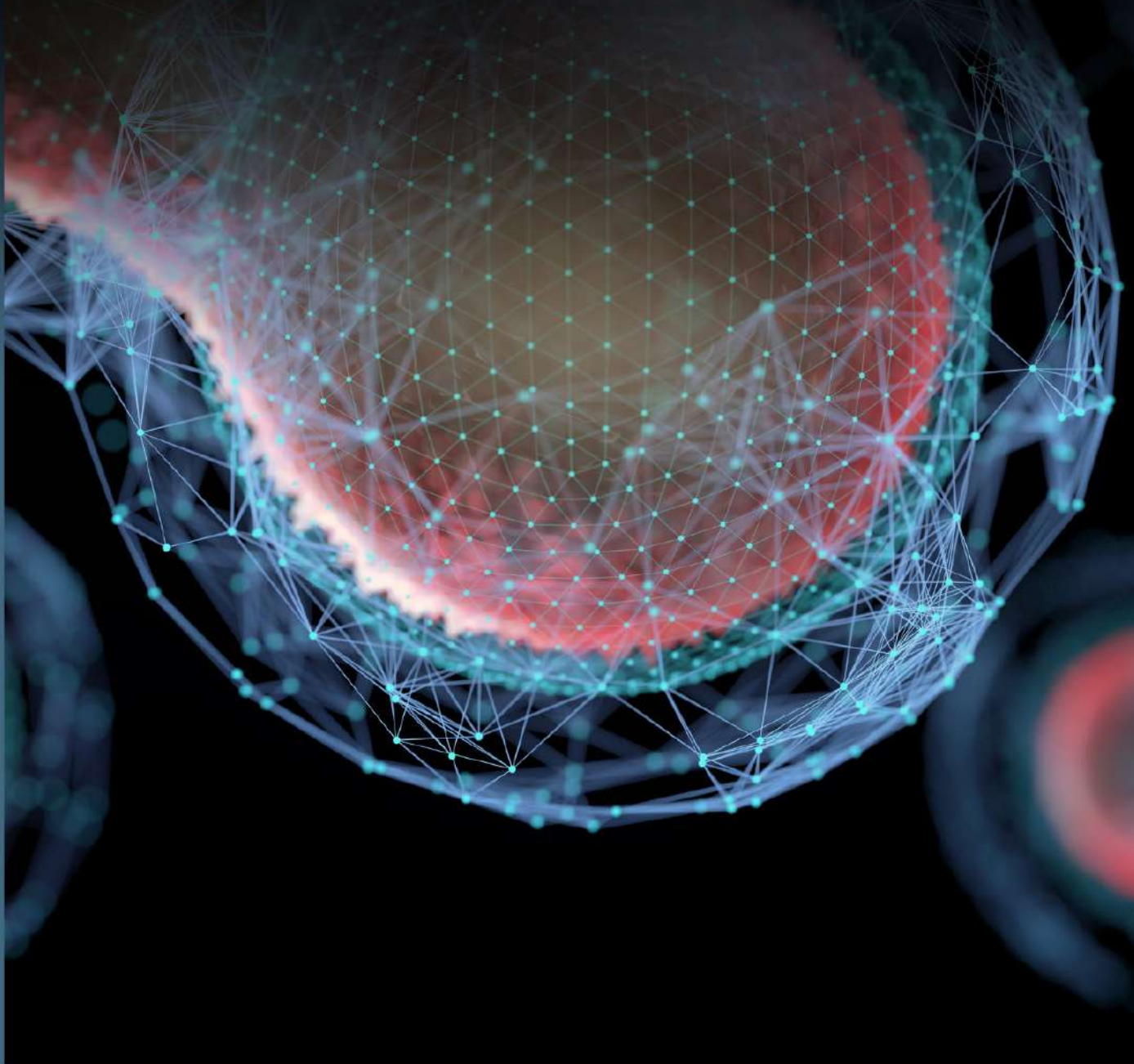


AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES POTENCIALES DE  
**MICROORGANISMOS DE  
TIERRA, DE MONTAÑA Y  
SUBTRÓPICO**



**AUTORES**

Ing. Kristina Estefanía Velarde Escobar, M.Sc  
Ing. Verónica Janeth Argüello Pazmiño, M.Sc  
Vet. Oswaldo Amangandi Sinchipa, M.Sc  
Vet. Jeniffer Patricia Chafla Valverde, Mgtr.

