



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y USOS POTENCIALES
DE MICROORGANISMOS DE TIERRA DE MONTAÑA Y
SUBTRÓPICO DURANTE EL PERIODO 2016”.**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORAS: MORENO LÓPEZ JOANA ALEXANDRA

VELARDE ESCOBAR KRISTINA ESTEFANÍA

TUTOR: ING. BYRON DÍAZ MONROY, PHD

Riobamba – Ecuador

2016

©2016, Joana Alexandra Moreno López; Kristina Estefanía Velarde Escobar

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.

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y USOS POTENCIALES DE MICROORGANISMOS DE TIERRA DE MONTAÑA Y SUBTRÓPICO DURANTE EL PERIODO 2016”, de responsabilidad de las señoritas Joana Alexandra Moreno López y Kristina Estefanía Velarde Escobar, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

ING. BYRON DÍAZ, PhD

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

ING. JUAN CARLOS GONZALEZ

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Nosotras, Joana Alexandra Moreno López y Kristina Estefanía Velarde Escobar, declaramos que el presente trabajo de titulación es de nuestra autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que proviene de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autoras, asumimos la responsabilidad legal y académicas de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 04 de Enero de 2016

Joana Alexandra Moreno López
160050113-2

Kristina Estefanía Velarde Escobar
020157864-8

Nosotras, Joana Alexandra Moreno López y Kristina Estefanía Velarde Escobar somos responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

JOANA ALEXANDRA MORENO LÓPEZ

KRISTINA ESTEFANÍA VELARDE ESCOBAR

DEDICATORIA

A Dios por permitirme lograr una de mis metas mas anheladas.

A mis padres por darme su apoyo incondicional, por ayudarme en cada paso de mi formación profesional, por ser los que han logrado que mi éxito me llene de felicidad y sea el de ellos también con su amor y paciencia, enseñándome valores como el compañerismo y la humildad, por estar conmigo en todo momento en mis triunfos y fracasos.

A mi hermana mi compañera de vida y de lucha quien ha estado acompañandome en cada momento, por su apoyo, sus palabras de animo y sobre todo por brindarme su cariño y amistad.

A toda mi familia que de una u otra manera han sido parte de este gran logro.

Joana

Dedico este Trabajo de Titulación a Dios por ser pilar fundamental en mi vida y guiarme en cada paso que doy día a día.

A mi madre Grima una mujer luchadora que con su apoyo incondicional, amor y paciencia en toda esta etapa me enseñó a seguir adelante a pesar de las dificultades , a mi padre Angel por enseñarme que con el trabajo arduo y honesto puedo llegar a conseguir los propósitos que me planteo en la vida.

A mi pequeño Benjamin que es y será mi fuente de lucha e inspiración a lo largo de toda mi vida, a mas de ser mi felicidad completa.

A mis hermanos Juan Carlos y Mónica que a través de sus consejos me enseñaron a luchar fuerte y mejorar cada día.

A mis Tios Laura y Mario, mis primos Alejandro y Megan por todo el amor y apoyo incondicional que me brindan día a día .

Kristina

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser el pilar fundamental durante todo este camino recorrido, llenándonos de sabiduría y fortaleza para afrontar los obstáculos que se pusieron en nuestras vidas, logrando cumplir nuestro sueño más anhelado el ser profesionales.

A nuestros padres que nos guiaron desde el principio de nuestras vidas brindándonos su apoyo incondicional en todo momento con paciencia, amor y lucha para poder alcanzar cada una de nuestras metas planteadas a lo largo de nuestra carrera universitaria.

A nuestros hermanos por ser nuestros amigos en todo momento y a través de la distancia enseñarnos que con esfuerzo, perseverancia y decisión se pueden alcanzar todo lo que nos proponemos lograr.

Agradecemos a quienes son parte de la Escuela de Ciencias Químicas de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo que con su dedicación y conocimientos impartidos lograron nuestra formación profesional.

Agradecemos al Ingeniero Byron Díaz y al Ingeniero Juan Carlos González por ser parte fundamental en esta investigación ya que con su apoyo y tiempo se ha llevado a cabo este Proyecto de Titulación.

Al LABIMA, de forma especial al Ingeniero Rene Carvajal por sus palabras de aliento en los momentos de desánimo y desesperación y por su predisposición de ayudarnos en todo momento.

INDICE

RESUMEN.....	xi
SUMARY.....	xii
INTRODUCCIÓN	13
CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	15
1.1. Biotecnología.....	15
1.2. Microorganismos Nativos.....	18
1.2.1. <i>Microorganismos Eficientes</i>	18
1.3. Microorganismos de Tierra de Montaña	20
1.3.1. <i>Funciones de los microorganismos de montaña</i>	21
1.4. Microorganismos del Subtrópico.....	21
1.5. Aplicaciones Biotecnológicas de Microorganismos Eficientes	22
1.6. Metodologías de Aislamiento	24
1.7. Metodologías de Caracterización.....	25
1.7.1. <i>Características Microscópicas</i>	25
1.7.2. <i>Características Macroscópicas</i>	25
CAPÍTULO II	
2. MARCO METODOLÓGICO	30
2.1. Lugar del desarrollo de la investigación	30
2.1.1. <i>Lugar de muestreo</i>	30
2.1.2. <i>Lugar de recolección de datos</i>	32
2.2. Procesos de la investigación.....	32
2.2.1. <i>Aislamiento de microorganismos de tierra de montaña y subtrópico</i>	32
2.2.2. <i>Caracterización in vitro de los microorganismos aislados</i>	38
2.2.3. <i>Pruebas bioquímicas de las cepas bacterianas</i>	41
CAPÍTULO III	
3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	46
3.1. Análisis del aislamiento de microorganismos	46
3.1.1. <i>Cultivos genéricos</i>	46
3.1.2. <i>Caracterización in vitro de los microorganismos aislados</i>	47
3.1.3. <i>Pruebas Bioquímicas de las cepas bacterianas</i>	63
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES.....	72
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Métodos de aislamiento frecuentes.....	25
Tabla 2-1: Microorganismos que producen las enzimas celulasas.....	28
Tabla 1-2: Ubicación de los puntos de muestreo en el Cantón Cumandá.....	30
Tabla 2-2: Ubicación de los puntos de muestreo en el Cantón Guano	31
Tabla 3-2: Composición del Agar nutritivo	34
Tabla 4-2: Composición del Sabouraud Glucosado Agar.....	34
Tabla 5-2: Composición del Tripteína Soya Caldo.....	37
Tabla 6-2: Escala McFarland	44
Tabla 1-3: Recuento en placa de microorganismos de suelo	46
Tabla 2-3: Caracterización Microscópica de microorganismos en condiciones óptimas de temperatura 37°C.	47
Tabla 3-3: Caracterización Microscópica de hongos	50
Tabla 4-3: Recuento en placa de microorganismos anaeróbicos.....	54
Tabla 5-3: Caracterización microscópica de microorganismos anaeróbicos	54
Tabla 6-3: Recuento de Aerobios totales	57
La tabla 7-3: Recuento de mohos y levaduras por ml de inóculo.....	57
Tabla 8-3: Microorganismos Psicrófilos.....	59
Tabla 9-3: Microorganismos Termófilos	61
Tabla 10-3: Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas bacterianas.....	65
Tabla 11-3: Resultados de las u.f.c/ml de las cepas bacterianas de cada lugar de muestreo.	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Resultados prueba de Kligler.....	27
Figura 1-2. Degradación enzimática de la celulosa	28
Figura 2-2: Ubicación del lugar de muestreo -Guano.....	32
Figura 3- 2: Microorganismos capturados con la trampa de arroz	33
Figura 4-2. Purificación por estriado de las colonias aisladas.	37
Figura 5-2: Bacterias Gram + , Bacilos	39
Figura 6-2: Bacterias Gram - , Cocos bacilos	39
Figura 7-2. Jarra de Anaerobiosis	39
Figura: 8-2. Galerías API 20NE (bioMérieuxMR)	43
Figura 1-3: Recuento de microorganismos en placas 3M™ Petrifilm™	59

INDICE DE GRAFICOS

Grafico 1-3. Resultados de los 10 estándares de McFarland y sus concentraciones.....	67
Grafico 2-3. Resultados de los 3 puntos de las cepas en los 3 puntos de muestreo de Cumandá.	67
Grafico 3-3. Resultados de los 3 puntos de las cepas en los 3 puntos de muestreo de Guano...	68

RESUMEN

El objetivo fue aislar, caracterizar y proyectar los usos potenciales de microorganismos de tierra de montaña y subtrópico durante el periodo 2016, en los cantones Cumandá y Guano de la provincia de Chimborazo. Se realizaron una serie de análisis físicos y bioquímicos para identificar algunas variables morfológicas y microbiológicas. Mediante la técnica de tinción de Gram se lograron identificar algunas bacterias por su forma y coloración que presentaron encontrándose en su mayoría bacilos Gram + y coco bacilos Gram + y Gram - , sometidos a diferentes temperaturas y ambientes aeróbicos y anaeróbicos, también se pudieron encontrar hongos miceliales y algunas levaduras. Mediante pruebas bioquímicas como el potencial de acidificación y la determinación del uso de carbohidratos se logró determinar que las cepas bacterianas aisladas presentan un alto potencial fermentativo por lo que estos microorganismos son muy útiles en la industria principalmente en la agrícola, como activadores de biofertilizantes o abonos orgánicos y en la fermentación de materia orgánica. Se recomienda el estudio a detalle de los hongos para verificar los procesos que estos llevan a cabo, mediante pruebas idóneas para este tipo de microorganismos y aplicar las bacterias aisladas en procesos que involucren principalmente fermentación utilizando sustratos que contengan carbohidratos.

PALABRAS CLAVES

< TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA> // < MICROBIOLOGÍA > // < MICROORGANISMOS EFICIENTES > // < TIERRA DE MONTAÑA > // < BACILOS GRAM + > // < BACILOS GRAM - > // < FERMENTACIÓN > // < HONGOS MICELIALES > //

SUMARY

The objetive was to isolate, characterize and project the potential uses of mountain and subtropical soil microorganisms during the period 2016, in Cumandá and Guano cantons of the province of Chimborazo. A series of physical and biochemical analyzes were performer to identify some morphological and microbiological variables. By means of Gram staining technique, some bacteria were identified due to their shape and coloration. Gram + and Gram bacilli and Gram + and Gram – bacilli, which were submitted to different temperatures and aerobic and anaerobic enviroments, also found fungi mycelial and some yeasts. Biochemical test such as the acidification potential and the determination of the carbohydrate use were able to determine that the isolate bacterial strains present a high fermentative potential, reason why these microorganisms are very useful in the industry mainly in the agricultural one, like activators of bio-fertilizers or organic fertilizers and in the fermentation of organic matter. A detailed study of the fungi is recommended to verify the processes that these carry out, using test suitable for this type of microorganisms and apply the asolated bacteria in processes involving mainly fermentation using substrates containing carbohydrates.

KEYWORDS

< TECHNOLOGY AND ENGINEERING SCIENCE > // < MICROBIOLOGY > // < EFFICIENT MICROORGANISMS > // < MOUNTAIN LAND > // < POSITIVE GRAM BACILLI > // < NEGATIVE GRAM BACILLI > // < FERMENTATION > // < MYCELIAL FUNGI > //

INTRODUCCIÓN

Identificación del Problema

El uso de microorganismos eficientes se ha incrementado considerablemente en los últimos años, constituyen un producto que se comercializa como una mezcla de: bacterias ácido lácticas, bacterias fototróficas y levaduras, desarrollados hace más de veinte años, su uso está difundido alrededor mundo y a pesar de que en el Ecuador han sido utilizados estos microorganismos para el mejoramiento y recuperación de suelos infértiles como lo plantea Richar Intriago en el año 2010, no se han desarrollado estudios más profundos que indiquen su morfología y sus diferentes usos potenciales y por ende se desconoce la aplicación en diferentes campos industriales, ganaderos, agrícolas y alimenticios tendiendo a producir pérdidas, desperdicio y agotamiento de recursos naturales y por consiguiente generando una pérdida económica significativa al país.

A pesar de su importancia y varios servicios que estos brindan son los menos conocidos y estudiados en nuestro país, donde la falta de investigación y el poco interés por parte de la comunidad científica han dejado de lado la posibilidad de dar inicio a nuevos avances biotecnológicos lo que con lleva a seguir utilizando productos químicos en los diferentes procesos de producción los cuales incrementan la contaminación provocando así un deterioro ambiental y efectos adversos a la salud de los seres vivos.

Justificación de la investigación

Enmarcados en el objetivo 7 del Plan Nacional del Buen Vivir del Ecuador el mismo que menciona “Garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental territorial y global”. Se procede a realizar la siguiente investigación dado que existen varias herramientas que permiten disponer de manera eficiente y accesible de un conjunto de recursos biológicos auténticamente puros y estables, potencialmente aplicables al desarrollo de nuevos productos, mejora y optimización de procesos y servicios de los principales sectores industriales, ganaderos, agrícolas y alimenticios más significativos.

El uso de los microorganismos eficientes, es altamente variado, entre los que se cuentan, la producción de abonos tipo bokashi aeróbico y anaeróbico, la producción de biogás en biodigestores, tratamiento de desechos domésticos e industriales, tratamiento de aguas residuales, procesos de ensilaje como lo cita Higa en el año 1997, y como también en nuevas tecnologías agropecuarias que ha incrementado grandemente la productividad a corto plazo, en ganadería también ha sido identificado en muchas partes del mundo con el afán de elevar productividad y

rentabilidad agrícola, además se ha utilizado para disminuir malos olores, reducir plagas de insectos y enfermedades, así como para aumentar la fecundidad de la inseminación artificial, y mejorar la calidad de la carne, lácteos y huevos.

Por ello es de vital importancia realizar este trabajo de investigación ya que al existir estudios referentes a estos microorganismos en el Ecuador permitirá realizar aislamientos y caracterizaciones a través de técnicas propias con el fin de buscar usos futuros con potencial biotecnológico aprovechando eficientemente las propiedades que poseen estos microorganismos y que puedan proporcionar beneficios en diferentes campos industriales, ganaderos, agrícolas y alimenticios garantizando la correcta identificación y viabilidad de los microorganismos estudiados. Además de considerar una tecnología natural que no tiene efectos adversos sobre las plantas, animales, seres humanos o el medio ambiente según las experiencias de más de una década de aplicación, y de esta manera contribuyendo a la economía del país.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Aislar, caracterizar y proyectar los usos potenciales de microorganismos de tierra de montaña y subtrópico durante el periodo 2016.

Objetivos Específicos

- ✓ Aislar microorganismos de tierra de montaña y de subtrópico para evaluar su potencial biotecnológico.
- ✓ Caracterizar *in vitro* los microorganismos aislados tanto en forma de consorcios o cepas individuales.
- ✓ Proyectar el uso potencial de estos microorganismos en la biotecnología.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Biotecnología

La biotecnología es una ciencia multidisciplinaria que abarca disciplinas como biología, bioquímica, agronomía, virología, medicina, ingeniería química y genética; la misma que busca intervenir en la producción de bienes, servicios o conocimientos para la humanidad innovando en algún nivel del campo industrial científico o productivo como lo menciona Roldan y Yeste (2013, citado en <http://alvavicjoa.blogspot.com/2013/01/0.html>). Esta disciplina se lo aprovecha en la agricultura, ganadería, farmacia, tecnologías de alimentos medioambiente, entre otros.

De este modo redefinimos a la Biotecnología, como una amplia área del conocimiento moderno que combina de manera innovadora la biología y la ingeniería en procesos que, aplicados sobre organismos vivos, sus tejidos, células o partes generan bienes, servicios o conocimientos que promoverán el bienestar de la humanidad.

(Hernández, 2010, citado en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300001).

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2010, citado en <http://www.fao.org/biotechnology/es/>) la biotecnología moderna contribuye a la agricultura grandes y variados beneficios de una manera rápida y en cantidades mayores, así como nuevas diversidades de plantas capaces de tolerar condiciones adversas, resistir herbicidas y plagas mejorando sus propiedades alimentarias y sanitarias y de esta manera enfocarse en la preservación del medio ambiente.

En el Ecuador, la biotecnología se encuentra en un período de desarrollo inicial, por eso es importante formar personas con conocimientos concretos en esta área para que puedan lograr un mayor y mejor progreso de la biotecnología en nuestro país.

1.1.1. Tipos de Biotecnología

1.1.1.1. Biotecnología roja

Díaz Martínez (2011a, citado en https://biotechspain.com/es/tema.cfm?iid=colores_biotecnologia), menciona que la biotecnología roja es aquella que se utiliza en procesos médicos, y por lo tanto consiste en la creación de nuevas vacunas o antibióticos para la erradicación de enfermedades, de esta forma mejorando los recursos hasta ahora disponibles mediante el uso de la biotecnología. Entre estas mejoras destacan:

- Diagnóstico molecular y biosensores.
- Ingeniería celular y de tejidos.
- Terapia génica

1.1.1.2. Biotecnología blanca

Es aquella que se aplica a los procesos industriales. Esto quiere decir que generalmente su uso radica en la creación de nuevas reacciones químicas, o bien simplemente en la realización de estas.

A su vez, este tipo de actividad está buscando reemplazar las tecnologías contaminantes para introducir otras más limpias y que respetan el medio ambiente. Básicamente, emplea organismos vivos y enzimas para obtener productos más fáciles de degradar, que requieran menos energía y por lo tanto generen menos desechos durante su producción.

El uso de enzimas o biocatalizadores es uno de los avances más significativos en el área de la biotecnología blanca. La ventaja de su uso se basa en la alta selectividad y eficiencia de las enzimas en comparación con otros procesos químicos artificiales. Mientras estos procesos químicos convencionales requieren alta presión y alta temperatura, los microorganismos y sus enzimas trabajan a presión y temperaturas normales. Además, las enzimas son biodegradables y muchas de ellas pueden funcionar en solventes orgánicos, alta concentración de sales y otras condiciones extremas. Las enzimas hoy se aplican a prácticamente todas las industrias, incluyendo la farmacéutica, alimenticia, química, textil, de detergentes, del papel, etc. (Díaz Martínez, 2011b, citado en https://biotechspain.com/es/tema.cfm?iid=colores_biotecnologia).

1.1.1.3. Biotecnología verde

Esta se aplica en los procesos agrícolas. Por ejemplo las plantas transgénicas, capaces de desarrollarse en medios ambientales desfavorables o resistentes a plagas y enfermedades. Como lo menciona Díaz Martínez, (2011c, citad en https://biotechspain.com/es/tema.cfm?iid=colores_biotecnologia) se espera que esta biotecnología promueva soluciones mas favorables con el medio ambiente que los métodos ya conocidos de la agricultura.

Según Segretín (2011, citado en <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>), las diversas aplicaciones de esta biotecnología son:

- Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción
- Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año
- Obtención de plantas libres de virus
- Producción de semillas sintéticas
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal)
- Obtención de metabolitos secundarios
- Producción de nuevos híbridos
- Mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas)
- Germinación de semillas.
- Producción de haploides.

1.1.1.4. . Biotecnología azul

Es la que está relacionada con el mar, y por ello también es llamada biotecnología marina. Es probablemente la biotecnología que menos se ha desarrollado. Aun así estando todavía en una fase temprana de desarrollo, sus aplicaciones son prometedoras para la acuicultura, cuidados sanitarios, cosmética y productos alimentarios.

