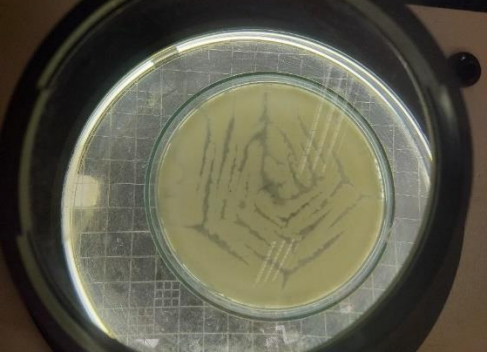
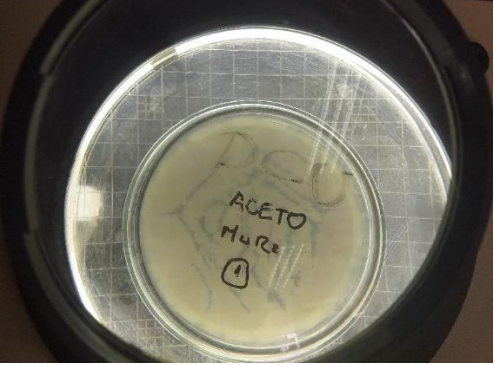
ANEXO T: SELECCIÓN DE ESPECIES MÁS TINCIÓN GRAM

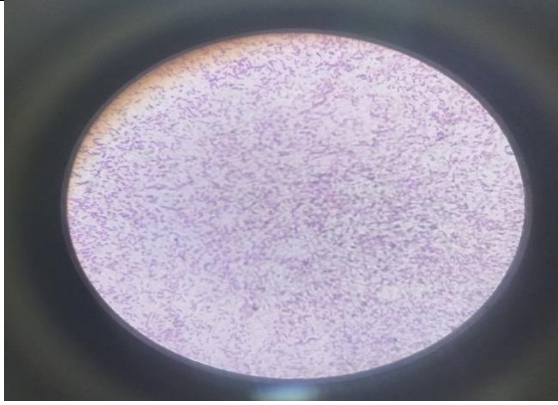
CÓDIGO DE LA MUESTRA	DILUCIÓN	IMAGEN
M1R1	10^{-5}	

M2R2	10 ⁻⁵	
M2R3	10 ⁻⁵	
M4R3	10 ⁻⁵	
M4R4	10 ⁻⁵	

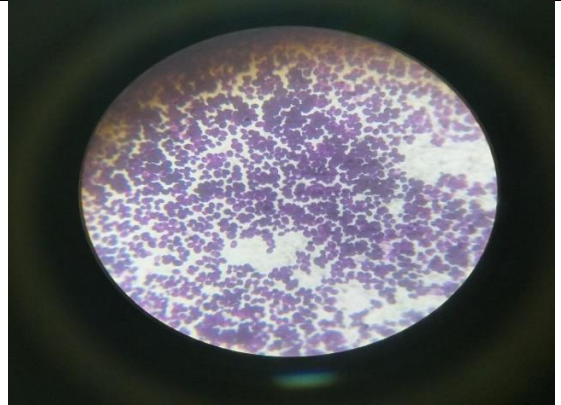
RESULTADOS DE TINCIÓN GRAM

M3R5	10^{-5}	
M5R2	10^{-5}	
M2R4	10^{-5}	
M2R1	10^{-5}	
M2R5	10^{-5}	

M3R1	10 ⁻⁵	
M1R2	10 ⁻⁴	
M5R4	10 ⁻⁵	
M4R2	10 ⁻⁵	



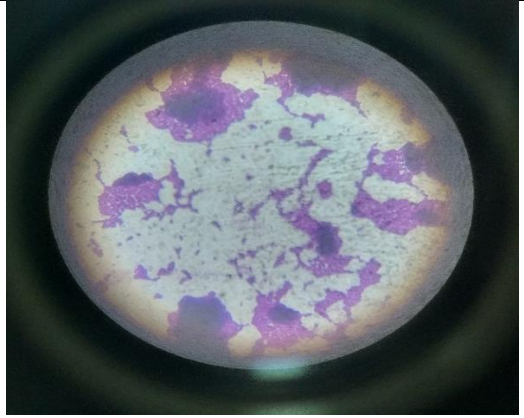
Agar: MRS
Código de muestra: M4R3
Dilución: 10^{-5}
Lente: 100X
Descripción: Bacilos gran positivos.