# **AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES POTENCIALES DE MICROORGANISMOS DE TIERRA, DE MONTAÑA Y SUBTRÓPICO**

Libro revisado por pares académicos

**DERECHOS RESERVADOS**

Copyright ©2024 Ingenius Académico

## **Autores**

**Ing. Kristina Estefanía Velarde Escobar, M.Sc**

Universidad Estatal de Bolívar

kvelarde@ueb.edu.ec

 <http://orcid.org/0000-0002-2009-533X>

**Ing. Verónica Janeth Argüello Pazmiño, M.Sc**

Universidad Estatal de Bolívar

veronica.arguello@ueb.edu.ec

 <https://orcid.org/0000-0002-5508-9538>

**Vet. Oswaldo Amangandi Sinchipa, M.Sc**

Universidad Estatal de Bolívar


oswaldo.amangandi@ueb.edu.ec

 <https://orcid.org/0000-0001-7668-3299>

**Vet. Jeniffer Patricia Chafla Valverde, Mgtr.**

Universidad Estatal de Bolívar

jchafla@mailes.ueb.edu.ec

 <https://orcid.org/0000-0001-5075-6373>

## **Cámara del Libro**

ISBN: 978-9942-48-666-0

## **Servicio Nacional de Derecho de Autor (SENADI)**

Certificado N° GYE-014470

Trámite N° SENADI-2024-85813

## **Entidad Editora**

Ingenius Académico

## **Diseño y Diagramación Digital**

Francisco Segarra Mendoza

## **Edición Digital**

Noviembre 2024

# ÍNDICE

**05**

## **Introducción**

**07**

## **Marco Teórico**

Biotecnología	8
Tipos de Biotecnología	9
Biotecnología Roja	9
Biotecnología Blanca	9
Biotecnología Verde	10
Biotecnología Azul	10
Microorganismos Nativos	11
Microorganismos Eficientes	11
Formación y Composición de Microorganismos Eficientes	11
Caracterización del Medio Biótico	12
Principales Fuentes de Microorganismos Eficientes	13
Microorganismos de Tierra y Montaña	14
Funciones de los Microorganismos de Montaña	15
Microorganismos de Subtrópico	15
Aplicaciones Biotecnológicas de Microorganismos Eficientes	15
Metodologías de Aislamiento	18
Metodologías de Caracterización	19
Características Microscópicas	19
Características Macroscópicas	20
Morfología	20
Características de Crecimiento	20
Características Bioquímicas	21

# 25

## Marco Metodológico

Lugar de Desarrollo de la Investigación	26
Lugar de Muestreo	26
Cantón Cumandá	26
Cantón Guano	27
Lugar de Recolección de Datos	28
Procesos de la Investigación	28
Aislamiento de Microorganismos de Tierra, de Montaña y Subtrópico	28
Caracterización In Vitro de los Microorganismos Aislados	33
Pruebas Bioquímicas de las Cepas bacterianas	38
Potencial de Acidificación	38
Determinación del uso de Carbohidratos	39
Medición del Potencial de Degradación de Celulosa	40

# 44

## Marco de Resultados: Discusión y Análisis

Análisis del Aislamiento de Microorganismos	45
Cultivos Genéricos	45
Caracterización In Vitro de los Microorganismos Aislados	45
Pruebas Bioquímicas de las Cepas Bacterianas	62
Potencial de Acidificación	62
Uso de Carbohidratos	63
Potencial de Degradación de Celulosa	64

# 68

## Conclusiones

# 69

## Recomendaciones

# 70

## Bibliografía

## **INTRODUCCIÓN**

### **Identificación del Problema**

El empleo de microorganismos eficientes ha crecido notablemente en los últimos años y se comercializan como una combinación de bacterias ácido-lácticas, bacterias fototróficas y levaduras. Desarrollados hace más de dos décadas, su aplicación se ha expandido globalmente. En Ecuador, aunque estos microorganismos han sido empleados para la mejora y restauración de suelos infértiles, como lo indica Intriago (2010), no se han realizado investigaciones exhaustivas que determinen su morfología ni sus posibles aplicaciones. Esta falta de conocimiento limita su utilización en sectores industriales, ganaderos, agrícolas y alimenticios, resultando en pérdidas económicas, desperdicio y agotamiento de recursos naturales para el país.