Entre las aplicaciones que se han mencionado antes se puede destacar la acuicultura, que consiste en la cría o cultivo de organismos acuáticos con el objetivo de obtener una mayor producción. De este modo, se podrán obtener dietas más adaptadas para las especies cultivadas que permitan mejorar la productividad y la calidad de las mismas. (Díaz Martínez, 2011d, citado en https://biotechspain.com/es/tema.cfm?iid=colores_biotecnologia).

1.2. Microorganismos Nativos

1.2.1. *Microorganismos Eficientes*

1.2.1.1. *Origen de Microorganismos Eficientes*

Los microorganismo eficiente (EM) fue desarrollado por el Dr. Teuro Higa estudiando las funciones individuales de diferentes microorganismos, encontrando resultados positivos en esta mezcla, desde entonces esta tecnología ha sido investigada, desarrollada con el fin de incrementar los microorganismos benéficos y la diversidad microbiana del suelo, y a su vez, aumentar el crecimiento, producción y calidad de los cultivos según lo indica *Enríquez y Viera (2010a, citado en <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/9017/1/Caracterizaci%C3%B3n%20preliminar%20de%20aislamiento%20de%20microorganismos.pdf>)*.

EM es la abreviatura mediante la cual se puede reconocer a los microorganismos eficientes de origen natural sin manipulación genética, los mismos que forman un exuberante grupo de microorganismos existentes en los ecosistemas naturales donde no ha existido aún actividad humana, siendo así seleccionados por sus beneficios y compatibilidad en cultivos mixtos.

1.2.1.2. *Formación y Composición de Microorganismos Eficientes*

Como lo señala *Enríquez y Viera (2010)* los microorganismos eficientes (EM), es una mezcla de varios microorganismos benéficos, tanto 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 y de comida animal fermentada. Son totalmente seguros para los seres humanos y animales.

Según *Catagña y Noboa (2016a, citado en <http://dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/4909/1/236T0189.pdf>)* los organismos beneficiosos que conforman esta mezcla son:

- **Bacterias fotosintéticas (*Rhodopseudomonas spp*)**

Son un grupo de microorganismos que sintetizan sustancias útiles (aminoácidos, ácidos nucleicos, compuestos bioactivos y azúcares), a partir de las secreciones de las raíces y la materia orgánica, promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas. Son consideradas el eje central de la actividad del EM, pues dan sostén a otros microorganismos, también coexisten con *Azotobacter* y *Rhizobium*, que fijan nitrógeno atmosférico.

- **Bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus spp*)**

Originan ácido láctico a partir de azúcares y otros carbohidratos, producidos por las bacterias fotosintéticas y levaduras. Los *Lactobacillus* promueven la fermentación y desdoblamiento de lignina y celulosa, permitiendo una más rápida descomposición de los materiales vegetales. También, tienen la habilidad de suprimir microorganismos causantes de enfermedades, como los hongos del género *Fusarium*, que debilitan las plantas, exponiéndolas al ataque de otras enfermedades y plagas.

Levaduras (*Saccharomyces spp*)

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.

1.2.1.3. Caracterización del medio biótico

➤ **Bosque deciduo de tierras bajas**

Se ubica entre las formaciones de matorrales secos de tierras bajas y los bosques semidecíduos o húmedos tropicales, en una franja altitudinal entre los 50 y 200 m.s.n.m. La precipitación anual fluctúa entre 800 a 1200 mm y la estación seca es de siete meses. La vegetación se caracteriza por perder las hojas durante una parte del año. Los árboles más comunes son de la familia *Bombacaceae*, tienen troncos abombados y copa ancha.

La vegetación en el estrato medio incluye varias especies de cactus y de plantas espinosas del orden *Fabales*. Se localiza entre las provincias de Manabí en el Parque Nacional Machalilla y en la base del Cerro Montecristi, en la provincia del Guayas en Cerro Blanco y las bases de los cerros Masvale, Cimalón, Perequetre, Mate y Pancho Diablo en la Reserva Ecológica Manglares-Churute. (*Enríquez y Viera, 2010c, citado en <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/31467>*).

➤ **Bosque húmedo pie-montano**

Son bosques con alto endemismo (aproximadamente 10 %), los árboles alcanzan más de 30 m de alto, con una gran concentración de epífitas y un sotobosque arbustivo y herbáceo abundante en las familias *Araceae*, *Heliconiaceae*, *Cyclanthaceae*, *Piperaceae*, *Orchidaceae* y *Gesneriaceae*. Se ubica en el occidente de las provincias de Cotopaxi, Los Ríos, Bolívar y Azuay-Guayas, entre 300 y 1.300 m.s.n.m. El Bosque húmedo Pie-montano crece donde la estacionalidad del clima no es lo suficientemente fuerte como para producir una estación seca. La vegetación siempre verde

puede desarrollarse aún si la precipitación se encuentra por debajo de los 100mm mensuales. (Enríquez y Viera, 2010d, citado en <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/31467>).

1.2.1.4. Principales fuentes de Microorganismos Eficientes.

Enríquez y Viera (2010e, <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/31467>,) establece que hay al menos cinco grandes fuentes de microorganismos benéficos utilizables en agricultura entre ellos se encuentran:

Mantillos. La fuente primaria de microorganismos benéficos agrícolas se encuentra en el litter, mantillo o tierra de capote o primera película de tierra bajo la hojarasca y material desprendido de las selvas y bosques o de algunos agrosistemas poliestratificados, es decir, bajo sombrero de árboles. Esta primera capa de tierra es a la vez efecto y residencia de los microorganismos que, vehiculizados en el humus, convierten los residuos de vegetación y fauna en tierra fértil. Numerosas culturas antiguas han utilizado el mantillo como abono natural.

Compost. Diversas escuelas alternativas se aproximan al humus a través de diversos mecanismos, particularmente los compost y muy especialmente los lumbricompost; en estos últimos las excretas de las lombrices son resultado del complejo microbial digestivo.

Caldos microbiales. Se trata de la multiplicación por vía líquida de microorganismos benéficos, de los cuales los cuatro grupos más cultivados son: bacterias fotosintetizadoras, llamadas algas unicelulares, levaduras, lactobacilos, actinomicetos.

Micorrizas. Tienen un papel importante en el comportamiento del árbol, por aumentar la capacidad de absorción de los elementos nutritivos, al producir nuevas ramificaciones absorbentes y aumentar el área de contacto de la raíz con el suelo.

La función principal de las micorrizas es ayudar a que los nutrientes del suelo sean absorbidos fácilmente por las plantas ya cambio las plantas le suministran carbohidratos esenciales en la vida del hongo.

Entomopatógenos. Son microorganismos que causan enfermedades en artrópodos (insectos, ácaros, arácnidos, etc.) y por los mismos son útiles en controles biológicos.

1.3. Microorganismos de Tierra de Montaña

Los microorganismos de tierra de montaña son una combinación de microorganismos que se encuentran en ecosistemas o entornos naturales, los mismos que pueden ser aplicados como inoculantes para ayudar a mejorar los suelos y el rendimiento de los cultivos.

Según Paniagua (*et al.*, 2008, citado en <http://www.fundesyram.info/biblioteca.php?id=1778>), estos microorganismos son capaces de descomponer la materia orgánica, a su vez compiten con los microorganismos dañinos. Reciclan los nutrientes para las plantas. Fijan el nitrógeno en el suelo. Degradan las sustancias tóxicas (pesticidas). Producen sustancias y componentes naturales que mejoran la textura del suelo.

Hace algunos años esta tecnología fue desarrollada con el fin de reproducir estos microorganismos que se encuentran de manera natural en la capa superficial y orgánica de los suelos en los bosques no manipulados por el hombre. Estos microorganismos MM tienen múltiples beneficios: bajos costos y de fácil implementación, cumplen un papel fundamental en los procesos biológicos de los suelos principalmente en los sistemas agrícolas.

Los microorganismos de montaña son un grupo de organismos beneficiosos los cuales contienen aproximadamente 80 especies de microorganismos pertenecientes básicamente a cuatro géneros principales: bacterias fotosintéticas, actinomicetos, bacterias productoras de ácido láctico y hongos de fermentación.

En estos ecosistemas se genera una descomposición de materia orgánica, que se convierte en los nutrientes necesarios para el desarrollo de su flora, por ejemplo, cerros, bosques mixtos, y latifoliados, plantaciones de café, plantaciones de bambú, entre otros. (Suchini, 2012; citado en Monjarás, 2016b, <http://viaorganica.org/microorganismos-de-montana/>).

1.3.1. Funciones de los microorganismos de montaña

Según Castro, (2015, citado en https://prezi.com/8qgb5yin_s8n/microorganismos-de-montana/) los microorganismos de montaña MM cumplen las siguientes funciones:

- Tienen la capacidad de degradar la materia orgánica incrementando la disponibilidad de los nutrientes del suelo.
- Ayudan a controlar los microorganismos patógenos que se encuentran en el suelo.
- Favorecen la degradación de sustancias tóxicas como los plaguicidas, mejorando de esta manera la fertilidad de los suelos.
- Aceleran la germinación de las semillas.
- Fijación del nitrógeno en el suelo, entre otras.

1.4. Microorganismos del Subtrópico

En áreas subtropicales y tropicales, donde la temperatura promedio es alta todo el año, los organismos del suelo son constantemente activos. Por consecuencia, la capa orgánica es delgada,

el reciclaje de los nutrientes es relativamente rápido y continuo. (Harrison, 2001, citado en <http://www.tierramor.org/Articulos/Fertilidad%20de%20suelos.htm>).

Los suelos de climas subtropicales tienen un alto contenido de materia orgánica por lo que posee una gran cantidad de organismos.

1.5. Aplicaciones Biotecnológicas de Microorganismos Eficientes

Hoy en día las aplicaciones biotecnológicas de microorganismos eficientes son diversas e innovadoras ya que tienen como aporte no solo económico y energético sino ambiental. Dentro de los campos en donde se aplica biotecnológicamente los microorganismos está la producción de biocombustible, la agricultura, ganadería, industria e incluso en la salud humana facilitando una coexistencia más armónica entre los microorganismos y la humanidad como lo señala Higa y Wood (2009: citado en Acosta, 2012a, http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/3123/Microorganismos_eficientes_de_montana.pdf;jsessionid=F6A6FF46B410C1738CFD700B3E00055C?sequence=1).

- En la agricultura

Los microorganismos eficientes se han utilizado para enriquecer el suelo y producir cultivos de calidad, sanos, con un mayor rendimiento, con menos enfermedades o plagas sin el uso de productos químicos agrícolas.

Los bio-fertilizantes o abonos biológicos están basados en microorganismos que promueven y benefician la nutrición y el crecimiento de las plantas. Se trata de microorganismos del suelo, generalmente hongos y bacterias, que se asocian de manera natural a las raíces de las plantas de una forma más o menos íntima. Estos microorganismos pueden facilitar de manera directa o indirecta, la disponibilidad de determinados nutrientes tales como: el nitrógeno, el fósforo y el agua, además de producir sustancias denominadas fitohormonas promotoras del crecimiento vegetal.

Como manifiesta Palazón (2015, <http://www.ideagro.es/index.php/noticias/75-la-importancia-de-las-bacterias-en-la-agricultura>), la utilización de microorganismos con capacidad para promover el crecimiento de las plantas, se presenta como una gran alternativa de biofertilización. Estudios controlados de laboratorio, invernadero, y de forma más natural en el campo, han demostrado que la aplicación de estas tecnologías redundará en claros beneficios

Efectos positivos

- Promueve la germinación, crecimiento, florecimiento, fructificación y maduración de las plantas cultivadas.
- Realiza la capacidad fotosintética de las plantas.

- Incrementa la eficiencia de la materia orgánica como fertilizante.
- Desarrolla resistencia de las plantas a plagas y enfermedades.
- Mejora las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.
- Suprime patógenos y plagas del suelo. *(Webmaster, 2009, citado en http://www.laganaderia.org/15/index.php?option=com_content&view=article&id=114:microorganismos-eficientes&catid=1:timas&Itemid=41).*

- En la ganadería

Se ha utilizado para disminuir malos olores, reducir plagas de insectos y enfermedades, así como para aumentar la fecundidad de la inseminación artificial, y mejorar la calidad de la carne, lácteos y huevos.

- En la conservación del ambiente

Limpiar aguas contaminadas en estanques, lagos, presas y costas, incluyendo en la limpieza de derrames de petróleo, en el tratamiento de aguas residuales, y en la transformación de residuos orgánicos en abonos de calidad. Los eneficios en el tratamiento de agua son :

- ✓ Promueve significativamente la reducción olores del sistema.
- ✓ Ayuda a neutralizar la producción de gases nocivos como amoniaco, sulfhídrico y metilmecarptano.
- ✓ Reduce el lodo sedimentado.
- ✓ Reduce la presencia de microorganismos patógenos, coliformes, bacterias nocivas, hormonas y sulfatos reductores.
- ✓ Mejora significativamente la calidad del agua, reduciendo la DBO a DQO, la turbidez, los suspensos y, equilibra el pH y el oxígeno disuelto. *(AMBIEM, 2010, citado en http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base_datos/uso_em_tratamiento_aguas.pdf).*

- En la industrial

Según Higa y Wood (2009: citado en Acosta, 2012b, citado en http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/3123/Microorganismos_eficientes_de_montana.pdf;jsessionid=F6A6FF46B410C1738CFD700B3E00055C?sequence=1) las aplicaciones más frecuentes se dirigen a:

- La reducción del uso de agentes químicos contaminantes en la etapa de pre blanqueo. (xilanasas)
- Blanqueamiento de pulpa. (xilanasas; celulasas)

- Reciclado de fibras. (endoglucanasas para mejorar la velocidad de drenaje de fibras recicladas; celulasas para incrementar la densidad de la hoja de papel y reducir su rusticidad; alfa amilasas para mejorar las propiedades del drenaje y para el destintado de fibras recicladas, etc.).
- La disminución de residuos y contaminantes en el proceso de reciclado. (esterasas para el control de stickies, amilasas y proteasas para la remoción del lodo; lipasas para controlar la acumulación de lodo).
- Modificación de fibras. (celulasas para incrementar la flexibilidad de las fibras, celulasas, xilanasas y lacasas para incrementar la densidad de las hojas, etc.)
- Tratamiento de efluentes de la industria (enzimas y biodispersantes)

Otra aplicación de gran importancia que tienen los microorganismos es ser fuente de generación de energía alternativa para cultivos la misma que no inicia en la agroindustria, es decir, en los lugares de procesamiento de sustratos, sino en la producción de buena parte de ellos (cultivos de: palma, caña, maíz, yuca, caña, papa, cereales, etc.).

La revolución verde, obligó al uso excesivo de productos químicos para la producción de los cultivos, lo que ha causado detrimento ambiental y productivo. Con este enfoque se rompió el equilibrio edáfico entre la solución nutritiva del suelo y la población nativa de microorganismos. Las deficiencias nutricionales en los cultivos se trataban únicas y exclusivamente con fuentes inorgánicas, exceptuando claro el empleo de materia orgánica que para la fecha no era de buena calidad y se convirtió en el nicho de patógenos como nemátodos, bacterias y hongos nocivos para las plantas.

Podría decirse entonces que las primeras usuarias o beneficiarias de la microbiotecnología son las plantas mismas, pues reciben alimento (energía) de su vínculo (asimbiótico o simbiótico) con los microorganismos nativos e inoculados por el hombre, como fuente alternativa de energía, diferente a la convencional o de origen químico. Se ha demostrado que el uso de microorganismos en la agricultura favorece el desarrollo de los cultivos, disminuye los impactos nocivos del manejo de los cultivos, constituye una fuente renovable de energía para los mismos y son más baratos (*Fundación GEA, 2012, citado en <http://www.agro20.com/group/biotecnologaagroambiental>*).

1.6. Metodologías de Aislamiento

La técnica de aislamiento bacteriano es muy utilizada en el laboratorio para transferir un microorganismo proveniente de una muestra de un ambiente a otro con el propósito de promover

su crecimiento y posteriormente poder identificar los microorganismos aislados, en la tabla 1-1 se muestran algunas de las técnicas de aislamiento utilizando siempre un medio de cultivo sólido.

Tabla 1-1: MÉTODOS DE AISLAMIENTO 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 inóculo.	Consiste en realizar diluciones graduales de la muestra con la finalidad de sembrar la menor cantidad de colonias en el medio sólido.

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016
Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

1.7. Metodologías de Caracterización

1.7.1. Características Microscópicas

El estudio microscópico para la identificación de una gran mayoría de grupos bacterianos nos permite determinar la forma, tamaño y la estructura de las células realizando tinciones principalmente la tinción de Gram; mediante la cual se puede identificar si son bacterias Gram positivas por su coloración azul o violeta o bacterias Gram negativas por su coloración rosa o roja.

1.7.2. Características Macroscópicas

1.7.2.1. Morfología

Permite determinar la morfología para identificar las colonias bacterianas para lo cual se requiere un cultivo puro, es decir que provenga de una misma célula y que además esté compuesta únicamente por un solo tipo de microorganismo. Cuando las colonias poseen todos los requerimientos necesarios de nutrientes de temperatura, etc. se las puede visualizar fácilmente por presentar ciertas características en cuanto a la forma, tamaño, color que muestran las colonias.

Además las colonias presentan cierta característica en cuanto a su textura, algunas pueden ser viscosas así como secas, presentar superficies lisas o granulares.

1.7.2.2. Características de crecimiento

Según Koneman, (2016a, p. 164) los microorganismos presentan ciertas características de crecimiento como:

- a. Rapidez de crecimiento.- la mayoría de los microorganismos aislados en el laboratorio se desarrollan dentro de 1 a 2 días. Sin embargo, ciertas bacterias (p.ej., actinomicetos, micobacterias) y hongos pueden tomar un tiempo considerablemente más largo.
- b. Morfología de las colonias en el medio de crecimiento.- las bacterias varían en su aspecto en medios de cultivos sólidos. Con experiencia la morfología de las colonias en varios medios acoplada con algunas pruebas rápidas (p.ej., oxidasa, catalasa) a menudo es suficiente para la caracterización del género de microorganismos que se desarrollan a partir de muestras.
- c. Condiciones atmosféricas óptimas para el desarrollo.- los microorganismos se pueden caracterizar por sus requerimientos para el oxígeno y, según ese requerimiento, se pueden clasificar como aerobios (requieren oxígeno), facultativos (pueden crecer en presencia u ausencia de oxígeno) o anaerobios (crecimiento óptimo en ausencia de oxígeno). El crecimiento de la mayoría de los microorganismos también se estimula por dióxido de carbono y el crecimiento de los capnofílicos depende del CO₂.
- d. Temperatura óptima de crecimiento.- la mayoría de los microorganismos aislados en los laboratorios tienen un desarrollo óptimo a 35 – 37 °C. la capacidad para crecer a varias temperaturas puede ser útil para caracterizar algunos microorganismos.
- e. Morfología de las colonias en medios diferenciales, selectivos y no selectivos.- Los laboratorios inoculan muestras en medios no selectivos y selectivos para lograr las condiciones óptimas de aislamientos de microorganismos a partir de una muestra. Los medios selectivos usan agentes antimicrobianos (colistina, ácido nalidixico en agar o colorantes, agar de Macconkey, agar de azul de metileno- eosina) para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos y permitir el de otros. (Koneman, 2016b, p. 164).