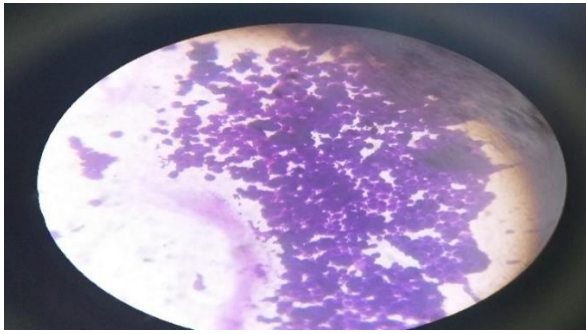
Agar: MRS
Código de muestra: M3R5
Dilución: 10^{-5}
Lente: 100X
Descripción: Cocos gran positivos.



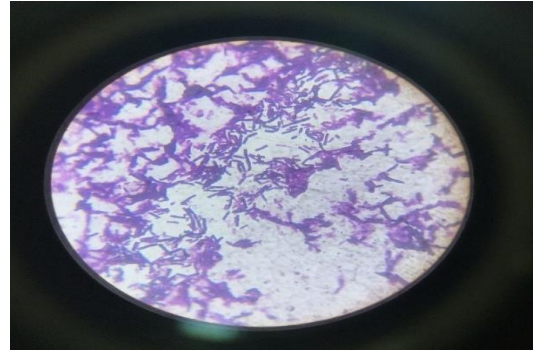
Agar: MRS
Código de muestra: M4R4
Dilución: 10^{-5}
Lente: 100X
Descripción: Cocos gran positivos



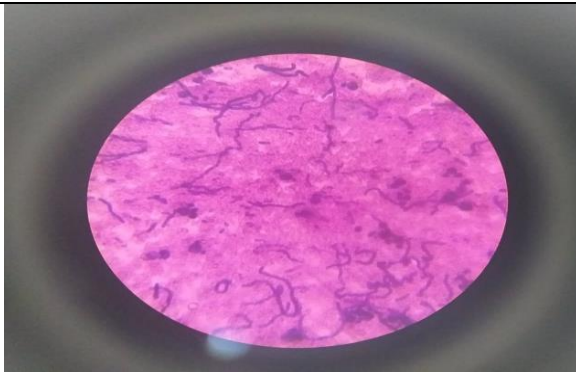
Agar: MRS
Código de muestra: M2R3
Dilución: 10^{-5}
Lente: 100X
Descripción: Cocos gran positivos



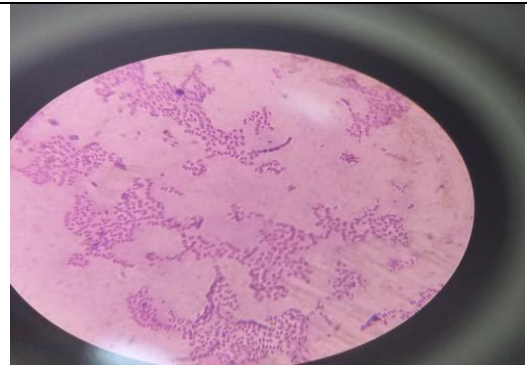
Agar: MRS
Código de muestra: M5R2
Dilución: 10^{-5}
Lente: 100X
Descripción: Cocos gran positivos



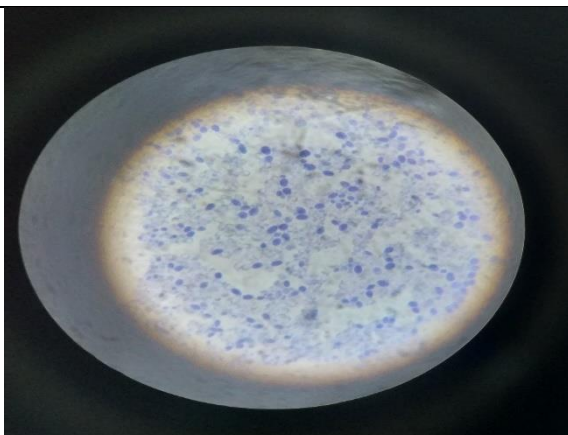
Agar: MRS
Código de muestra: M1R1
Dilución: 10^{-5}
Lente: 100X
Descripción: Bacilos gran positivos