A pesar de su relevancia y los múltiples beneficios que ofrecen, estos microorganismos continúan siendo poco conocidos y estudiados en Ecuador. La falta de investigaciones y el escaso interés de la comunidad científica han obstaculizado el avance de innovaciones biotecnológicas, lo cual fomenta el uso continuo de productos químicos en diversos procesos productivos, aumentando así la contaminación y ocasionando daños ambientales, así como efectos perjudiciales para la salud de los seres vivos.

### **Justificación de la investigación**

En alineación con el objetivo 7 del Plan Nacional del Buen Vivir de Ecuador, el cual establece “Garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental territorial y global”, se desarrolla esta investigación, considerando la existencia de diversas herramientas que permiten disponer eficientemente de un conjunto de recursos biológicos auténticamente puros y estables, con potencial de aplicación en el desarrollo de nuevos productos, así como en la mejora y optimización de procesos en sectores industriales, ganaderos, agrícolas y alimenticios significativos.

El uso de microorganismos eficientes presenta múltiples aplicaciones,



incluyendo la producción de abonos bokashi, tanto aeróbicos como anaeróbicos; la generación de biogás en biodigestores; el tratamiento de desechos domésticos e industriales; el tratamiento de aguas residuales; y procesos de ensilaje, como señala Higa (1997). Además, su empleo en tecnologías agropecuarias ha impulsado notablemente la productividad en el corto plazo. En ganadería, los microorganismos eficientes han sido ampliamente utilizados en varias regiones para incrementar la productividad y rentabilidad agrícola, reducir olores, controlar plagas y enfermedades, mejorar la fecundidad en inseminación artificial y optimizar la calidad de productos como carne, leche y huevos.

La presente investigación es crucial, ya que la realización de estudios sobre estos microorganismos en Ecuador permitirá efectuar aislamientos y caracterizaciones mediante técnicas específicas, explorando su potencial biotecnológico para beneficios futuros en los sectores industrial, ganadero, agrícola y alimenticio. Esto asegurará una identificación precisa y la viabilidad de los microorganismos estudiados. Además, al tratarse de una tecnología natural sin efectos adversos sobre plantas, animales, seres humanos o el ambiente —como lo avala su aplicación de más de una década—, se contribuirá a la economía del país mediante un uso sostenible y eficiente de estos recursos biológicos.

## **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.



# CAPÍTULO 1

**Marco Teórico**



## **BIOTECNOLOGÍA**

La biotecnología es una ciencia interdisciplinaria que integra campos como biología, bioquímica, agronomía, virología, medicina, ingeniería química y genética, con el objetivo de contribuir en la producción de bienes, servicios o conocimientos que beneficien a la humanidad mediante innovaciones en diversos ámbitos industriales, científicos o productivos (Roldan & Yeste, 2013). Esta disciplina encuentra aplicaciones en sectores como la agricultura, ganadería, farmacéutica, tecnología de alimentos y medio ambiente, entre otros.

Así, la biotecnología se redefine como una amplia área del conocimiento contemporáneo, que fusiona de manera innovadora la biología y la ingeniería en procesos aplicados a organismos vivos, tejidos, células o sus componentes, generando productos, servicios o conocimientos que fomentan el bienestar humano (Hernández, 2010).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2010), la biotecnología moderna ofrece grandes y variados beneficios a la agricultura, permitiendo obtener resultados en menor tiempo y en mayor escala, así como desarrollar variedades de plantas con resistencia a condiciones adversas, herbicidas y plagas, mejorando sus propiedades nutritivas y sanitarias, y favoreciendo la conservación ambiental.

En Ecuador, la biotecnología está en una fase inicial de desarrollo, lo cual subraya la importancia de formar profesionales con conocimientos sólidos en esta área, para impulsar un progreso más amplio y efectivo en el ámbito biotecnológico del país.