1.7.2.3. Características Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se las realiza en el laboratorio para determinar las características metabólicas que presentan los microorganismos que se requiere identificar, cuando utilizan cierto sustrato para formar un producto final, estos pueden ser algunos azúcares o carbohidratos que siendo metabolizados por los microorganismos pueden producir ácido u otros productos finales.

Existe una gran variedad de pruebas bioquímicas, obteniendo de algunas de estas lecturas de resultados rápidos que pueden tardar varios segundos a pocas horas, así como otras que pueden tardar hasta 48 horas o más. Estas pruebas contienen el sustrato a metabolizar los mismos que determinan la capacidad del microorganismo para utilizar dicho sustrato

a. Prueba de Glucosa/ 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, 2016d, <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4955/1/236T0202.pdf>).

Resultados

Según BritanniaLab (2011, <http://britannialab.com.ar/esp/productos/b02/kliglerhierroagar.htm>), establece que:

1. Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
2. Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
3. Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
4. La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.
5. El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

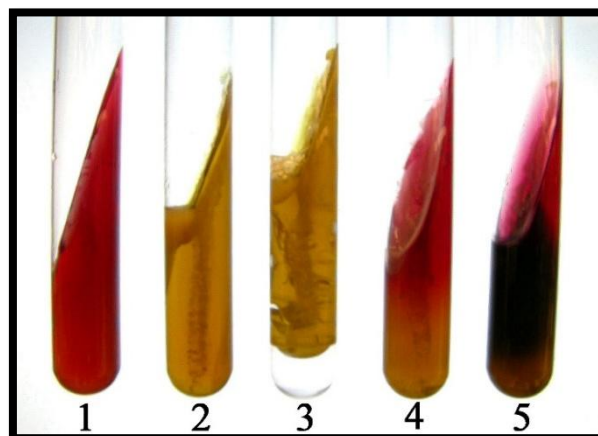


Figura 1-1: Resultados prueba de Kligler.

Fuente: Spilatro, 2004

b. Degradación de celulosa

Según Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio), s.f., (2011, <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=102>) establece que los microorganismos capaces de degradar celulosa secretan un sistema complejo de enzimas extracelulares, celulasas y xilanasas, que actúan en forma conjunta en la degradación de celulosa y hemicelulosa (los dos componentes principales de la madera).

Las fibras de celulosa son degradadas esencialmente por dos tipos de sistemas enzimáticos llamados agregativos y no agregativos.

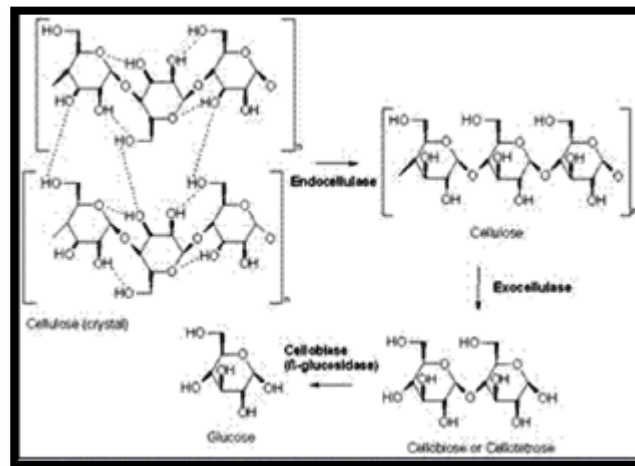


Figura 1-2. Degradación enzimática de la celulosa

Fuente: <http://www.enzymeindia.com/enzymes/cellulase-spanish.asp>

- **Microorganismos que degradan celulosa**

Los microorganismos celulolíticos (que degradan celulosa) desempeñan un papel importante en la biosfera reciclando este polímero. Existe una diversidad de estos microorganismos, bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos, que producen las enzimas celulasas. Algunos de ellos son:

Tabla 2-1. MICROORGANISMOS QUE PRODUCEN LAS ENZIMAS CELULASAS.

GRUPO	ESPECIES
Hongos aeróbicos	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Sporotrichum pulverulentum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Talaromyces emersanii</i> , <i>Trichoderma koningit</i> .
Hongos aeróbicos termófilos	<i>Sporotrichum thermofile</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> , <i>Humicola insolens</i> .

Hongos anaeróbicos mesofílicos	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Piromonas comunis</i> , <i>Sphaeromonas comunis</i> .
Bacterias aeróbicas mesofílicas y termófilas	<i>Cellulomonas sp</i> , <i>Cellvibrio sp</i> , <i>Microbispora bispora</i> y <i>Thermoimonospora sp</i> .
Bacterias anaeróbicas mesofílicas y termófilas	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> y <i>Clostridium thermocellum</i> .

Fuente: (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio), s.f.)

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

c. Uso de Carbohidratos

Sousa (2012, citado en <https://es.scribd.com/doc/115599303/Pruebas-Bioquimicas-Proteinas-Tolerancia-Carbohidratos>). Establece que los carbohidratos comúnmente empleados son diversos. Los más utilizados son los monosacáridos como: glucosa, manosa, galactosa y fructosas, entre otros y los disacáridos como: lactosa, sacarosa, maltosa y celobiosa. También algunos trisacáridos, entre los que se encuentra la rafinosa y polisacáridos como la celulosa y el almidón.

Determina la capacidad fermentativa del microorganismo al utilizar el carbohidrato al que se encuentra expuesto para dar como producto ciertas sustancias ácidas como el ácido láctico al registrarse con un viraje de color al variar el pH cuando el microorganismos reacciona frente al azúcar en estudio.

Desde el punto de vista bioquímico, la fermentación es el proceso catabólico anaeróbico en el que los carbohidratos y los compuestos afines son oxidados con liberación de energía en ausencia de aceptores extremos de electrones. Los aceptores finales de electrones son compuestos orgánicos producidos directamente en el desdoblamiento de los carbohidratos. En la fermentación se produce oxidación incompleta del compuesto inicial y solamente una pequeña cantidad de la energía es liberada durante el proceso.

(García, 2007, citado en <http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10742/Identificacion%20de%20bacterias.pdf?sequence=1>).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar del desarrollo de la investigación

2.1.1. Lugar de muestreo

2.1.1.1. Cantón Cumandá

Cumandá, se encuentra ubicado al sur oeste de la provincia de Chimborazo, a unas 2,45 horas de Riobamba. La cabecera cantonal, Cumandá, está situada a orillas del río Chimbo, que la separa del vecino centro poblado de Bucay, perteneciente a la Provincia del Guayas. Tiene una extensión de 158,7 km², con una población de 12.900 habitantes.

El Cantón se sitúa en una altitud que varía de 300 hasta 1900 msnm aproximadamente, esta situación permite que sea una de las zonas con mayor biodiversidad de la provincia y del país. Está ubicada en el subtrópico, por lo que su clima tiene una temperatura promedio de 20° C.

El proyecto se realiza específicamente en el recinto San Vicente en donde se tomaron tres puntos de muestreo que se indican en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2: UBICACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO EN EL CANTÓN CUMANDÁ

PUNTOS DE MUESTREO	LATTITUD	LONGITUD
CP1	2°13'4.52"S	79° 6'31.47"O
CP2	2°13'1.61"S	79° 6'32.86"O
CP3	2°13'0.38"S	79° 6'33.31"O

Fuente: Google Earth, 2016

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

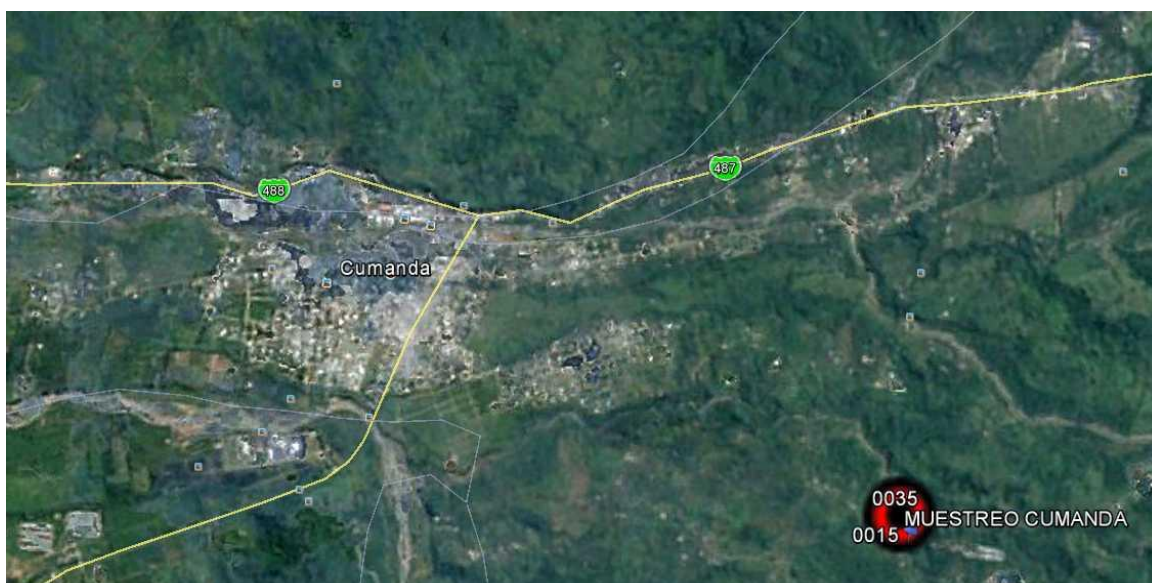


Figura 1-2: Ubicación del lugar de muestreo - Cumandá

Fuente: Google Earth, 2016

2.1.1.2. Cantón Guano

El territorio del cantón Guano se localiza en el centro del Altiplano Andino del Ecuador, al norte de la provincia de Chimborazo, en las coordenadas X 762043.586; Y 9822152.649. La cabecera cantonal se asienta en los 2639 m.s.n.m., y posee un clima templado con características de valle interandino.

La altitud del territorio del cantón Guano varía desde los 2280 m.s.n.m. en la Comunidad Cahuaji Bajo, parroquia Guanando, hasta los 6310 m.s.n.m. (nevado del Chimborazo), parroquia San Andrés. Este fenómeno permite que en el cantón se 37 registren temperaturas que oscilan desde bajo 0°C (nevado Chimborazo) hasta los 28,3°C en los meses más caluroso.

El proyecto se realiza específicamente en la parroquia rural La Providencia en donde se tomaron tres puntos de muestreo que se indican en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2: UBICACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO EN EL CANTÓN GUANO

PUNTOS DE MUESTREO	LATTITUD	LONGITUD
GP1	1°35'37.10"S	78°37'25.79"O
GP2	1°35'36.92"S	78°37'25.88"O
GP3	1°35'36.91"S	78°37'26.21"O

Fuente: Google Earth, 2016

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

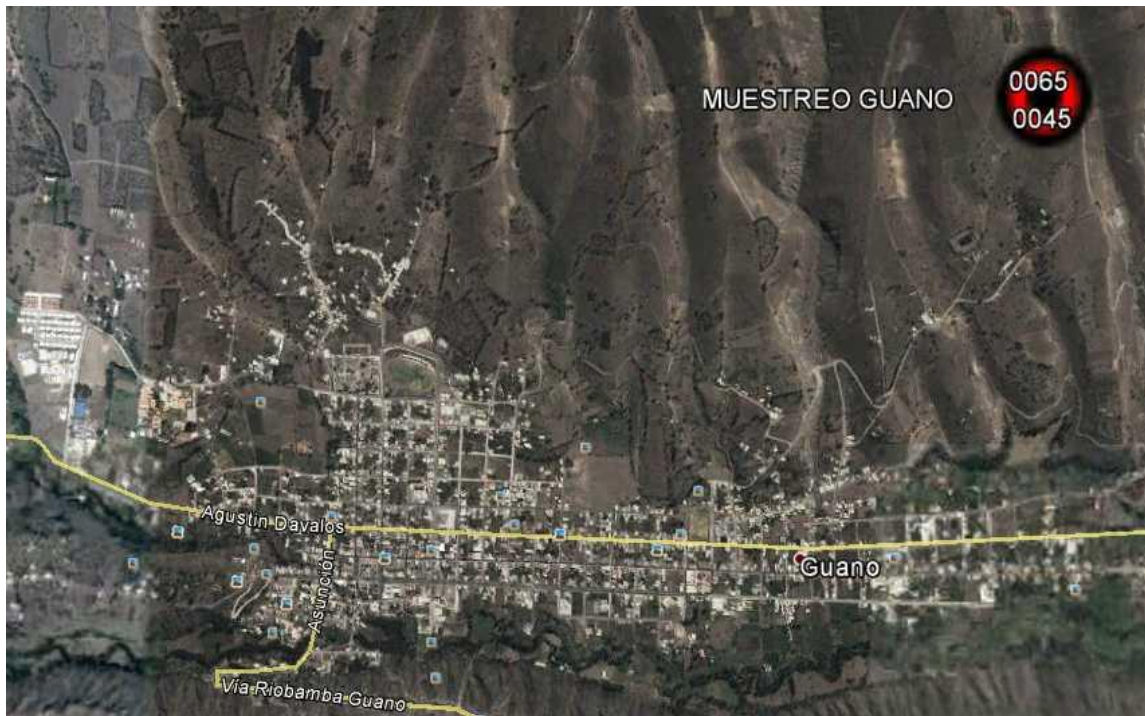


Figura 2-2: Ubicación del lugar de muestreo -Guano

Fuente: Google Earth, 2016

2.1.2. Lugar de recolección de datos

Esta investigación tuvo lugar en el laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal, localizado en la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicado en el Km 1 ½ de la Panamericana Sur en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo a una superficie de 979,7 Km² y a una latitud de 9807000 UTM y longitud de 764600 UTM.

2.2. Procesos de la investigación

2.2.1. Aislamiento de microorganismos de tierra de montaña y subtrópico

A. Georreferenciación de los lugares de muestreo

Se realizó las visitas a los respectivos lugares de estudio para localizar los puntos donde se tomarán las muestras para lo cual se tomó a consideración dos sitios geográficos plenamente identificados como cantón Guano (tierra de montaña) y cantón Cumandá (tierra de subtrópico) de los cuales se realizaran las capturas de los microorganismos, estableciéndose tres sitios de captura en cada lugar.

B. Captura y transporte de microorganismos

La captura de microorganismos se realizó utilizando trampas en tarrinas plásticas, al cual se le adicionó en su interior materia orgánica en este caso se utilizó el arroz cocido, lo cual nos ayudó como sustrato para la producción de microorganismos eficientes.

Previamente se cocinó arroz (sin sal); la tarrina es sellada previamente con una malla o nylon bien asegurada para evitar que se derrame el arroz.

Luego se las lleva hasta los puntos localizados para ser enterradas, bajo la copa de los arboles por un lapso de 8 días aproximadamente.

Transcurrido los 8 días sacamos las tarrinas y se observó que el arroz estaba cubierto totalmente por colonias de microorganismos de diferente color además se los pudo reconocer con facilidad por la formación de micelios blancos como se muestra en la figura 1-2 y las llevamos al laboratorio para iniciar el proceso de aislamiento y cultivo.



Figura 3- 2: Microorganismos capturados con la trampa de arroz

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

C. Aislamiento de microorganismos mediante cultivos genéricos.

a. Preparación de medios de cultivo

Se preparó 2 medios de cultivo AGAR NUTRIENTE en el caso de bacterias y SABOURAUD para hongos y levaduras, siguiendo las especificaciones indicadas en cada caso para su preparación como se muestra en la tabla 3-2 y 4-2; se utilizó un agitador magnético en cada

solución y se lo colocó sobre una plancha eléctrica con agitación hasta que el medio quede totalmente disuelto en el agua destilada; además se debe tener en cuenta que el medio debe ser esterilizado en el autoclave para ser usado.

AGAR NUTRITIVO

Tabla 3-2: COMPOSICIÓN DEL AGAR NUTRITIVO

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Pluripetona	5.0	Suspender 31 g de polvo por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos
Extracto de carne	3.0	
Cloruro de Sodio	8.0	
Agar	15.0	

Fuente: BritaniaLab, 2011

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

SABOURAUD

Tabla 4-2: COMPOSICIÓN DEL SABOURAUD GLUCOSADO AGAR

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Pluripetona	10.0	Suspender 65 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 118-121°C.
Glucosa	40.0	
Cloranfenicol	0.05	
Agar	15.0	

Fuente: BritaniaLab, 2011

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

b. Preparación de las diluciones

Para tal fin se empleó el método de las diluciones seriadas.

Materiales

- Tubos de ensayo
- Gradilla de plástico
- Pipetas de 1ml
- Pipetas de 10ml
- Pera de goma
- Frascos de esterilización
- Espátula

Reactivos

- Agua esterilizada

Equipos

- Balanza Analítica
- Agitador vórtex
- Cabina de flujo laminar

Procedimiento

1. Se tomó a consideración una muestra por cada punto elegido, es decir tendremos seis muestras de los dos sitios de muestreo.
2. Se preparó varios tubos de ensayo los cuales contenían 9 ml de agua esterilizada.
3. Se pesó 1 g de la muestra de arroz de cada una de las muestras.
4. Se realizó diluciones seriadas de las muestras hasta llegar a una dilución de 10^{-6} , se debe tomar en cuenta que la primera dilución 10^{-1} contiene 1 g de la muestra original y 9 ml de agua estéril.
5. Se debe homogenizar la muestra por 60 segundos y posteriormente se realiza la misma técnica hasta llegar a una dilución 10^{-6} .

c. Siembra de las diluciones

De la dilución 10^{-6} se tomó 1 ml de la solución y se sembró en una caja Petri que contiene el medio de cultivo preparado anteriormente y se esparce suavemente en la superficie del medio. Todo debe estar debidamente rotulado para saber a qué muestra pertenece cada caja.

En el caso de hongos y levaduras se incubó las cajas Petri a 27°C por un periodo de 48 a 72 horas para verificar el crecimiento.

Cultivo para bacterias

Para bacterias se lo colocó en la estufa a 37°C por 24 horas.

Transcurrido el periodo de incubación se realizó el recuento de colonias en cada placa con el fin de determinar el número de microorganismos en la muestra inicial.

Para el reporte de los resultados se usó la siguiente fórmula.

$$\frac{UFC}{g_{muestra}} = \frac{NC * F * A}{P}$$

Donde:

UFC/g: Unidades formadoras de colonia por gramo de muestra.

NC: Número de colonias por caja.

F: factor de dilución

P: peso en g de muestra

A: área de la caja Petri

d. Purificación y reactivación de las cepas bacterianas

Para la purificación de cepas se tomó en consideración las colonias más representativas de cada muestra tomada en los puntos tanto de Guano como de Cumandá para lo cual se realiza el mismo procedimiento de preparación de Agar Nutritivo; sin embargo para la inoculación del medio se utiliza la técnica de siembra por estría por agotamiento como se muestra en la figura 2-2 para lo cual se sigue el siguiente procedimiento:

- Se esterilizó el asa de glaski con la ayuda de un mechero.
- La caja Petri se la divide en cuatro cuadrantes.
- Se tomó una muestra de la colonia y se la coloca en uno de los cuadrantes en la caja en la superficie del medio y se procede a realizar el estriado.

- Luego se tomó como referencia el sentido de las agujas del reloj y se realiza el mismo procedimiento hasta llegar al cuarto cuadrante; tomando en cuenta que la muestra se debe tomar de la colonia que se colocó al inicio en el primer cuadrante.
- Se incubó las placas a 37°C de 24 – 48 horas.