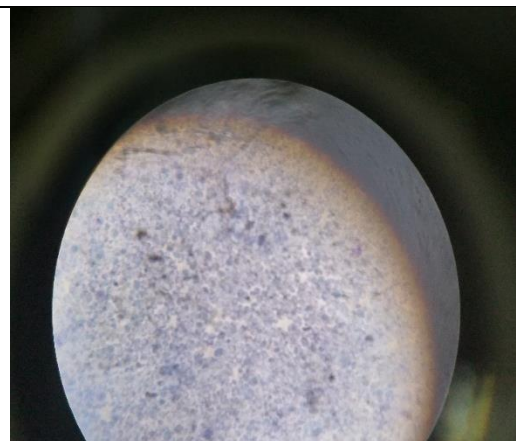
Agar: *Acetobacter glucosa*
Código de muestra: M5R4
Dilución: 10^{-5}
Lente: 100X
Descripción: Bacilos gran negativos



Agar: *Acetobacter glucosa*
Código de muestra: M4R2
Dilución: 10^{-5}
Lente: 100X
Descripción: Bacilos gran negativos



Agar: PDA
Código de muestra: M3R1
Dilución: 10^{-5}
Lente: 100X
Descripción: Cocos gran positivos



Agar: PDA
Código de muestra: M1R2
Dilución: 10^{-5}
Lente: 100X
Descripción: Cocos gran positivos

ANEXO U: CONTEO DE LAS PLACAS IDENTIFICADAS DE LAS BAL

MUESTRA	CA	CM	CB	TOTAL, COLONIAS	UFC/g
M1R1	5	4	1	216,67	21666667
M1R2	3	2	1	130,00	13000000
M1R5	9	7	5	455,00	45500000
M2R2	12	9	8	628,33	62833333
M2R3	5	4	2	238,33	23833333
M2R4	13	10	8	671,67	67166667
M3R1	-	-	-	INCONTABLE	INCONTABLE
M3R2	-	-	-	INCONTABLE	INCONTABLE
M3R5	6	4	3	281,67	28166667
M4R3	4	2	1	151,67	15166667
M4R4	5	4	1	216,67	21666667
M5R1	-	-	-	INCONTABLE	INCONTABLE
M5R2	6	3	2	238,33	23833333
M5R5	5	4	2	238,33	23833333

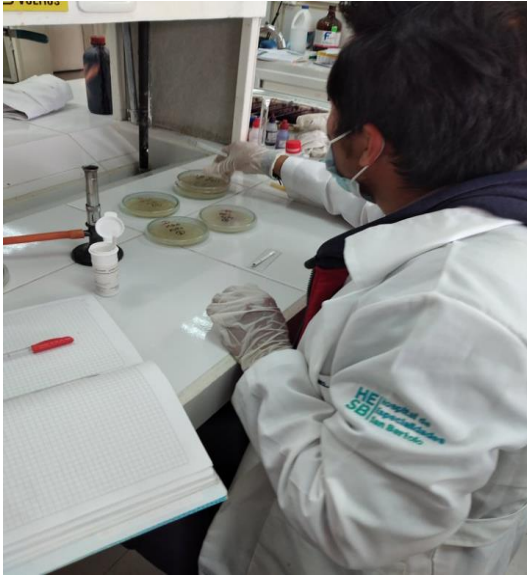
ANEXO V: CONTEO DE LAS PLACAS IDENTIFICADAS DE BA

MUESTRA	CA	CM	CB	TOTAL, COLONIAS	UFC/g
M1R2	5	4	2	238,33	23833333
M1R3	4	2	1	151,67	15166667
M2R2	8	6	2	346,67	34666667
M3R1	-	-	-	INCONTABLE	INCONTABLE
M3R3	7	4	3	303,33	30333333
M3R5	4	3	1	173,33	17333333
M4R1	8	6	3	368,33	36833333
M4R2	5	3	2	216,67	21666667
M4R3	-	-	-	INCONTABLE	INCONTABLE
M4R4	9	7	4	433,33	43333333
M4R5	5	2	1	173,33	17333333
M5R1	7	3	2	260,00	26000000
M5R4	5	3	2	216,67	21666667

ANEXO W: CONTEO DE LAS PLACAS IDENTIFICADAS DE LEVADURAS

MUESTRA	CA	CM	CB	TOTAL, COLONIAS	UPC/g
M1R2	4	3	1	173,33	17333333
M2R3	5	3	2	216,67	21666667
M2R4	4	3	1	173,33	17333333
M2R5	4	3	2	195,00	19500000
M3R1	4	2	1	151,67	15166667
M3R4	6	5	2	281,67	28166667
M4R2	6	3	4	281,67	28166667
M5R4	5	4	2	238,33	23833333

ANEXO X: PRUEBAS BIOQUÍMICAS APLICADAS A ESPECIES SELECCIONADAS.



ANEXO Y: ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS DEL SUELO DE BOSQUE DE ALAO