## ***TIPOS DE BIOTECNOLOGÍA***

### ***BIOTECNOLOGÍA ROJA***

Díaz Martínez (2011) explica que la biotecnología roja se aplica en procesos médicos y abarca la creación de nuevas vacunas o antibióticos destinados a la erradicación de enfermedades, optimizando así los recursos actualmente disponibles mediante el uso de la biotecnología. Entre estas mejoras se destacan:

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

### ***BIOTECNOLOGÍA BLANCA***

La biotecnología blanca se aplica en procesos industriales y se utiliza principalmente para generar nuevas reacciones químicas o facilitar su ejecución. Este enfoque pretende reemplazar tecnologías contaminantes con alternativas más limpias que respetan el medio ambiente, aprovechando organismos vivos y enzimas para producir bienes más degradables, que requieren menos energía y generan menos residuos en su fabricación.

El uso de enzimas o biocatalizadores es uno de los mayores avances en la biotecnología blanca. Su ventaja principal es la alta selectividad y eficiencia de las enzimas en comparación con los procesos químicos convencionales, los cuales suelen requerir alta presión y temperatura. Las enzimas, en cambio, operan a presiones y temperaturas normales, son biodegradables y funcionan en condiciones extremas, como solventes orgánicos o altas concentraciones de sal. Hoy en día, las enzimas se emplean en diversas industrias, tales como la farmacéutica, alimentaria, química, textil, de detergentes y papel (Díaz Martínez, 2011).



## *BIOTECNOLOGÍA VERDE*

Esta biotecnología se aplica en procesos agrícolas, como en el desarrollo de plantas transgénicas que pueden crecer en ambientes desfavorables o resistir plagas y enfermedades. Según Díaz Martínez (2011), se espera que esta biotecnología ofrezca soluciones más sostenibles para el medio ambiente en comparación con los métodos agrícolas tradicionales.

De acuerdo con Segretín (2011), sus aplicaciones son diversas e incluyen:

- Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación o en riesgo de extinción.
- Clonación de individuos con características agronómicas deseables durante todo el año.
- Obtención de plantas libres de virus.
- Producción de semillas sintéticas.
- Conservación de germoplasma, que representa la variabilidad genética de una población vegetal.
- Obtención de metabolitos secundarios.
- Creación de nuevos híbridos.
- Mejora genética de plantas, incluida la obtención de plantas transgénicas.
- Germinación de semillas.
- Producción de haploides.

## *BIOTECNOLOGÍA AZUL*

La biotecnología azul, también conocida como biotecnología marina, está vinculada al ámbito marino y es una de las áreas de la biotecnología menos desarrolladas. No obstante, aunque aún se encuentra en una fase inicial, sus aplicaciones son prometedoras en campos como la acuicultura, la salud, la cosmética y la industria alimentaria.

Dentro de sus aplicaciones, destaca la acuicultura, que implica la cría o cultivo



de organismos acuáticos para aumentar la producción. Esto permite diseñar dietas más específicas para las especies cultivadas, mejorando así tanto su productividad como su calidad (Díaz Martínez, 2011).

## **MICROORGANISMOS NATIVOS**

### ***MICROORGANISMOS EFICIENTES***

#### *ORIGEN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES*

Los microorganismos eficientes (EM) fueron desarrollados por el Dr. Teuro Higa, quien estudió las funciones individuales de diversos microorganismos y obtuvo resultados positivos al combinarlos. Desde entonces, esta tecnología ha sido investigada y desarrollada con el propósito de incrementar la presencia de microorganismos benéficos y la diversidad microbiana en el suelo, promoviendo así el crecimiento, producción y calidad de los cultivos (Enríquez & Viera, 2010).

La abreviatura EM identifica a estos microorganismos eficientes de origen natural, sin manipulación genética. Estos microorganismos representan un amplio grupo existente en ecosistemas naturales sin intervención humana y han sido seleccionados por sus beneficios y compatibilidad en cultivos mixtos.

#### *FORMACIÓN Y COMPOSICIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES*

Según Enríquez y Viera (2010), los microorganismos eficientes (EM) son una combinación de varios microorganismos beneficiosos, tanto aeróbicos como anaeróbicos. Entre estos se encuentran bacterias ácido-lácticas, bacterias fotosintéticas, levaduras, hongos como los actinomicetos y hongos fermentadores. Estos microorganismos abundan en la naturaleza y se emplean en el procesamiento de alimentos y en la fermentación de alimentos para animales, siendo completamente seguros para humanos y animales.