Con el fin de realizar análisis posteriores con esas cepas se refrigeraron las muestras a una temperatura entre 0- 5°C, y para reactivarlas se utilizó el Tripteína Soya Caldo con el fin de darles los nutrientes necesarios a las bacterias para que se desarrollen adecuadamente en la tabla 5-2 se muestra la composición de la misma; se repite nuevamente el paso de la purificación para obtener las cepas bacterianas que requerimos para el estudio.

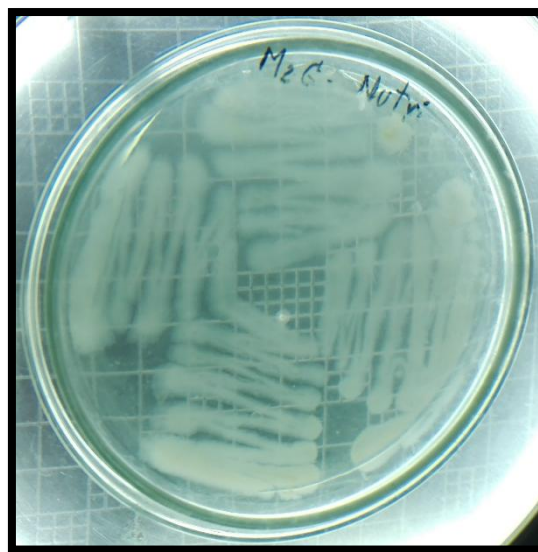


Figura 4-2. Purificación por estriado de las colonias aisladas.
Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

Tabla 5-2: COMPOSICIÓN DEL TRIPTEÍNA SOYA CALDO

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Tripteína	17.0	Suspender 30 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar y calentar hasta disolver. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.
Peptona de soya	3.0	
Cloruro de sodio	5.0	
Fosfato dipotásico	2.5	
Glucosa	2.5	

Fuente: BritaniaLab, 2011

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

2.2.2. Caracterización *in vitro* de los microorganismos aislados

A. Identificación de los grupos morfológicos a través de tinción Gram

Para la identificación de la morfología de los microorganismos incubados en los medios selectivos se utiliza la técnica de coloración o tinción Gram como se describe a continuación:

Materiales

- Asa de glaski
- Portaobjetos
- Cepas bacterianas

Reactivos

- Agua destilada
- Colorante principal: cristal violeta
- Mordiente: Lugol
- Decolorante: alcohol-cetona
- Colorante de contraste: safranina
- Aceite de inmersión

Equipos

- Microscopio

Procedimiento

1. Se tomó directamente de la caja Petri una muestra significativa con asa de glaski; se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos y se extiende por la superficie.
2. Flameamos la muestra con ayuda de un mechero para que se quede completamente seco.
3. Se colocó los reactivos de tinción primero el cristal violeta durante 1 minuto; inmediatamente se lava y se coloca Lugol durante 1 minuto y se lava nuevamente; seguido se expone a alcohol cetona durante 1 minuto y se vuelve a lavar; finalmente se coloca safranina y se lava.
4. Posteriormente se colocó una gota de aceite de inmersión en la placa y se observó en el microscopio con el objetivo (100x); donde se podrán diferenciar las colonias Gram + de color azul y las colonias Gram – de color rojo como se muestra en la figura 3-2 y 4-2 respectivamente. Esto se da gracias a que el Lugol lava el polisacárido de la pared de las bacterias Gram – y estas quedan incoloras, mientras que las bacterias Gram + conservan el tono azulado. Posteriormente la Safranina entra en contacto con las bacterias. Gram – y les da el tono rojizo.



Figura 5-2: Bacterias Gram + , Bacilos
Fuente: Moreno J; Velarde K, 2016

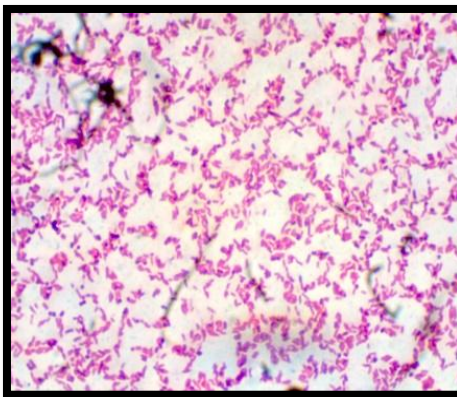


Figura 6-2: Bacterias Gram - , Cocos bacilos
Fuente: Moreno J; Velarde K, 2016

B. Identificación de la Atmósfera de cultivo

Esta técnica se utiliza para determinar los requerimientos que necesitan los microorganismos para poder desarrollarse en un medio, es decir si trabajan en ausencia o presencia de oxígeno.

Para verificar si un cultivo es anaerobio se realizó el mismo proceso descrito anteriormente pero en este caso se lo colocó en una jarra de anaerobiosis y se lo incubó a 37°C/24-48 h.



Figura 7-2. Jarra de Anaerobiosis
Fuente: OXOID, 2012

C. Determinación del número de organismos por gramo de muestra.

Se utilizó la técnica en placas Petrifilm^{RM} para recuento de microorganismos en un sistema de medio de cultivo listo que facilita la enumeración de las colonias de bacterias; lo cual permite una estimación cuantitativa del número de microorganismos.

Se utilizó placas 3MTM PetrifilmTM para mohos y levaduras y aerobios totales.

El procedimiento es el mismo descrito para cultivos en caja Petri, solo que en este caso se tomó 1 ml de la muestra y se lo colocó en el film inferior y de manera suave se ejerce una pequeña presión del dispensor en el film superior de la placa con el fin de distribuir uniformemente el inóculo en la zona circular; y luego se incubó a 37 °C por 24-48 horas en el caso de bacterias y en el caso de hongos y levaduras se incubó a 27 °C por un tiempo de 48-72 horas.

Para el reporte de los resultados en el caso de grupos bacterianos se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{g_{muestra}} = \frac{NC * F * A}{P}$$

Donde:

UFC/g: Unidades formadoras de colonia por gramo de muestra.

NC: Número de colonias por caja.

F: factor de dilución

P: peso en g de muestra

A: área de inoculación

En el caso de hongos se realiza de la siguiente manera:

$$\frac{UPC}{g_{muestra}} = \frac{NC * F * A}{P}$$

Donde:

UPC/g: Unidades propagadoras de colonia por gramo de muestra.

NC: Número de colonias por caja.

F: factor de dilución

P: peso en g de muestra

A: área de inoculación

D. Rango de comodidad calorífica

Sirve para determinar la temperatura óptima a la cual los microorganismos sobreviven y se desarrollan.

Para lo cual se sometió cada una de las muestras colocadas en las cajas Petri a diferentes rangos de temperatura siguiendo la misma técnica anteriormente mencionada.

Para el caso de los psicrófilos (5°C), termófilos (45°C), y para los mesófilos (37°C).

2.2.3. *Pruebas bioquímicas de las cepas bacterianas*

2.2.3.1. *Potencial de acidificación*

Es la medida de la tendencia de un microorganismo a volverse acidificante en su potencial de acidificación.

Este procedimiento consiste en realizar una serie de pruebas de fermentación utilizando el medio Kligler. Se realiza de la siguiente manera:

Materiales

- Tubos de ensayo
- Asa de glaski
- Cepas bacterianas

Reactivos

- Medio de Kligler

Equipos

- Estufa

Procedimiento

Se preparó el medio Kligler y se llevó al autoclave para esterilizar el medio; se colocó 5 ml del medio en cada tubo y se lo dejó enfriar procurando que tenga una inclinación de 15° aproximadamente para que se forme un pico de flauta.

Luego con la ayuda de un asa se tomó una pequeña muestra de la cepa bacteriana primero por picadura en el fondo y a continuación una siembra por estría en la superficie del pico de flauta.

Se incubó a 37°C por 24 horas.

2.2.3.2. Determinación del uso de carbohidratos

Mediante esta técnica se determina la forma en que los microorganismos utilizan diferentes azúcares en forma de pruebas bioquímicas.

Esta prueba bioquímica se la realiza utilizando las galerías API. En este caso se utilizó la galería API 20 NE (bioMérieux), como se detalla a continuación.

Permite la identificación de bacilos Gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias. Es una galería conformada por 20 microtubos. (BioMérieux, 2010)

Para la determinación de este proceso fermentativo los microorganismos que deseamos estudiar en este caso las bacterias a ser analizadas se ponen en suspensión en un medio líquido el cual nos servirá para posteriormente ser inoculado en la galería API. Durante la incubación, el catabolismo de los glucósidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico de la cepa. (Salas, 2009)

Este proceso se lo realizó de la siguiente manera:

- Se realizó una suspensión de las cepas bacterianas en Tripteina Soya Caldo con el fin de reactivar las cepas y de la misma se tomará la muestra para ser inoculadas en la galería API.

Inoculación en la galería:

- Se tomaron pequeñas muestras de la suspensión microbiana y se dispuso en la galería API 20 NE, asegurándose de que esta esté completamente homogénea.
- Se genera anaerobiosis con aceite mineral e parafina en las pruebas en las cuales el nombre del azúcar está subrayado.
- Las pruebas que se encuentran encerradas en un recuadro se deben llenar completamente hasta la cúpula.
- Con las indicaciones correspondientes de la prueba se recubre los test con aceite mineral de parafina.
- Se incubó las muestras a 37 °C durante 24 h, tratando de mantener una atmósfera húmeda en la estufa y con esto evitar que las muestras se sequen.

La lectura de la galería se la realiza de la siguiente manera:

- La lectura se realizó después de las 24 h de incubación.

- Se observó en cada tubo la acidificación producida si la reacción es alcalina hay un cambio de color rojo; para la reacción acida (cambio de color a amarillo); y cuando se da producción de H₂S e hidrolisis de gelatina hay un cambio a color negro.



Figura: 8-2. Galerías API 20NE (bioMérieuxMR)

Fuente: Mac Faddin J, 2003

2.2.3.3. Medición del potencial de degradación de celulosa

Se realizó mediante cultivos *in vitro* para determinar el porcentaje de degradación de celulosa pura, expresado en porcentaje, en una unidad de tiempo y por una cantidad determinada de microorganismos.

Para la realización de esta prueba se usó la es escala de McFarland para realizar una comparación de los inóculos ya sea esta visual o por la medición mediante métodos turbidimétricos, llevando un control de la escala y del inóculo.

a. Preparación del estándar de solución McFarland

Materiales

- Frascos volumétricos de 100ml
- Pipetas de 1 ml
- Pera de goma

Reactivos

- Ácido sulfúrico 95-98% (H₂SO₄)
- Cloruro de Bario dihidratado (BaCl₂·2H₂O)
- Agua destilada

Equipos

- Cabina de flujo laminar

Procedimiento

Ácido sulfúrico 1% v/v (H₂SO₄)

- Agregar aproximadamente 90 ml de agua destilada en un frasco graduado de 100 ml.
- Con una pipeta de 1 ml agregar 1 ml de H₂SO₄.
- Llevar a 100 ml de volumen con agua destilada y mezclar.

Cloruro de Bario.2H₂O (1.75% p/v) (BaCl₂)

- Pesar 1.175 g BaCl₂. 2H₂O y pasarlo a un frasco graduado de 100 ml.
- Agregar aproximadamente 50 ml de agua destilada y mezclar bien hasta disolver.
- Llevar a 100 ml de volumen con agua destilada y mezclar.

Creamos 10 estándares y mediante espectrofotometría, se realiza una recta patrón de esta manera se puede detectar la concentración de nuestras diluciones bacterianas. Esta escala se basa en la capacidad que posee el cloruro de bario de precipitarse con la presencia de ácido sulfúrico.

Tabla 6-2: ESCALA MCFARLAND

Escala McFarland	BaCl ₂ al 1% (ml)	H ₂ SO ₄ al 1% (ml)	UFC/ml (x10 ⁸)
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,9	9,1	27
10	1,0	9,0	30

Fuente: VALEJO, M, 2012

Con ayuda de esta escala preparamos los 10 estándares de McFarland.

Materiales

- Tubos de ensayo
- Pipetas de 1ml
- Pipetas de 10 ml
- Pera de goma

Reactivos

- Ácido sulfúrico 1% v/v (H₂SO₄)
- Cloruro de Bario.2H₂O (1.75% p/v) (BaCl₂)

Procedimiento

En cada uno de los 10 tubos se puso en las cantidades que indica la tabla tanto de ácido sulfúrico como de cloruro de bario hasta llegar a los 10 ml.

Luego se preparó la solución con la cepa bacteriana, se colocó 10 ml de agua estéril en diferentes tubos de ensayo; después con la ayuda de un asa de glaski tomamos una pequeña muestra de la cepa y la colocamos en el tubo, luego agitamos la solución.

b. Lectura en el espectrofotómetro

Con la ayuda del espectrofotómetro y con una longitud de onda de 625 nm se realizó la lectura de los 10 estándares de MacFarland, de los cuales se realizó 3 repeticiones obteniendo 3 lecturas de cada uno de los patrones.

Así mismo se realizó el mismo procedimiento pero con las cepas bacterianas, de la misma forma se realizan 3 repeticiones de cada una de las soluciones con las cepas.

c. Prueba de degradación de celulosa

Materiales

- Cajas Petri
- Pipetas de 1 ml
- Bisturí
- Papel higiénico como fuente de celulosa

Reactivos

- Agar nutriente

Procedimiento

Para realizar este proceso se tomó 1 ml de la solución con la cepa bacteriana preparada anteriormente y se colocó en la caja Petri; después se coloca el medio de cultivo y se lo deja que este se solidifique.

Posteriormente se realizó un pequeño corte en el agar en tres diferentes secciones y se colocó un trozo pequeño de papel higiénico en cada uno de los cortes realizados.

Y se realiza el mismo procedimiento con las otras cepas bacterianas.

Se incubo en una estufa a 37 °C mientras se verifica diariamente si hubo degradación de celulosa por parte de las bacterias seleccionadas.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Análisis del aislamiento de microorganismos

3.1.1. Cultivos genéricos

BACTERIAS

Transcurridas 24 horas desde la siembra se puede identificar que ya existe crecimiento bacteriano en las cajas que contienen Agar Nutriente el mismo que permanece solido incluso a altas temperaturas, y nos ayuda a distinguir mejor las colonias pequeñas ya que el crecimiento bacteriano lo hace en la superficie (Casado *et al.*, 2012). Cada muestra se encuentra codificada de acuerdo al lugar y punto de muestreo. En el anexo A se encuentran los cálculos correspondientes para las cajas en las que se requirió aplicar el método indicado. En la tabla 1-3 se detalla el recuento de microorganismos aislados del suelo.

Tabla 1-3: RECUENTO DE MICROORGANISMOS DE SUELO, EN PLACA.

Muestra	Dilución	Resultado UFC/g
M1C	10 ⁻⁶	MNPC
M2C	10 ⁻⁶	9,8x10 ⁹
M3C	10 ⁻⁶	MNPC
M1G	10 ⁻⁶	1,3 x10 ⁹
M2G	10 ⁻⁶	4,9 x10 ⁹
M3G	10 ⁻⁶	5,5 x10 ⁹

*Los números 1, 2,3 corresponden al punto de muestreo; las letras C, G, corresponden respectivamente al lugar de muestreo Cumandá y Guano; MNPC: muy numeroso para contar.

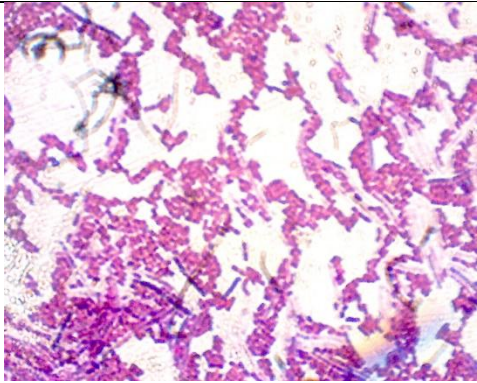
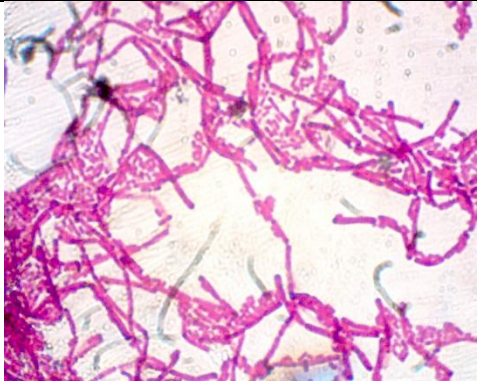
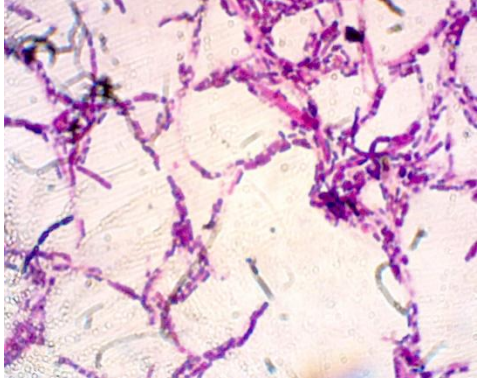
Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

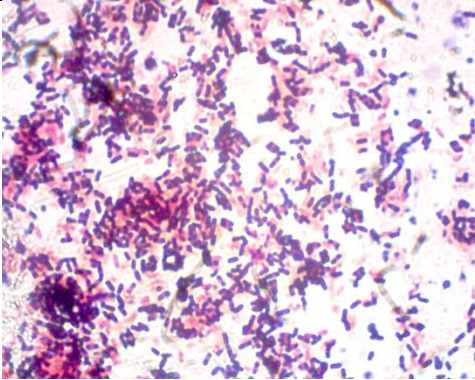

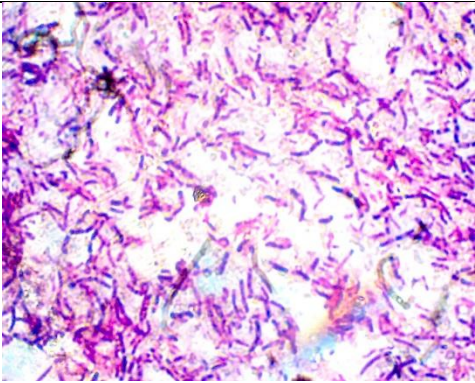
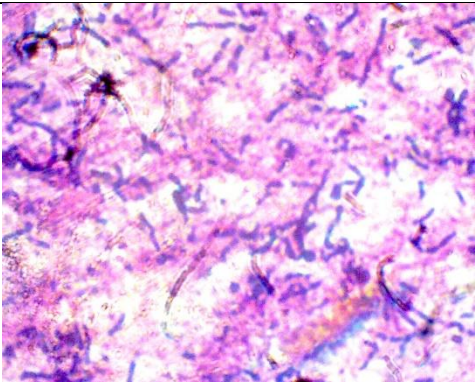
3.1.2. Caracterización in vitro de los microorganismos aislados

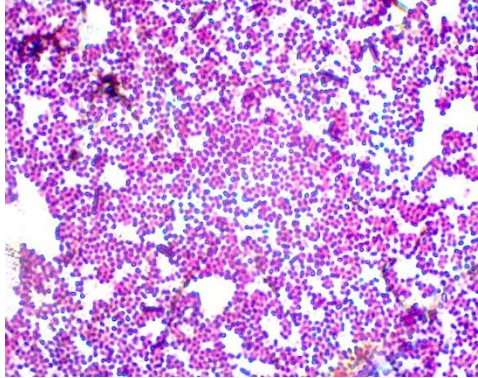
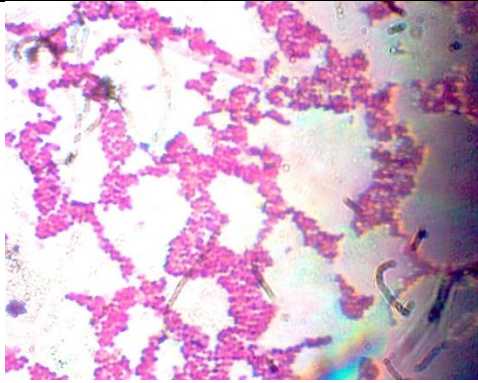
A. Identificación de los grupos morfológicos a través de tinción Gram

En la tabla 2-3 se presentan los resultados obtenidos de la Tinción Gram, con lo cual se puede definir la morfología de los grupos bacterianos, así como definir el grupo al que pertenecen si son Gram Positivos(+) y Gram negativos(-).