Catagña y Noboa (2016) señalan que los organismos beneficiosos que conforman esta mezcla son:



- **Bacterias fotosintéticas (*Rhodopseudomona spp*)**

Este grupo de microorganismos sintetiza sustancias beneficiosas, como aminoácidos, ácidos nucleicos, compuestos bioactivos y azúcares, a partir de secreciones de las raíces y materia orgánica. Estas bacterias fomentan el crecimiento y desarrollo de las plantas y son el eje central de la actividad de los EM, proporcionando soporte a otros microorganismos. Además, coexisten con *Azotobacter* y *Rhizobium*, que fijan nitrógeno atmosférico.

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

Estas bacterias producen ácido láctico a partir de azúcares y carbohidratos generados por bacterias fotosintéticas y levaduras. Los *Lactobacillus* facilitan la fermentación y descomposición de lignina y celulosa, acelerando así la descomposición de materiales vegetales. También tienen la capacidad de inhibir microorganismos patógenos, como los hongos del género *Fusarium*, que debilitan las plantas y las hacen vulnerables a enfermedades y plagas.

- **Levaduras (*Saccharomyces spp*)**

Las levaduras sintetizan sustancias antimicrobianas y compuestos beneficiosos para el crecimiento vegetal, utilizando aminoácidos y azúcares (secretados por bacterias fotosintéticas) y materia orgánica. Los productos de las levaduras, como hormonas y enzimas, estimulan la división celular activa y sirven de sustrato para bacterias ácido-lácticas y actinomicetos.

#### *CARACTERIZACIÓN DEL MEDIO BIÓTICO*

##### ➤ **Bosque deciduo de tierras bajas**

Este tipo de bosque se encuentra entre los matorrales secos de tierras bajas y los bosques semidecíduos o húmedos tropicales, en un rango altitudinal de 50 a 200 m.s.n.m. La precipitación anual varía entre 800 y 1200 mm, con una estación seca de aproximadamente siete meses. La vegetación es caducifolia, perdiendo sus hojas durante una parte del año. Los árboles más comunes pertenecen a la familia *Bombacaceae*, con troncos abombados y copas anchas.



En el estrato medio predominan especies de cactus y plantas espinosas del orden Fabales. Este bosque se localiza en la provincia de Manabí, en el Parque Nacional Machalilla y en la base del Cerro Montecristi; también se encuentra en la provincia del Guayas, en el Cerro Blanco y las bases de los cerros Masvale, Cimalón, Perequetre, Mate y Pancho Diablo en la Reserva Ecológica Manglares-Churute (Enríquez & Viera, 2010).

### ➤ **Bosque húmedo pie-montano**

Este bosque se caracteriza por un alto endemismo (aproximadamente 10 %), con árboles que superan los 30 m de altura y una alta concentración de epífitas, además de un sotobosque denso de plantas arbustivas y herbáceas de las familias Araceae, Heliconiaceae, Cyclanthaceae, Piperaceae, Orchidaceae y Gesneriaceae. Se localiza en el occidente de las provincias de Cotopaxi, Los Ríos, Bolívar y Azuay-Guayas, entre los 300 y 1,300 m.s.n.m. El clima en este bosque es menos estacional, por lo que no se produce una estación seca, permitiendo que la vegetación siempre verde prospere incluso con precipitaciones por debajo de los 100 mm mensuales (Enríquez & Viera, 2010).

#### *PRINCIPALES FUENTES DE MICROORGANISMOS EFICIENTES*

Enríquez y Viera (2010) identifican al menos cinco fuentes principales de microorganismos benéficos aplicables en la agricultura:

**Mantillos:** La fuente primaria de microorganismos beneficiosos agrícolas proviene del litter o mantillo, la primera capa de tierra bajo la hojarasca y material desprendido de bosques o sistemas agrícolas poliestratificados, en sombra de árboles. Esta capa superficial alberga microorganismos que, al integrarse con el humus, transforman los residuos vegetales y animales en suelo fértil. Diversas culturas antiguas han empleado el mantillo como un fertilizante natural.

**Compost:** Diferentes métodos alternativos se aproximan a la producción de humus mediante compostaje, especialmente a través de lumbricompost, donde las excreciones de lombrices contienen una compleja microbiota digestiva



beneficiosa.

**Caldos microbiales:** Consisten en la multiplicación líquida de microorganismos beneficiosos, entre los que destacan cuatro grupos principales: bacterias fotosintéticas, algas unicelulares, levaduras, lactobacilos y actinomicetos.

**Micorrizas:** Estas juegan un papel esencial en el crecimiento de los árboles, aumentando la capacidad de absorción de nutrientes mediante nuevas ramificaciones y un mayor contacto de la raíz con el suelo. Las micorrizas facilitan la absorción de nutrientes por las plantas, que a su vez proveen al hongo de carbohidratos necesarios para su supervivencia.

**Entomopatógenos:** Son microorganismos que causan enfermedades en artrópodos, como insectos, ácaros y arácnidos, resultando útiles en el control biológico de plagas.

## **MICROORGANISMOS DE TIERRA DE MONTAÑA**

Los microorganismos de tierra de montaña son una combinación de organismos presentes en ecosistemas naturales que se utilizan como inoculantes para mejorar los suelos y optimizar el rendimiento de los cultivos. Según Paniagua et al. (2008), estos microorganismos son capaces de descomponer la materia orgánica y competir con microorganismos perjudiciales, reciclan nutrientes para las plantas, fijan el nitrógeno en el suelo, degradan sustancias tóxicas como los pesticidas y producen compuestos naturales que mejoran la textura del suelo.

Hace algunos años, esta tecnología fue desarrollada para replicar los microorganismos presentes en la capa superficial y orgánica de los suelos de bosques no intervenidos por el ser humano. Estos microorganismos de montaña (MM) ofrecen múltiples beneficios: son de bajo costo, fáciles de implementar y cumplen un rol esencial en los procesos biológicos del suelo, especialmente en sistemas agrícolas.

Este grupo de microorganismos beneficiosos incluye aproximadamente 80 especies distribuidas en cuatro géneros principales: bacterias fotosintéticas, actinomicetos, bacterias ácido-lácticas y hongos fermentadores. En los



ecosistemas donde habitan, contribuyen a la descomposición de materia orgánica, generando los nutrientes necesarios para el desarrollo de la flora en áreas como cerros, bosques mixtos, latifoliados, plantaciones de café y bambú (Suchini, 2012; Monjarás, 2016).

### ***FUNCIONES DE LOS MICROORGANISMOS DE MONTAÑA***

Según Castro (2015), los microorganismos de montaña (MM) cumplen diversas funciones importantes, entre ellas:

- Degradan la materia orgánica, aumentando la disponibilidad de nutrientes en el suelo.
- Ayudan a controlar microorganismos patógenos presentes en el suelo.
- Facilitan la degradación de sustancias tóxicas como plaguicidas, mejorando así la fertilidad del suelo.
- Aceleran la germinación de las semillas.
- Contribuyen a la fijación de nitrógeno en el suelo, entre otras funciones.

### **MICROORGANISMOS DEL SUBTRÓPICO**

En zonas subtropicales y tropicales, donde la temperatura promedio se mantiene elevada a lo largo del año, los organismos del suelo permanecen activos de manera constante. Como resultado, la capa orgánica es delgada, y el reciclaje de nutrientes ocurre de forma rápida y continua (Harrison, 2001). Los suelos de climas subtropicales contienen altos niveles de materia orgánica, lo que favorece una abundante presencia de organismos.

### **APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE MICROORGANISMOS EFICIENTES**

Hoy en día, las aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos eficientes son amplias e innovadoras, contribuyendo no solo en términos económicos y energéticos, sino también en el ámbito ambiental. Estos microorganismos se



aplican en la producción de biocombustibles, agricultura, ganadería, industria y en la salud humana, promoviendo una coexistencia armoniosa entre microorganismos y la humanidad (Higa & Wood, 2009).