Tabla 2-3: CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE MICROORGANISMOS EN CONDICIONES ÓPTIMAS DE TEMPERATURA 37°C.

Muestra	Resultados de Tinción	Foto
M1C1	Bacilos Gram +	
	Cocobacilos Gram -	
M1C2	Bacilos Gram +	
	Cocobacilos Gram -	
M2C	Bacilos Gram + esporulados	

M3C1	Bacilos Gram + esporulados	
M3C2	Bacilos Gram +	
M1G1	Bacilos Gram + esporulados	
M2G1	Bacilos Gram +	

M2G2	Cocobacilos Gram + y Gram -	
M3G	Cocobacilos Gram -	

*Los números después de las letras C o G significan que son dos cepas distintas en la misma muestra.

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

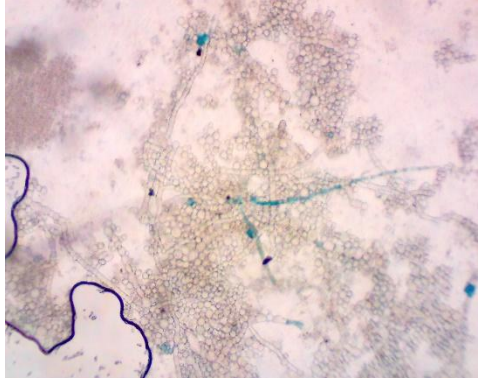
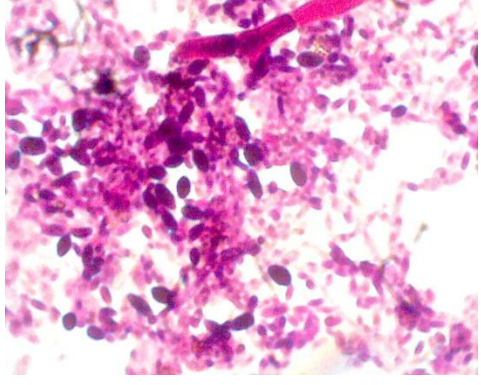
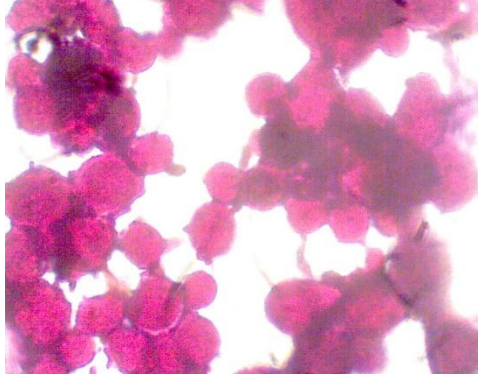
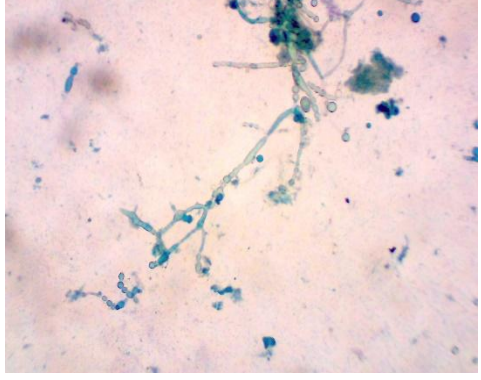
Las colonias bacterianas que pudieron ser visualizadas mediante una tinción de Gram fueron en su gran mayoría bacilos Gram positivos así como bacilos esporulados, según García et al., 2013 demuestra en un estudio que existe la existencia de varios géneros de bacilos Gram positivos y *Lactobacillus*, así como bacilos esporulados en muestras de microorganismos eficientes tomadas del suelo. Las bacterias ácido lácticas tienen la habilidad de suprimir enfermedades incluyendo microorganismos como *Fusarium*, que aparecen en programas de cultivos continuos; además ayudan a solubilizar la cal y el fosfato de roca. (Microorganismos eficientes y amigables con el ambiente, 2008, pp.34-36)

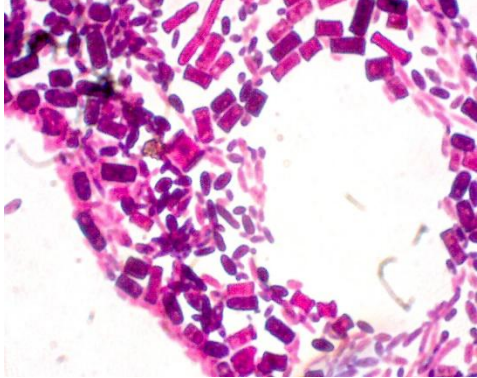
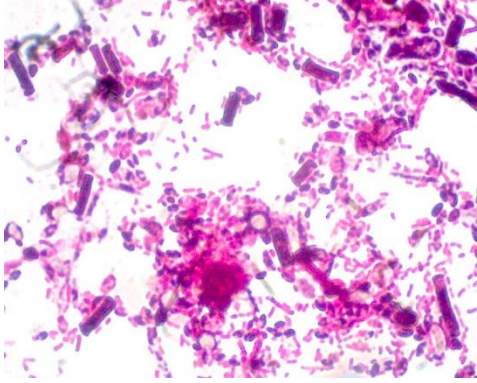
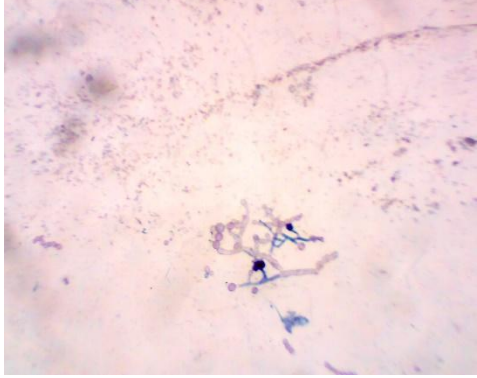
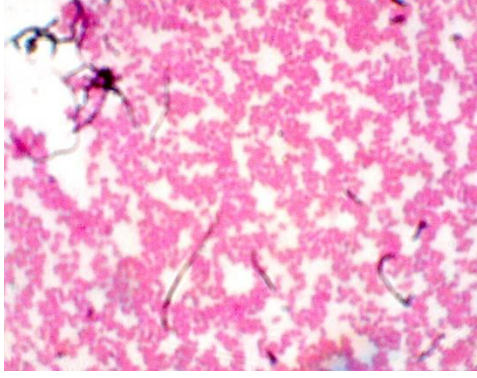
El uso de bacterias ácido lácticas reducen las poblaciones de nematodos y controla la propagación y dispersión de *Fusarium*, y gracias a ello induce un mejor ambiente para el crecimiento de los cultivos (Sharifukkin, 1993; citado en García *et al.*, 2013).

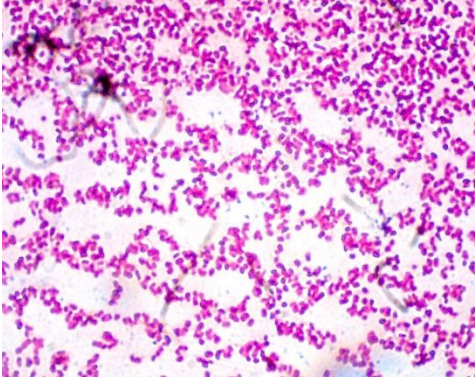
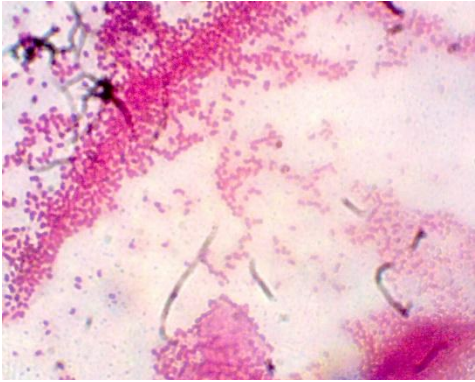
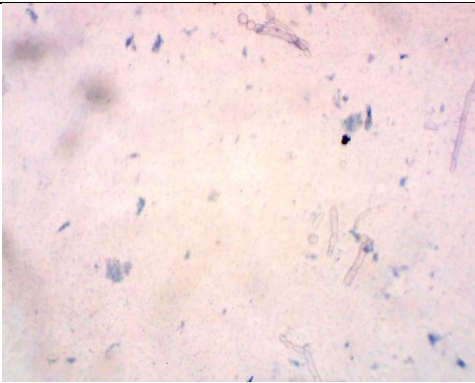
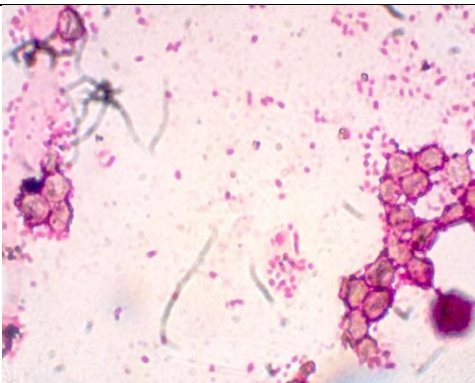
a. Identificación de hongos

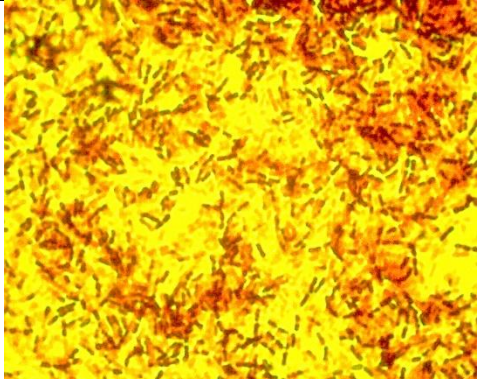
En la tabla 3-3 se indica los resultados obtenidos para la identificación de hongos. Para estos resultados cabe mencionar que se realizó de dos maneras con tinción Gram ya que esta permite diferenciar algunas levaduras y con azul de metileno el cual nos ayuda a diferenciar en si la morfología que presentan los hongos, esto debido a que la tinción de Gram no nos permitió verificar la morfología característica de los hongos.

Tabla 3-3: CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS

Muestra	Resultados	Foto
M1C Azul de metileno	Hongos miceliales	
M1C Tinción Gram	Hongos miceliales	
	Levaduras	
M1C2 Tinción Gram	Levaduras en gemación	
M2C1 Azul de metileno	Hongo micelial	

<p>M2C2</p> <p>Tinción Gram</p>	<p>Levaduras</p>	
<p>M3C</p> <p>Tinción Gram</p>	<p>Cocobacilos Gram -</p>	
	<p>Levaduras</p>	
<p>M3C</p> <p>Azul de metileno</p>	<p>Hongo micelial</p>	
<p>M1G</p> <p>Tinción Gram</p>	<p>Cocobacilos Gram -</p>	

<p>M1G1 Tinción Gram</p>	<p>Cocobacilos Gram +</p>	
<p>M2G Tinción Gram</p>	<p>Cocobacilos Gram -</p>	<p>5</p> 
<p>M3G</p>	<p>Hongo micelial</p>	
<p>M3G Tinción Gram</p>	<p>Levaduras</p>	
	<p>Cocobacilos Gram -</p>	

M3G1 Tinción Gram	Bacilos Gram +	
	Cocobacilos Gram -	

*Los números después de las letras C o G significan que son dos cepas distintas en la misma muestra.

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

Se pudieron observar la morfología de algunas levaduras y hongos miceliales demostrando así la presencia de este tipo de hongos y levaduras en la 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, así como de plantas superiores. (Microorganismos eficientes y amigables con el ambiente, 2008, pp.34-36). La investigación realizada por García *et al.*, 2013 demuestra que fueron observados algunos hongos miceliales y levaduras las que nos indican que existe la presencia de este tipo de organismos los cuales también son muy importantes dentro de los procesos en los cuales se utilizan los microorganismos eficientes.

B. Identificación de la Atmósfera de cultivo

Esta prueba nos permitió verificar la presencia de microorganismos que pueden sobrevivir en ambientes anaeróbicos, es decir totalmente sin oxígeno.

Después de transcurrido de 24-48 horas pudimos observar que si hay crecimiento en este tipo de ambientes.

La tabla 4-3 muestra el recuento de microorganismos anaeróbicos y en la tabla 5-4 se presenta la identificación de los mismos mediante la técnica de tinción Gram.

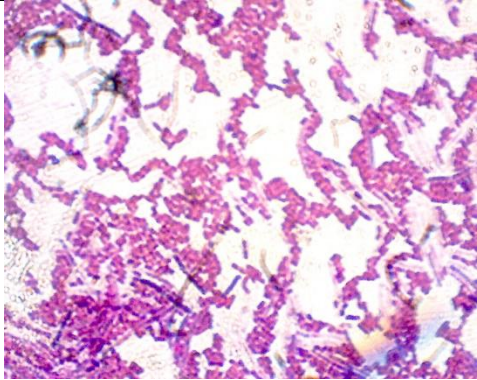
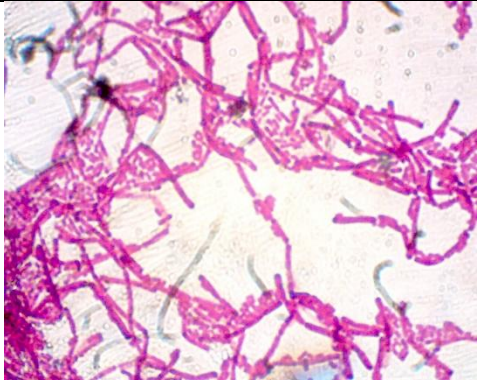
Tabla 4-3: RECUENTO EN PLACA DE MICROORGANISMOS ANAERÓBICOS

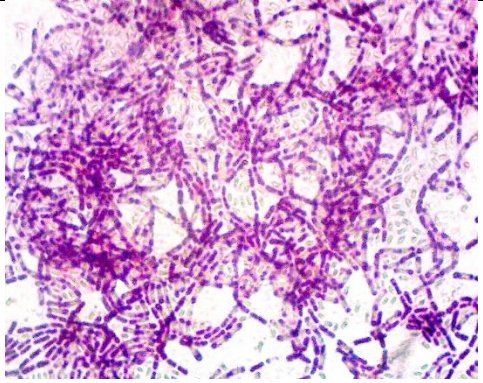
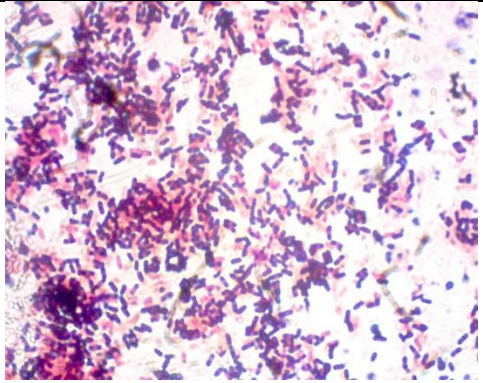

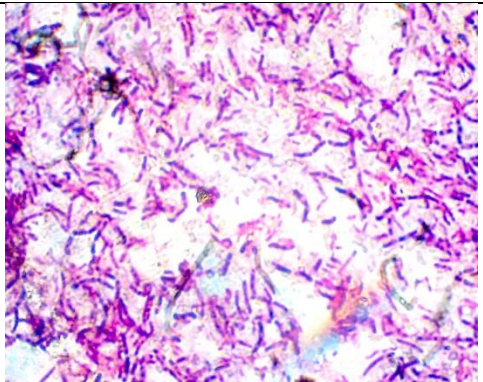
Muestra	Dilución	Resultado UFC/g
M1C	10 ⁻⁶	2,1 x10 ⁹
M2C	10 ⁻⁶	Colonia Pura
M3C	10 ⁻⁶	MNPC
MIG	10 ⁻⁶	1,9 x10 ⁸
M2G	10 ⁻⁶	1,9 x10 ⁸
M3G	10 ⁻⁶	1,3 x10 ⁸

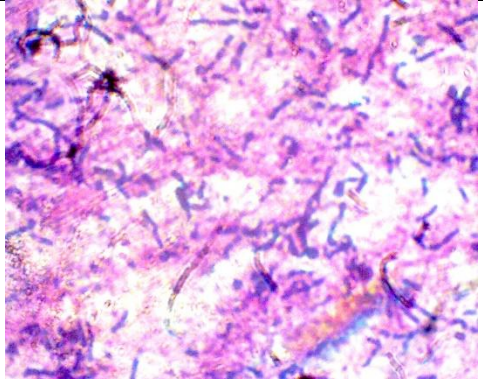
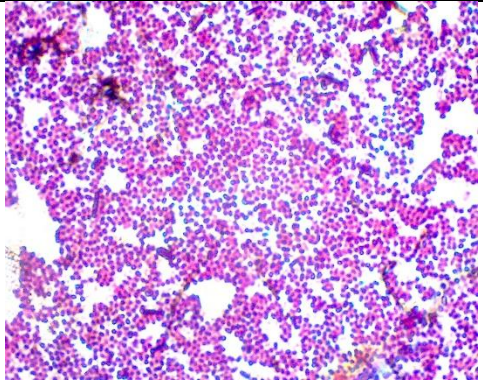
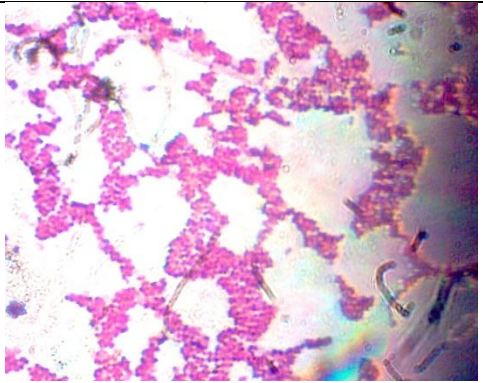
*Los números 1, 2,3 corresponden al punto de muestreo; las letras C, G, corresponden respectivamente al lugar de muestreo Cumandá y Guano; MNPC: muy numeroso para contar.

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

Tabla 5-3: CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE MICROORGANISMOS ANAERÓBICOS

Muestra	Resultados de Tinción	Foto
M1C1	Bacilos Gram +	
	Cocobacilos Gram -	
M1C2	Bacilos Gram +	
	Cocobacilos Gram -	

M2C	Bacilos Gram + esporulados	
M3C1	Bacilos Gram + esporulados	
M3C2	Bacilos Gram +	
M1G1	Bacilos Gram + esporulados	

M2G1	Bacilos Gram +	
M2G2	Cocobacilos Gram + y Gram -	
M3G	Cocobacilos Gram -	

*Los números después de las letras C o G significan que son dos cepas distintas en la misma muestra.