### **En la agricultura**

Los microorganismos eficientes se emplean para enriquecer el suelo y obtener cultivos de alta calidad, saludables, con mayor rendimiento y menos enfermedades o plagas, sin necesidad de productos químicos. Los biofertilizantes o abonos biológicos, basados en microorganismos, benefician la nutrición y el crecimiento de las plantas. Estos microorganismos del suelo, como hongos y bacterias, se asocian de manera natural con las raíces, facilitando la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno, fósforo y agua, además de producir fitohormonas que promueven el crecimiento vegetal.

La utilización de microorganismos con capacidad de promover el crecimiento de las plantas es una excelente alternativa de biofertilización. Estudios controlados en laboratorio, invernaderos y en campo abierto han demostrado los beneficios claros de esta tecnología (Palazón, 2015).

### **Efectos positivos**

- Promueve la germinación, crecimiento, floración, fructificación y maduración de las plantas cultivadas.
- Aumenta la capacidad fotosintética de las plantas.
- Incrementa la eficiencia de la materia orgánica como fertilizante.
- Desarrolla la resistencia de las plantas a plagas y enfermedades.
- Mejora las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.
- Suprime patógenos y plagas presentes en el suelo (Webmaster, 2009).

### **En la ganadería**

Los microorganismos eficientes se han empleado para reducir malos olores, controlar plagas de insectos y enfermedades, aumentar la fecundidad en la inseminación artificial y mejorar la calidad de productos como carne, lácteos y huevos.





## En la conservación del ambiente

Los microorganismos eficientes se utilizan para limpiar aguas contaminadas en estanques, lagos, presas y costas, así como para el tratamiento de derrames de petróleo, tratamiento de aguas residuales y transformación de residuos orgánicos en abonos de alta calidad. Los beneficios en el tratamiento de agua incluyen:

- Disminuye significativamente los olores del sistema.
- Neutraliza la producción de gases nocivos, como amoníaco, sulfhídrico y metilmercaptano.
- Reduce el lodo sedimentado.
- Disminuye la presencia de microorganismos patógenos, coliformes, bacterias dañinas, hormonas y sulfatos reductores.
- Mejora la calidad del agua, reduciendo la demanda bioquímica y química de oxígeno (DBO y DQO), turbidez y sólidos suspendidos, además de equilibrar el pH y el oxígeno disuelto (AMBIEM, 2010).

## En la industrial

Según Higay Wood (2009), las aplicaciones más comunes de los microorganismos eficientes incluyen:

- **Reducción del uso de agentes químicos contaminantes** en la etapa de preblanqueo mediante xilanasas.
- **Blanqueo de pulpa** utilizando xilanasas y celulasas.
- **Reciclado de fibras**, empleando endoglucanasas para mejorar el drenaje de fibras recicladas, celulasas para incrementar la densidad y suavidad del papel, y alfa amilasas para mejorar el drenaje y facilitar el destintado.
- **Reducción de residuos y contaminantes** en el proceso de reciclado, utilizando esterasesas para controlar los “stickies” y amilasas, proteasas y lipasas para la remoción y control de lodo.
- **Modificación de fibras** mediante celulasas para aumentar la flexibilidad y con xilanasas y lacasas para incrementar la densidad de las hojas.



- **Tratamiento de efluentes industriales** con enzimas y biodispersantes.

Además, los microorganismos eficientes se emplean como fuente de energía alternativa en cultivos, ya que este proceso comienza no solo en las agroindustrias, sino también en la producción de los sustratos mismos, como palma, caña, maíz, yuca, papa y cereales.

La “revolución verde” provocó un uso intensivo de productos químicos, lo cual deterioró tanto el ambiente como la productividad agrícola al romper el equilibrio entre los nutrientes del suelo y la microbiota nativa. Las deficiencias en cultivos se trataban exclusivamente con fuentes inorgánicas, mientras que la materia orgánica de baja calidad disponible en la época promovía el desarrollo de patógenos como nemátodos, bacterias y hongos perjudiciales para las plantas.

En este contexto, las plantas se benefician directamente de la microbiotecnología, pues obtienen energía de su interacción, simbiótica o asimbiótica, con microorganismos nativos o inoculados, constituyendo una fuente de energía alternativa y renovable que no depende de químicos convencionales. El uso de microorganismos en la agricultura ha demostrado promover el desarrollo de los cultivos, reducir los efectos negativos del manejo agrícola y ofrecer una fuente de energía accesible y renovable (Fundación GEA, 2012).