Realizado por: Moreno J ; Velarde K, 2016

Existe una gran cantidad de bacilos Gram positivos en su mayoría como se ha demostrado en los resultados anteriores que incluso se desarrollan en condiciones anaeróbicas, lo que manifiesta que el suelo es un sistema complejo en donde se desarrollan una gran cantidad de microorganismos que pueden sobrevivir en ambientes aeróbicos como anaeróbicos.

C. Identificación del número de organismos por ml de inculo.

Transcurridas las 24 horas de incubación en la estufa y a 37 °C con una dilución de 10^{-6} obtuvimos los siguientes resultados:

Según la Guía de interpretación 3M (2013) para Recuento de Aerobios Totales son un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador de color rojo que facilita el recuento de las

colonias. Las Placas Petrifilm AC se utilizan para el recuento de la población total existente de bacterias aerobias en productos, superficies, etc.

En la tabla 6-3 se muestra el recuento de microorganismos aerobios totales por mililitro de inóculo en placa Petrifilm. En el Anexo B se presentan los cálculos correspondientes para las Placas Petrifilm en las que se requirió aplicar el método indicado.

Tabla 6-3: RECUENTO DE AEROBIOS TOTALES

Muestra	Dilución	Resultado UFC/ml
M1C	10 ⁻⁶	1,2x10 ⁸
M2C	10 ⁻⁶	1,2x10 ⁸
M3C	10 ⁻⁶	2,2 x10 ⁹
M1G	10 ⁻⁶	MNPC
M2G	10 ⁻⁶	MNPC
M3G	10 ⁻⁶	MNPC

*Los números 1, 2,3 corresponden al punto de muestreo; las letras C, G, corresponden respectivamente al lugar de muestreo Cumandá y Guano; MNPC: muy numeroso para contar.

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

Según la Guía de interpretación 3M (2013) para recuento de mohos y levaduras contienen un indicador colorante para levaduras y mohos para proporcionar contraste y facilitar el recuento. Los mohos se presentan como colonias grandes, verdes, con bordes difusos y un foco central, mientras que las levaduras son pequeñas, de color tostado, con bordes definidos y sin foco.

Se puede observar claramente que existen la presencia de mohos y levaduras en las muestras analizadas.

La tabla 7-3: RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS POR ML DE INÓCULO.

Muestra	Dilución	Resultado UPC/ml
M1C	10 ⁻⁶	0
M2C	10 ⁻⁶	6 x10 ⁷ mohos
		2,1 x10 ⁸ levaduras
M3C	10 ⁻⁶	3,6 x10 ⁸ levaduras
M1G	10 ⁻⁶	TNTC
M2G	10 ⁻⁶	9 x10 ⁷ mohos
M3G	10 ⁻⁶	TNTC mohos

*Los números 1, 2,3 corresponden al punto de muestreo; las letras C, G, corresponden respectivamente al lugar de muestreo Cumandá y Guano; TNTC: demasiado numeroso para contar.

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

En la muestra M1C se reportó como 0 en la lectura porque la placa presento un color uniforme en el medio esto debido a la presencia de la “fosfatasa natural” en la muestra analizada.

Todas las células vivas contienen el enzima fosfatasa. En presencia de la fosfatasa el indicador de las placas de Petrifilm Levaduras y Mohos se activa y las colonias de levaduras y mohos se colorean de azul. (3M, 2013).

Adicionalmente a esto se realizó dos pruebas de *Salmonella* y *E. Coli/Coliformes* y *Staphylococcus aureus* tomando aleatoriamente 2 muestras; en este caso se toma la muestra 1 de Cumandá.

a. Recuento de *Salmonella*

El análisis realizado reportan la ausencia de este tipo de bacterias después de ser observadas en un tiempo de 24 horas de incubación.

b. Recuento de *E. Coli/Coliformes*

Según la Guía de interpretación 3M (2013) las Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E.coli/Coliformes* (Placa Petrifilm EC) contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias.

Los resultados indican 1 sola colonia lo cual indica que tiene 2×10^7 UFC/ml.

c. Sistema de Recuento 3M Petrifilm Staph Express

La placa de recuento Petrifilm Staph Express contiene un sistema de medio de cultivo preparado. El medio cromogénico tipo Baird-Parker modificado es selectivo y diferencial para *Staphylococcus aureus*. El *Staphylococcus aureus* se manifiesta en la placa bajo la forma de colonias rojo-violeta. (3M, 2013).

En la identificación de *Staphylococcus aureus* se reporta la usencia de estas bacterias debido a que las colonias características presentan un color rojo-violeta, pero en este caso se evidenció colonias azul-verdosas las cuales no son colonias de *S. aureus*.

La figura 1-3 indica los resultados del recuento de microorganismos en placas 3M™ Petrifilm™.

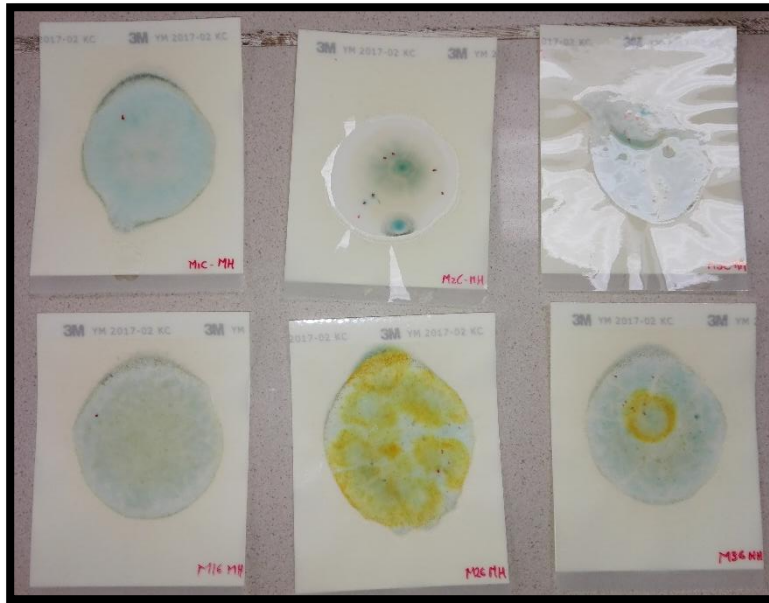


Figura 1-3: Recuento de microorganismos en placas 3M™ Petrifilm™

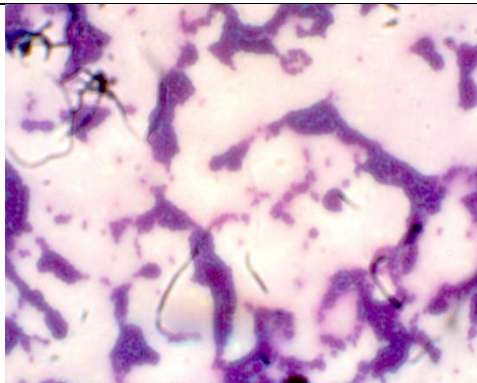
Fuente: Moreno J; Velarde K, 2016

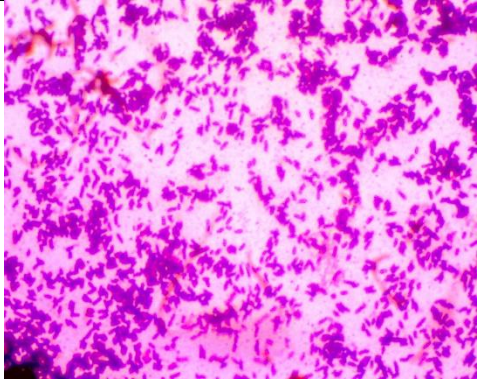
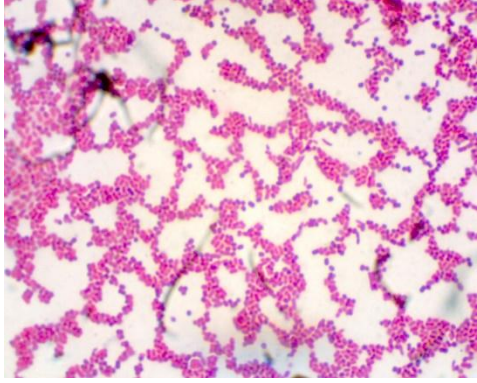
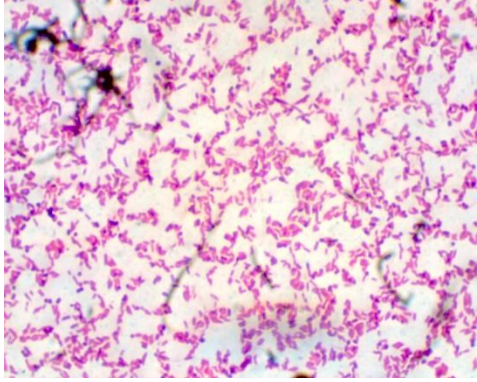
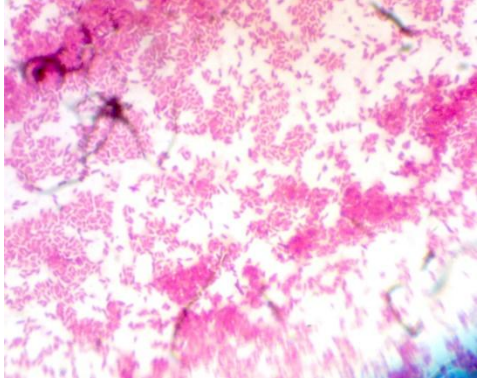
D. Rango de comodidad calorífica

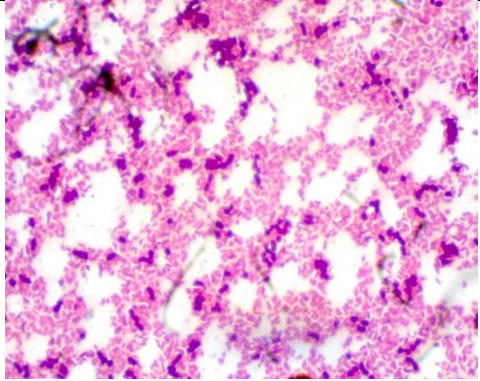
a. Microorganismos Psicrófilos

Los resultados obtenidos para microorganismos sometidos a una temperatura de 5 °C se muestran en la tabla 7-3.

Tabla 8-3: MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS.

Muestra	Resultados de Tinción	Foto
M1C	Cocos Gram +	

M2C	Cocobacilos Gram -	
M3C	Cocobacilos Gram -	
	Cocos Gram +	
M1G	Cocobacilos Gram -	
M2G	Cocobacilos Gram -	
M3G	Cocobacilos Gram -	

	Cocobacilos Gram +	
--	--------------------	--

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

A diferencia de los resultados anteriores en donde los microorganismos están en las condiciones óptimas para su desarrollo, podemos observar que a temperaturas bajas no encontramos ningún tipo de bacilos en ninguna de las muestras; cómo podemos determinar en la tabla 7-3 según la morfología existe la presencia de cocobacilos Gram positivos y Gram negativos únicamente.

A temperaturas inferiores a la óptima, la velocidad de crecimiento de los microorganismos disminuye y los periodos de latencia se alargan mucho.

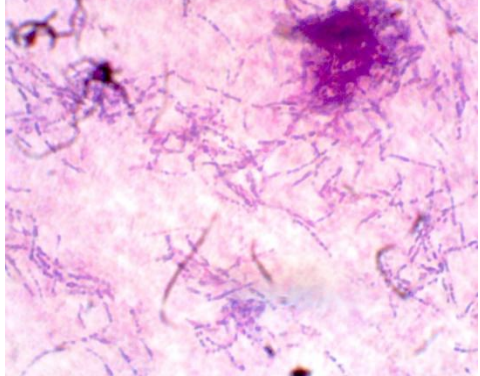
A una temperatura de refrigeración (0 - 5° C) los organismos psicrófilos crecen más rápidamente que los mesófilos. (Microbiología General, 2008)

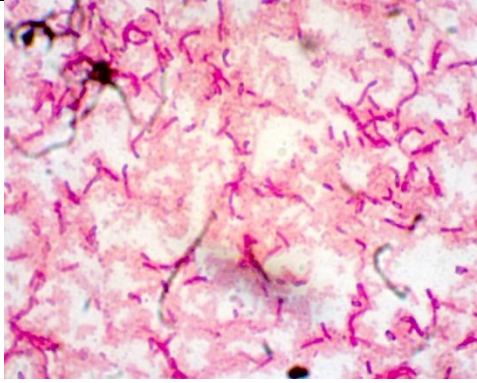
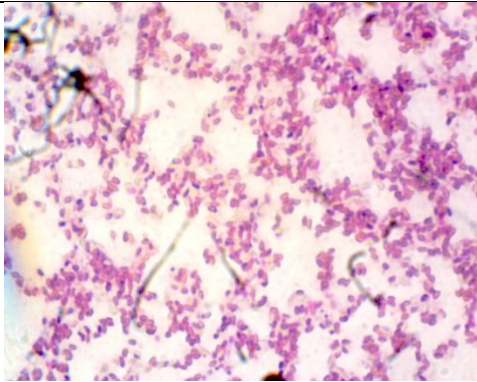
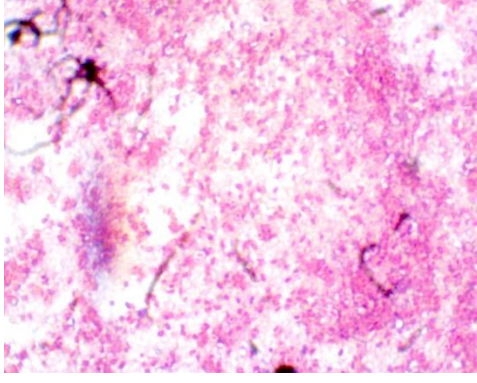
b. Microorganismos mesófilos

Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 2-3 de las características microscópicas ya que esta es la temperatura más óptima para el crecimiento de bacterias es decir a 37 °C.

c. Microorganismos Termófilos

Tabla 9-3: MICROORGANISMOS TERMÓFILOS

Muestra	Resultados de Tinción	Foto
M1C	Bacilos Gram + esporulados	

M2C	Bacilos Gram +	
M3C	No hubo crecimiento	
M1G	No hubo crecimiento	
M2G	Cocobacilos Gram -	
M3G	Cocobacilos Gram -	
	Cocobacilos Gram +	

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

Existen microorganismos que pueden resistir a temperaturas por encima de la adecuada, es decir temperaturas mínima de 45°C, siendo la más óptima para su desarrollo de 55 - 75 °C.

Mediante las técnicas de tinción nos permitió identificar ciertos grupos morfológicos como son Bacilos Gram +, Bacilos Gram + esporulados y ciertos cocobacilos Gram + y Gram -.

Los microorganismos termófilos se desarrollan a temperaturas relativamente altas. Se desarrollan a temperaturas superiores a 45 °C por ejemplo organismos que viven en la superficie del suelo bajo radiación solar directa, en el compost, etc. (EcuRed, 2016) como es en el caso de la muestra 3 de Cumandá y muestra 1 de Guano donde no se evidenció crecimiento, ya que en estos puntos

no hubo radiación solar directa por lo tanto estos microorganismos no resistieron este rango de temperatura.

3.1.3. Pruebas Bioquímicas de las cepas bacterianas

3.1.3.1. Potencial de acidificación

El medio Kligler nos permitió determinar que los microorganismos aislados fermentan glucosa y lactosa, además de identificar la formación de ácido sulfhídrico (H₂S).

La lactosa y la glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el citrato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe³⁺, los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agar es el agente solidificante. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. 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. (BritaniaLab, 2011)

Los resultados obtenidos en este análisis nos indican que existe la presencia de microorganismos que fermentan principalmente glucosa.

3.1.3.2. Uso de carbohidratos

Después de realizar la prueba se puede verificar que las cepas sometidas en la galería API 20 NE (BioMérieux), fermentan algunos azúcares de la prueba verificado por el viraje de color en los microtubos donde se encuentra la muestra.

En el anexo C se muestran las lecturas en base al cambio de color que presentan las cepas cuando fermentan el azúcar.

Las 6 cepas analizadas fermentan los siguientes azúcares:

Glu (D-glucosa), L-arginina, urea, esculina citrato férrico, gelatina (hidrólisis (proteasa) (GELatina)), Glu (D-glucosa, asimilación de glucosa).

A diferencia de las otras cepas analizadas la cepa de la muestra 2 tomada de Guano tubo un cambio significativo de color en el azúcar 4-nitrofenil-EDgalactopiranosida; el cual no se produjo en las otras reacciones.

En la tabla 9-3 se muestra en detalle el resultado obtenido de las pruebas de potencial de acidificación utilizando el medio Kligler y de uso de carbohidratos con la prueba API 20 NE.

Tabla 10-3: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

Muestra	Acidificación (Kligler)				Galería API 20 NE																				
	Glucosa	Glucosa/Lactosa	H ₂ S	GAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
M1C	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2C	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3C	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1G	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2G	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3G	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

De estas pruebas fermentativas realizadas podemos verificar que las cepas bacterianas analizadas fermentan principalmente glucosa como se puede observar realizando la prueba de Kligler y así mismo la galería API; esto debido a que existen microorganismos en los cuales su principio activo es la fermentación de ciertas sustancias como por ejemplo bacterias del ácido láctico que son fermentadores de azúcares y de otros carbohidratos y también debido a la presencia de bacterias fotosintéticas que son capaces de sintetizar algunas sustancias útiles (aminoácidos, ácidos nucleicos, compuestos bioactivos y azúcares).

La cepa M3C y M1G producen H₂S que se registró por la presencia de un color negro esto debido a que se encuentra en un medio ácido y por lo tanto quiere decir que hubo fermentación por parte de los microorganismos.

La cepa M2C, M3C, M1G indican además la presencia de gas al observar el desprendimiento y ruptura del agar, lo cual indica también que se está dando un proceso fermentativo.

3.1.3.3. Potencial de degradación de celulosa

a. Escala de McFarland

Utilizar la escala de McFarland nos permitió determinar la concentración aproximada del inóculo bacteriano que vamos a utilizar para realizar la prueba de degradación de celulosa de los microorganismos aislados desde suelos de montaña y subtrópico.

En el anexo H se presentan los resultados obtenidos de la lectura con el espectrofotómetro tanto de los 10 estándares de la escala de McFarland así como de las cepas bacterianas de cada punto de muestreo.

A continuación en el gráfico 1-3 se presentan los valores de los 10 estándares de McFarland con los valores obtenidos en el espectrofotómetro, respectivamente.

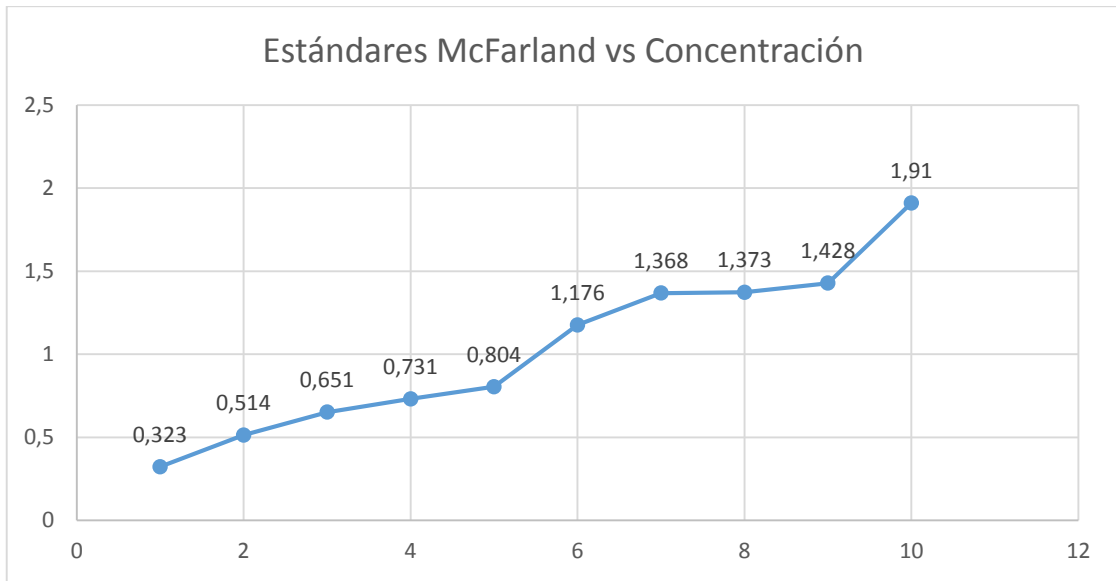


Grafico 1-3. Resultados de los 10 estándares de McFarland y sus concentraciones.

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

El grafico 2-3 y 3-3 representan respectivamente las cepas de cada punto de muestreo con los valores obtenidos de la lectura mediante espectrofotometría.

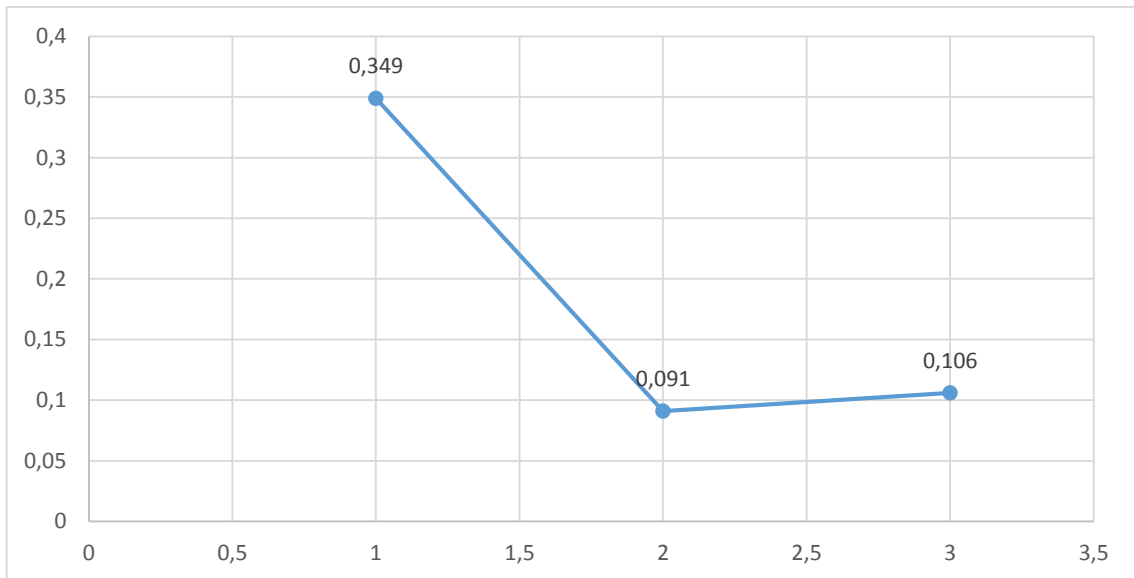


Grafico 2-3. Resultados de los 3 puntos de las cepas en los 3 puntos de muestreo de Cumandá.

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

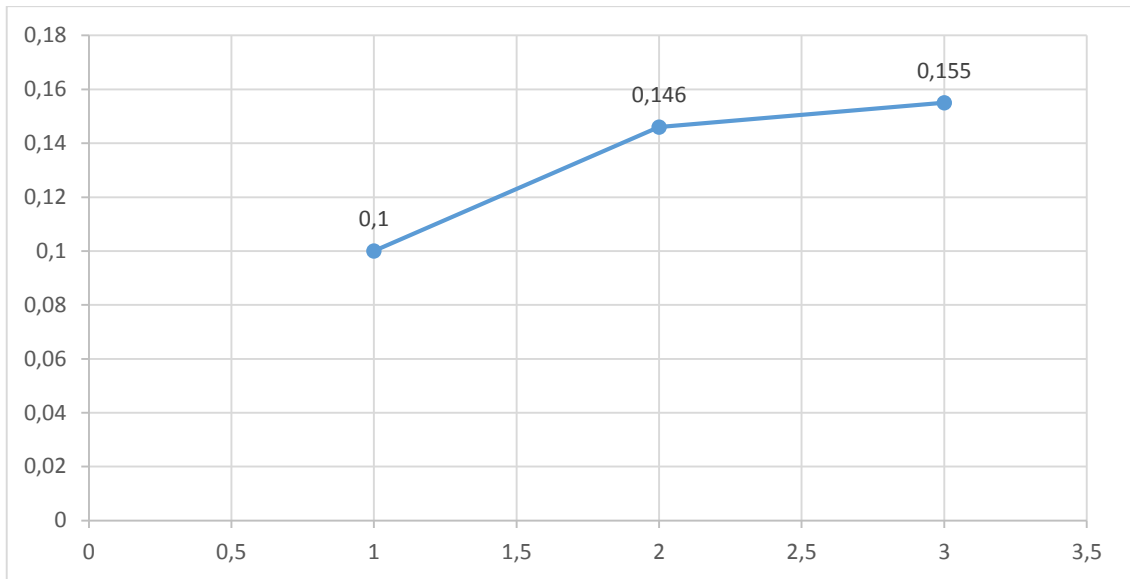


Grafico 3-3. Resultados de los 3 puntos de las cepas en los 3 puntos de muestreo de Guano.

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

Para obtener la concentración de ufc/ml en las cepas de estudio se obtiene de la gráfica 1-3 los valores más representativos es decir de los que no haya una variación mayor; por lo tanto se toman 3 puntos del intervalo 0,514-0,731 y tomamos aleatoriamente el valor intermedio de este intervalo que es 0,651.

En el anexo H podemos observar que el valor obtenido 0,651 se obtiene de sacar la media de las tres lecturas realizadas para el estándar 3 de McFarland, por lo tanto quiere decir que este tiene un valor de u.f.c/ml de $9,0 \times 10^8$.

Para obtener los valores que se encuentran en la tabla 10-3 de los resultados de u.f.c/ml para cada cepa bacteriana analizada se realizó un regla de tres tomando como referencia el valor 0,651 de la siguiente manera:

- **M1C**

$$\frac{0,651}{0,349} \rightarrow \frac{9 * 10^8}{x}$$

- **M2C**

$$\frac{0,651}{0,091} \rightarrow \frac{9 * 10^8}{x}$$

- **M3C**

$$\frac{0,651}{0,106} \rightarrow \frac{9 * 10^8}{x}$$

- **M1G**

$$\frac{0,651}{0,100} \rightarrow \frac{9 * 10^8}{x}$$

- **M2G**

$$\frac{0,651}{0,146} \rightarrow \frac{9 * 10^8}{x}$$

- **M3G**

$$\frac{0,651}{0,155} \rightarrow \frac{9 * 10^8}{x}$$

Donde:

x: valor resultante mostrado en la tabla 10-3.

Tabla 11-3: RESULTADOS DE LAS U.F.C/ML DE LAS CEPAS BACTERIANAS DE CADA LUGAR DE MUESTREO.

Muestra	u.f.c/ml
M1C	4,82x10 ⁸
M2C	1,25x10 ⁸
M3C	1,46x10 ⁸
M1G	1,38x10 ⁸
M2G	2,01x10 ⁸
M3G	2,14x10 ⁸

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

b. Prueba de degradación de celulosa

Se observaron las cajas Petri en un lapso de 24 h, 48 h y 72 h para verificar si existe degradación de celulosa por parte de las cepas bacterianas analizadas y se observó que las bacterias no degradaron la celulosa debido a que el papel seguía intacto.

Lo que nos indica que no hay degradación por parte de los microorganismos eficientes aislados de suelos de montaña y subtropical es que este tipo de microorganismos no son degradadores de celulosa, pero si son fermentadores de ella.

La celulosa es un carbohidrato que puede ser degradada por fermentación.

De la fermentación de celulosa algunos de los productos resultantes son: alcoholes, ácidos orgánicos, anhídrido carbónico e hidrogeno; aquellos productos quedan a disposición de ciertas bacterias las cuales realizan procesos especiales de fermentación, incluso la fermentación anaeróbica, mediante la cual producen como producto final metano, y en presencia de sulfato, sulfhídrico. (Mandujano, 2010).

CONCLUSIONES

- ✚ Se aislaron microorganismos eficientes de tierra de montaña y subtropical utilizando la técnica del arroz cocido descrito por el Dr. Teruo Higa en la década de los 80, inoculándolo en medios selectivos tanto para bacterias como para hongos determinando que estos poseen un gran potencial biotecnológico.
- ✚ La caracterización in vitro de las cepas microbianas permitieron definir la morfología de los mismos a nivel de subtropical donde se presentan características variadas en relación a los aislados de montaña en donde no hay mayor variedad, esto puede darse debido a la diferencia notoria de temperatura y el tipo de suelo. En todos los puntos de muestreo se determinaron la existencia en mayor porcentaje de Bacterias Gram Positivas incluso en ambientes anaeróbicos como en ambientes de bajas y altas temperaturas. En cuanto a Hongos utilizando la coloración con azul de metileno permitieron identificar hongos miceliales con características marcadas por la formación de micelios, además con la Tinción Gram se demostró la presencia de una gran cantidad de levaduras tomando en cuenta su morfología.
- ✚ Las pruebas bioquímicas realizadas demostraron que las cepas bacterianas aisladas tienen una gran capacidad fermentativa de sustratos principalmente ricos en glucosa lo cual nos indica que este tipo de microorganismos encontrados son muy útiles en procesos fermentativos. Estos microorganismos demostraron que no son degradadores de celulosa pero si tienen potencial para ser fermentadores, los cuales pueden dar como producto final alcoholes, ácidos orgánicos, anhídrido carbónico e hidrogeno.
Por su capacidad fermentativa estos microorganismos pueden ser utilizados como activadores de Biofertilizantes o abonos orgánicos, además puede ayudar a la fermentación de materia orgánica.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar la caracterización molecular de las cepas bacterianas para determinar a qué género y familia pertenecen y así determinar de una manera más concreta que tipos de bacterias se encuentran en las mezclas que conforman los microorganismos eficientes.
- ✓ Ampliar las pruebas bioquímicas realizadas a los microorganismos para poder determinar su uso potencial biotecnológico en los diferentes campos industriales.
- ✓ Se recomienda el estudio a detalle de los hongos para verificar los procesos que estos llevan a cabo, mediante pruebas idóneas para este tipo de microorganismos.
- ✓ Con las cepas bacterianas aisladas realizar pruebas de campo posteriores para verificar su actividad biotecnológica.
- ✓ Experimentar la eficiencia de las bacterias con distintos sustratos que contengan celulosa y con diferentes concentraciones para determinar si los microorganismos son capaces de degradar celulosa.
- ✓ Se recomienda aplicar las bacterias aisladas en procesos que involucren principalmente fermentación utilizando sustratos que contengan carbohidratos.

BIBLIOGRAFIA

3M. Guía de interpretación. Ecuador, 2003

ACOSTA ALMÁNZAR, Henry Agustín. *Microorganismos eficientes de montaña: evaluación de su potencial bajo manejo agroecológico de tomate en Costa Rica* [En línea] (Tesis) (Maestría) Centro Agrónomo Tropical de Investigación y Enseñanza, Escuela de Posgrado. Turrialba–Costa Rica. 2012. pp. 27-37. [Consulta: 28 de Octubre de 2016]. Disponible en: http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/3123/Microorganismos_eficientes_de_montana.pdf;jsessionid=F6A6FF46B410C1738CFD700B3E00055C?sequence=1

ANANTH, Rao. *Biotechnology* [En línea] New Delhi –India: 2007. [Consulta: 28 de Octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.jaypeedigital.com/Book/BookDetail?isbn=9788180619984>

ARRELLANO YACASA, Diana Victoria & YAMBAY DAMIÁN, Carmen Rocío. *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] (Tesis) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas. (Riobamba – Ecuador). 2016. pp. 22-29. [Consulta: 24 de Octubre de 2016]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4955/1/236T0202.pdf>

BID, Banco Interamericano de Desarrollo. *Manual práctico de uso de EM.* [En línea]. Uruguay: 2009. [Consulta: 22 de Noviembre de 2016]. Disponible en: http://www.emuruguay.org/images/Manual_Practico_Uso_EM_OISCA_BID.pdf

BIOMÉRIEUX. *Sistemas miniaturizados API* [En línea] 2010. [Consulta: 14 de Noviembre de 2016]. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Sistemas_API.pdf

BRITANIALAB. *Kligler Hierro Agar* [En línea] 2011. [Consulta: 20 de Octubre de 2016]. Disponible en: <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/kliglerhierroagar.htm>

CAMACHO LÓPEZ, Christian Orlando. *Caracterización y evaluación de bacterias para producción de bioplástico de origen microbiano utilizando como sustrato agua residual de la industria láctea, 2015*[En línea] (Tesis) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas. (Riobamba – Ecuador). 2016. pp. 11-12. [Consulta: 26 de Octubre de 2016]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4962#sthash.QNisiOdK.dpdf>

CASADO GONZÁLEZ, María Concepción. *Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología* [En línea]. 2012. [Consulta: 21 de Noviembre de 2016]. Disponible en: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>

CASTRO, Jonathan. *Microorganismos de montaña* [En línea]. 11 de Junio de 2015. [Consulta: 25 de Octubre de 2016]. Disponible en : https://prezi.com/8qgb5yin_s8n/microorganismos-de-montana/

CATAGÑA CHASIPANTA, Alicia Jazmín & NOBOA TAPIA, Diana Pamela. *Producción, caracterización y evaluación del biol de la EMMAIPC-EP, cañar, a partir de residuos orgánicos urbanos, en pastizales ganaderos.* [En línea](Tesis) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas. (Riobamba – Ecuador). 2016. pp. 14-16. [Consulta: 28 de Octubre de 2016]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4909/1/236T0189.pdf>

CORONA, M. *Historia de la biotecnología y sus aplicaciones.* 2011, pp. 34

CRUZ MORA, Nathalie. Aprovechamiento y manejo de desecho orgánicos de cocina utilizando microorganismos eficientes de montaña (MEM) aislados de dos bosques secundarios de Costa Rica. (Tesis). [En línea] Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. (Cartago-Costa Rica). 2010. pp. 20-24. [Consulta: 5 de Noviembre de 2016]. Disponible en: <http://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/2867?show=full>

DÍAZ MARTÍNEZ, Vicente. *Los colores de la biotecnología* [En línea]. 10 de Febrero de 2011. [Consulta: 26 de Octubre de 2016]. Disponible en: https://biotechspain.com/es/tema.cfm?iid=colores_biotecnologia

ECURED. *Microorganismos* [En línea] 23 de Noviembre de 2016. [Consulta: 9 de Noviembre de 2016]. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Microorganismo>

ENRIQUEZ BRITO, Jorge Luis & VIERA BRIONES, Jorge Luis. *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](Tesis)Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la producción. (Guayaquil- Ecuador). 2010. pp. 2-11. [Consulta: 28 de Octubre de 2016]. Disponible en: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/9017/1/Caracterizaci%C3%B3n%20preliminar%20de%20aislamiento%20de%20microorganismos.pdf>

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura. *El papel de la FAO en la biotecnología.* [En línea]. 2015. [Consulta: 26 de Octubre de 2016.]Disponible en: <http://www.fao.org/ag/portal/agp/agp-news/detail-es/es/c/379208/>

GARCÍA ZAPATA, Liceth Cristina. *Microorganismos eficientes del suelo* [En línea]. Caldas-Colombia. 17 de Mayo de 2013. [Consulta: 15 de Octubre de 2016]. Disponible en: <https://microindustrialasalle.wordpress.com/>

GARCIA IBARRA, Juan Antonio. *Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación* [En línea] (Tesis) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. (Pachuca de Soto-Hidalgo). 2007. pp. 28 [Consulta: 03 de Noviembre de 2016]. Disponible en : <http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10742/Identificacion%20de%20bacterias.pdf?sequence=1>

GRAU ROLDÁN, Joaquín; et al. *Tipos de biotecnología* [blog].2013. [Consulta: 03 Julio 2015]. Disponible en: <http://alvavicjoa.blogspot.com/2013/01/0.html>

HARRISON, Lea. “La fertilidad de los suelos”. *Tierramor* [En línea], 2001, [Consulta: 25 de Octubre de 2016]. Disponible en : <http://www.tierramor.org/Articulos/Fertilidad%20de%20suelos.htm>

HERNANDEZ FONSECA, Hugo. “Biotecnología”. *Rev. Cient. (Maracaibo)* [En línea], 2010, vol20. n.3, pp.225-226. [Consulta: 19 Octubre 2016].ISSN 0798-2259. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300001

HIGA, Teruo. *Una revolución para salvar la tierra.* Tarragona- España: Enro Europe Branch, 2002, pp. 25-40.

IDIAF, Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. *Beneficios de los microorganismos eficientes en la agricultura* [En línea]. 2009. [Consulta: 19 Octubre 2016]. Disponible en: <http://www.idiaf.gov.do/noticias/detallemain.php?ID=971>

IBAÑEZ, Juan José. *Microorganismos Eficientes o Efectivos (EM) y Rehabilitación de Suelos* [blog]. 2 de Marzo de 2011. [Consulta: 5 de Noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2011/03/02/137556>

KONEMAN. *Diagnóstico Microbiológico.* 6^{ta} ed. Barcelona-España: Medica Panamericana, 2006, pp.164

MADIGAN, Michael; et al. Paul. *Biología de los microorganismos.* 12^{ma} ed. Madrid- España: Pearson Educación, S.A, 2009, pp. 754-757.

MANDUJANO AYLAS, Irma. *Fermentaciones Microbianas* [En línea]. Perú: 2010. [Consulta: 23 de Noviembre de 2016]. Disponible en: <http://es.calameo.com/books/00054616768e49014af88>

MICROBIOLOGIA GENERAL, *Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos* [En línea], 2008. [Consulta: 22 de Noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.unavarra.es/genmic/cursos/microbiologia%20general/09factores%20de%20supervivencia.htm>

MICROORGANISMOS EFICIENTES Y AMIGABLES CON EL AMBIENTE. *Tecnología EM, de gran utilidad en la producción agropecuaria.* Medellín- Colombia: Bogotá, 2008, pp. 34-36

MONJARÁS CASTILLEJOS, José Antonio. *Microorganismos de Montaña* [En línea]. México. [Consulta: 12 de Octubre de 2016]. Disponible en: <http://viaorganica.org/microorganismos-de-montana/>

MUÑOZ, E. *Biotecnología y sociedad.* Editorial AKAL. 2001, pp. 56.

OTINIANIANO, Alberto Julca; et al. “La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura”. *Scielo Chile* [En línea], 2006, (Chile) 24 (1), pp. 3-5. [Consulta: 21 de Noviembre de 2016]. ISSN 0718- 3429. Disponible en : http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292006000100009

PALAZON, Pedro. *La importancia de las bacterias e la agricultura* [En línea]. 02 de Enero de 2015. [Consulta: 20 de Octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.ideagro.es/index.php/noticias/75-la-importancia-de-las-bacterias-en-la-agricultura>

PALMA, I.M. *Biocología y medio ambiente*. Editorial Empeñera. 2005

PANIAGUA, Juan José. *Preparación y usos de microorganismos de montaña, líquidos y sólidos* [En línea]. Costa Rica, 2008. [Consulta: 13 de Octubre de 2016]. *Disponible en:* <http://www.fundesyam.info/biblioteca.php?id=1778>

RAMIREZ, Ninfa. “Microorganismos extremófilos Actinomicetos halófilos en México” *Redalyc.org* [En línea], 2006, (Venezuela) 37(3), pp. 57-59. [Consulta: 22 de Noviembre de 2016]. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/579/57937307.pdf>

THIEMAN, Willian J. *Introducción a la Biotecnología*. 2ª ed. Madrid-España: Pearson Educación, S.A, 2010, pp. 2-17.

SAÉZ NIETO, Juan Antonio; et al. “Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología”. *Seimc* [En línea], 2010, (España) vol. (1), pp. 4-7. [Consulta: 20 de Octubre de 2016]. ISSN -978- 84- 614- 7932- 0. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

SALAS RUEDA, Mauricio Xavier. *Identificación de Lactobacillus y levaduras aisladas de excretas fermentadas de aves con potencialidades probióticas* [En línea] (Tesis) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela de Ingeniería Zootécnica. (Riobamba-Ecuador). 2009. pp. 39-42. [Consulta: 23 de Noviembre de 2016]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1390/1/17T0893.pdf>

SILVERIO, Sergio M. *Microbiología Agrícola*. La Habana: Pueblo y Educación, 1989, pp. 122-124.

SOUSA FONSECA, Áurico. *Pruebas Bioquímicas* [En línea]. 2012. [Consulta: 06 de Octubre de 2016]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/115599303/Pruebas-Bioquimicas-Proteinas-Tolerancia-Carbohidratos>

WEBMASTER. "Microorganismos eficientes (EM)". La Ganadería, (2009). pp. 1- 4.

WISEMAN, Alan. *Principios de la Biotecnología*. Zaragoza- España: Acribia, S.A, 1986, pp. 14-18.

ANEXOS

ANEXO A. GEOREFERENCIACION DE LUGAR DE MUESTREO



ANEXO B. CÁLCULO DEL NÚMERO DE COLONIAS

Muestra	N° colonias aerobios Mesófilos (37°C)	N° colonias anaeróbicos	Área de la caja (cm)	PESO (g)
M1C	MNPC	32	65	1g
M2C	15	1	65	1g
M3C	MNPC	MNPC	65	1g
M1G	20	3	65	1g
M2G	75	3	65	1g
M3G	85	2	65	1g

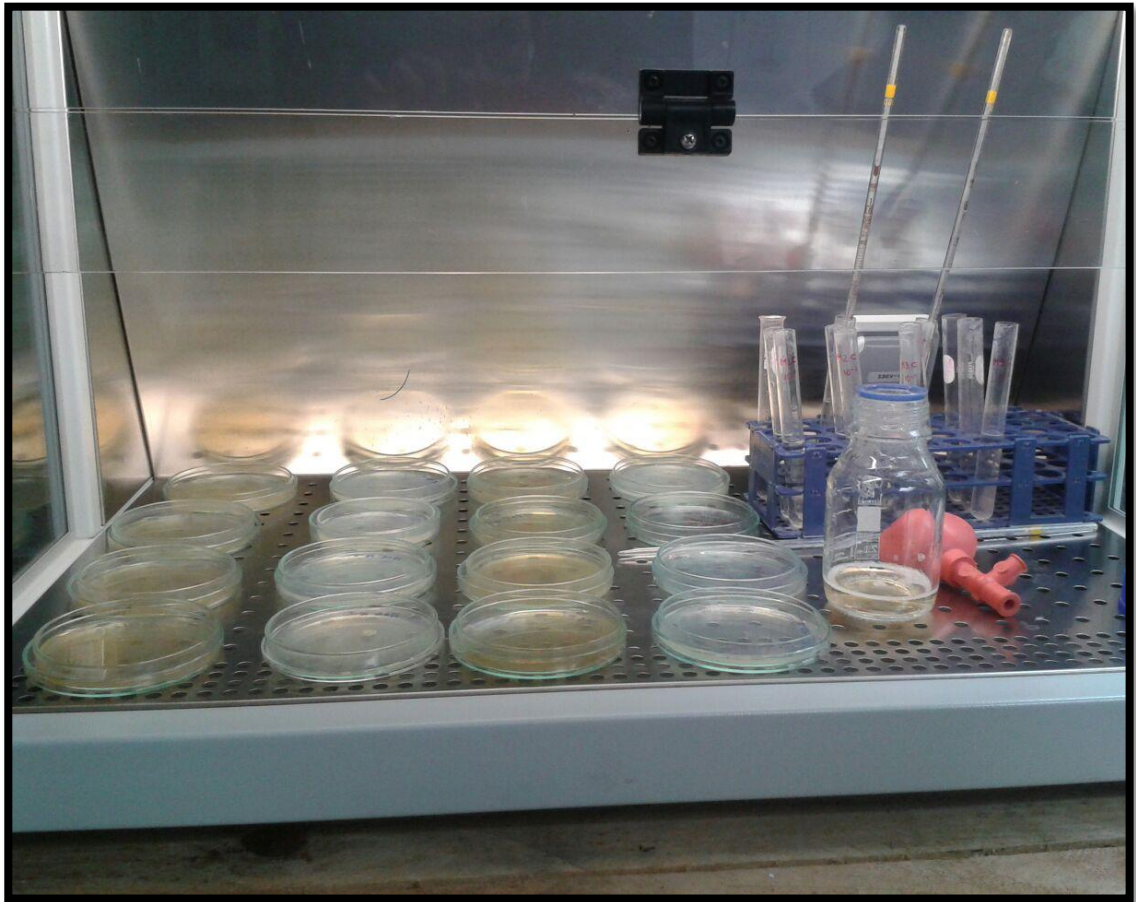
Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

ANEXO C. CÁLCULO DEL NÚMERO DE ORGANISMOS POR ML DE INÓCULO

Muestra	N° colonias Aerobios Totales	N° colonias mohos levaduras	N° colonias Escherichia/coliformes	Área de inoculación (cm²) Aerobios Totales	Área de inoculación (cm²) mohos levaduras	Área de inoculación (cm²) Escherichia/coliformes	ml de inóculo
M1C	6	0	1	20	30	20	1 ml
M2C	6	2 mohos 7 levaduras		20	30	20	1ml
M3C	108	12 levaduras		20	30	20	1ml
M1G	MNPC	TNTC levaduras		20	30	20	1ml
M2G	MNPC	4 mohos		20	30	20	1ml
M3G	MNPC	TNTC mohos		20	30	20	1ml

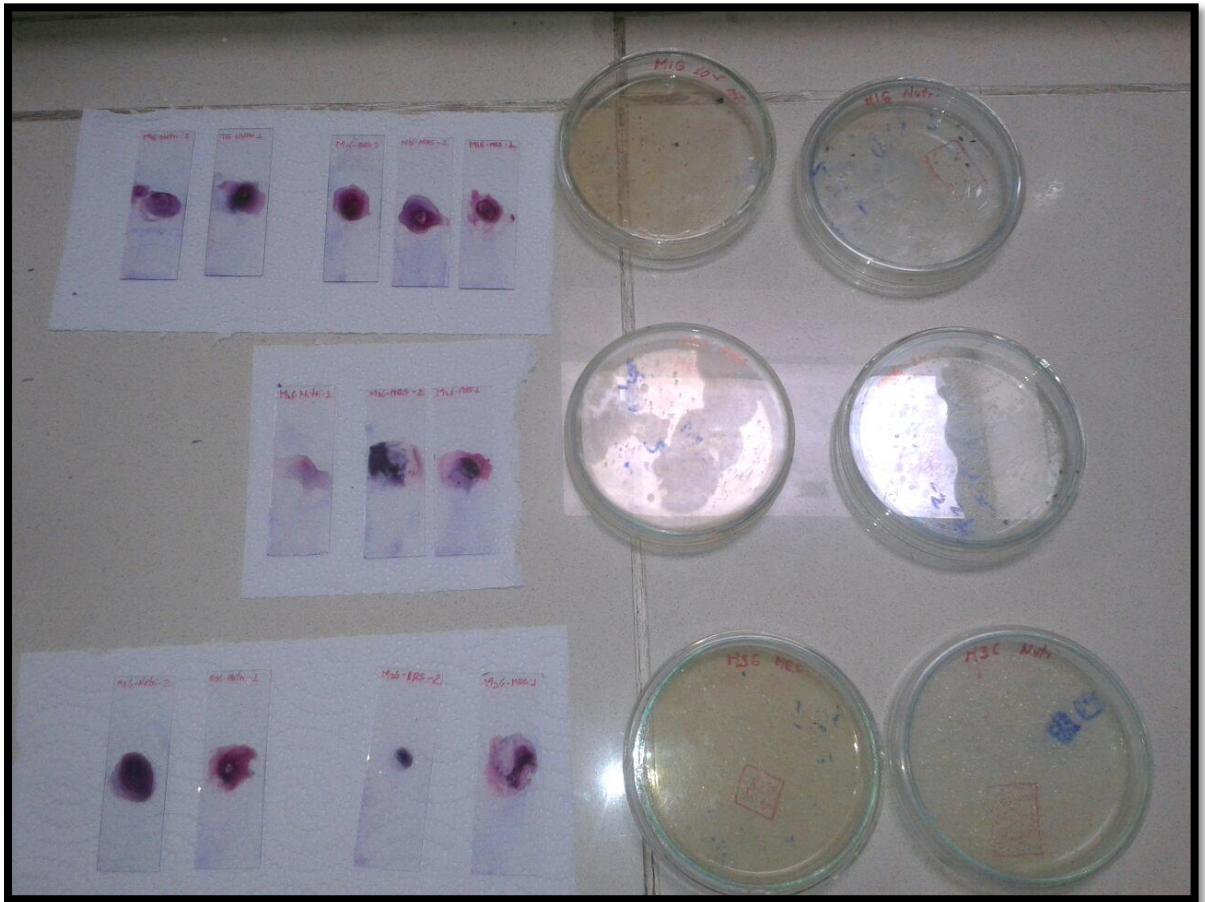
Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

ANEXO D. SIEMBRA DE MICROORGANISMOS EN CULTIVOS GENÉRICOS



Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

ANEXO E. REALIZACION DE TINCION GRAM



Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

ANEXO F. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE KLIGLER



M1C: Glucosa + (pico rojo/fondo amarillo)



M2C: Glucosa + (pico rojo/fondo amarillo), producción de gas (desprendimiento del agar)



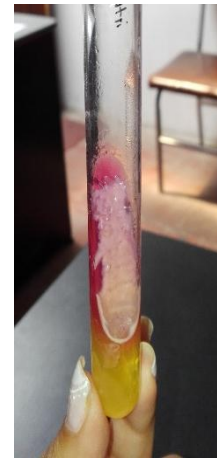
M3C: Glucosa + (pico rojo/fondo amarillo), producción de gas (desprendimiento del agar), presencia de H₂S(color negro)



M1G: Glucosa + (pico rojo/fondo amarillo), producción de gas (desprendimiento del agar), presencia de H₂S(color negro)




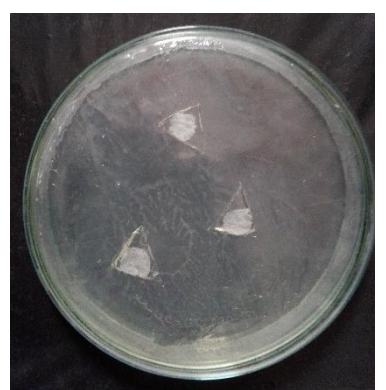




M2G: Glucosa + (pico rojo/fondo amarillo)



M2G: Glucosa + (pico rojo/fondo amarillo)

ANEXO G. PRUEBA DE DEGRADACIÓN DE CELULOSA

		
<p>M1C: Trazas de papel (fuente de celulosa), $4,82 \times 10^8$ u.f.c/ml</p>	<p>M2C: Trazas de papel (fuente de celulosa), $1,25 \times 10^8$ u.f.c/ml</p>	<p>M3C: Trazas de papel (fuente de celulosa), $1,46 \times 10^8$ u.f.c/ml</p>
		
<p>M1G: Trazas de papel (fuente de celulosa), $1,38 \times 10^8$ u.f.c/ml</p>	<p>M2G: Trazas de papel (fuente de celulosa), $2,01 \times 10^8$ u.f.c/ml</p>	<p>M3G: Trazas de papel (fuente de celulosa), $2,14 \times 10^8$ u.f.c/ml</p>

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

ANEXO H. RESULTADOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA

HEXIOSP ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60 PÁGI. 1

FECHA:03/10/16 SERIE No:140113 ID :
HORA :11:01:54 OPERARIO :

SELEC. λ:SENCILLA ANCHOBANDA:2.0nm INTEGRACION:1s
CAMBIAR LAMP:325nm TIEMP RETRASO:00:00
LONG. ONDA:625.0nm

MUESTRA	ABS	MUESTRA	ABS
1	1.377		
2	1.355		
3	1.388		
4	1.490		
5	1.398		
6	1.397		
7	1.920		
8	1.902		
9	1.908		

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

HEXIOSP ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60 PÁGI. 1

FECHA:03/10/16 SERIE No:140113 ID :
HORA :11:15:50 OPERARIO :

SELEC. λ:SENCILLA ANCHOBANDA:2.0nm INTEGRACION:1s
CAMBIAR LAMP:325nm TIEMP RETRASO:00:00
LONG. ONDA:625.0nm

MUESTRA	ABS	MUESTRA	ABS
1	0.354		
2	0.347		
3	0.347		
4	0.091		
5	0.091		
6	0.092		
7	0.105		
8	0.107		
9	0.106		
10	0.100		
11	0.101		
12	0.100		
13	0.145		
14	0.146		
15	0.146		
16	0.154		
17	0.155		
18	0.157		

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

FECHA:03/10/16 SERIE No:140113 ID :
 HORA :10:34:54 OPERARIO :

SELEC. λ: SENCILLA ANCHOBANDA:2.0nm INTEGRACION:1s
 CAMBIAR LAMP:325nm TIEMP RETRASO:00:00
 LONG. ONDA:625.0nm

MUESTRA	ABS	MUESTRA	ABS
1	0.320		
2	0.324		
3	0.325		
4	0.502		
5	0.520		
6	0.522		
7	0.660		
8	0.644		
9	0.651		
10	0.815		
11	0.812		
12	0.785		
13	0.740		
14	0.738		
15	0.716		
16	1.213		
17	1.177		
18	1.139		
19	1.395		
20	1.356		
21	1.353		
22	1.366		
23	1.316		
24	1.375		
25	1.464		

ANEXO I. CÁLCULO DE LOS VALORES DE ESPECTROFOTOMETRÍA

VALORES ESTANDARES

1	2	3	4	5	6	7
0.320	0.502	0.660	0.740	0.815	1.213	1.395
0.324	0.520	0.644	0.738	0.812	1.177	1.356
0.325	0.522	0.651	0.716	0.785	1.139	1.353
$\bar{x}=0.323$	$\bar{x}=0.514$	$\bar{x}=0.651$	$\bar{x}=0.731$	$\bar{x}=0.804$	$\bar{x}=1.176$	$\bar{x}=1.368$

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

CEPAS BACTERIANAS

M1C	M2C	M3C	M1G	M2G	M3G
0.354	0.091	0.105	0.100	0.145	0.154
0.347	0.091	0.107	0.101	0.146	0.155
0.347	0.092	0.106	0.100	0.146	0.157
$\bar{x}=0.349$	$\bar{x}=0.091$	$\bar{x}=0.106$	$\bar{x}=0.100$	$\bar{x}=0.146$	$\bar{x}=0.155$

Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

ANEXO J. PRUEBA DE USO DE CARBOHIDRATOS



Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

ANEXO K. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE USO DE CARBOHIDRATOS



Realizado por: Moreno J; Velarde K, 2016

ANEXO L. LECTURA GALERÍA API 20NE

ap [®] 20 NE		07515K - es - 2009/11			
TABLA DE IDENTIFICACIÓN					
TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	CANT. (mg/cúp.)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
NO ₃	nitrato potásico	0,136	reducción de Nitratos en nitritos	NIT 1 + NIT 2 / 5 min. incolore rosa-rojo	
			reducción de Nitratos en nitrógeno	Zn / 5 min. rosa incolore	
TRP	L-triptofano	0,2	formación de indole (TRIPtofano)	JAMES / inmediato incolore verde pálido / amarillo rosa	
GLU	D-glucosa	1,92	fermentación (GLUgosa)	azul a verde	amarillo
ADH	L-arginina	1,92	Arginina DiHidrolasa	amarillo	naranja / rosa / rojo
URE	urea	0,76	UREasa	amarillo	naranja / rosa / rojo
ESC	esculina citrate férrico	0,56 0,072	hidrólisis (β-glucosidasa) (ESculina)	amarillo	gris / marrón / negro
GEL	gelatina (origen bovino)	0,6	hidrólisis (proteasa) (GELatina)	sin difusión del pigmento	difusión del pigmento negro
PNPG	4-nitrofenil-βD- galactopiranosida	0,22	β-galactosidasa (Para-NitroFenil-βD- Galactopiranosidasa)	incolore	amarillo
GLU	D-glucosa	1,56	asimilación (GLUcosa)	transparencia	turbio
ARA	L-arabinosa	1,4	asimilación (ARAbinosa)	transparencia	turbio
MNE	D-manosa	1,4	asimilación (MaNosA)	transparencia	turbio
MAN	D-manitol	1,36	asimilación (MANitol)	transparencia	turbio
NAG	N-acetil-glucosamina	1,28	asimilación (N-Acetil-Glucosamina)	transparencia	turbio
MAL	D-maltosa	1,4	asimilación (MALtosa)	transparencia	turbio
GNT	gluconato potásico	1,84	asimilación (GlucoNaTo potásico)	transparencia	turbio
CAP	ácido cáprico	0,78	asimilación (ácido CAPrico)	transparencia	turbio
ADI	ácido adípico	1,12	asimilación (ácido ADIpico)	transparencia	turbio
MLT	ácido málico	1,56	asimilación (MaLaTa)	transparencia	turbio
CIT	citrate trisódico	2,28	asimilación (CITrate trisódico)	transparencia	turbio
PAC	ácido fenilacético	0,8	asimilación (ácido fenilACético)	transparencia	turbio
OX	(ver ficha técnica del ensayo de oxidasa)	-	citocromo-oxidasa	(ver ficha técnica del ensayo de oxidasa)	

• Las cantidades indicadas pueden ser ajustadas en función de los títulos de las materias primas.
• Ciertas cúpulas contienen componentes de origen animal, especialmente peptona bovina/porcina.

Fuente: bioMérieux, 2003