## **METODOLOGÍAS DE AISLAMIENTO**

La técnica de aislamiento bacteriano es una metodología comúnmente empleada en el laboratorio para transferir un microorganismo desde una muestra ambiental a otro entorno, con el objetivo de favorecer su crecimiento y permitir la posterior identificación de los microorganismos aislados. En la tabla 1-1 se presentan algunas de las técnicas de aislamiento, utilizando siempre un medio de cultivo sólido.



**Tabla 1-1:** Metodos de aislamiento frecuente

<b>Tipo de Siembra</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Técnica</b>
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:** Autores

**Fuente:** CAMACHO, Christian, 2015

## **METODOLOGÍAS DE CARACTERIZACIÓN**

### ***CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS***

El estudio microscópico para la identificación de la mayoría de los grupos bacterianos permite determinar la forma, tamaño y estructura celular a través de técnicas de tinción, siendo la tinción de Gram una de las principales. Esta técnica permite distinguir entre bacterias Gram positivas, que presentan una coloración azul o violeta, y bacterias Gram negativas, que se tiñen de color rosa o rojo.



## ***CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS***

### **MORFOLOGÍA**

La identificación de colonias bacterianas permite determinar su morfología, para lo cual es necesario contar con un cultivo puro, es decir, derivado de una sola célula y compuesto únicamente por un tipo específico de microorganismo. Cuando las colonias disponen de todos los nutrientes y condiciones de temperatura adecuados, se pueden observar fácilmente debido a características como forma, tamaño y color.

Asimismo, las colonias presentan diversas texturas; algunas pueden ser viscosas o secas, y tener superficies lisas o granulares, lo que contribuye a su diferenciación y análisis.

### ***CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO***

Según Koneman (2016), los microorganismos presentan ciertas características de crecimiento, como se describe a continuación:

- a. **Rapidez de crecimiento:** La mayoría de los microorganismos aislados en laboratorio se desarrollan en 1 a 2 días, aunque algunas bacterias, como los actinomicetos y micobacterias, y ciertos hongos pueden requerir un tiempo considerablemente mayor.
- b. **Morfología de las colonias en el medio de crecimiento:** Las bacterias presentan variaciones en su apariencia en medios de cultivo sólidos. Con la experiencia, la morfología de las colonias, combinada con pruebas rápidas como oxidasa y catalasa, suele ser suficiente para caracterizar el género de los microorganismos presentes en una muestra.
- c. **Condiciones atmosféricas óptimas para el desarrollo:** Los microorganismos pueden caracterizarse según su requerimiento de oxígeno. Se clasifican como aerobios (requieren oxígeno), facultativos (pueden crecer con o sin oxígeno) o anaerobios (crecen óptimamente en ausencia de oxígeno). La mayoría también se ve favorecida por el dióxido de carbono, mientras que los capnofílicos dependen del CO<sub>2</sub> para su crecimiento.



- d. **Temperatura óptima de crecimiento:** La mayoría de los microorganismos aislados en laboratorio crecen óptimamente a 35–37 °C. La capacidad de algunos para desarrollarse a diferentes temperaturas ayuda a su caracterización.
- e. **Morfología de las colonias en medios diferenciales, selectivos y no selectivos:** Los laboratorios inoculan muestras en medios selectivos y no selectivos para optimizar el aislamiento de microorganismos. Los medios selectivos incluyen agentes antimicrobianos, como colistina y ácido nalidíxico, o colorantes, como el agar MacConkey y el agar azul de metileno-eosina, que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y permiten el de otros.

#### *CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS*

Las pruebas bioquímicas se realizan en el laboratorio para identificar las características metabólicas de los microorganismos, evaluando su capacidad de utilizar ciertos sustratos y formar productos finales. Al metabolizar azúcares o carbohidratos, los microorganismos pueden producir ácido u otros compuestos finales. Estas pruebas permiten obtener resultados en tiempos variables, desde pocos segundos o horas hasta 48 horas o más, y contienen sustratos específicos que ayudan a determinar la capacidad de los microorganismos para utilizar dichos sustratos.

#### **Prueba de Glucosa/ Lactosa**

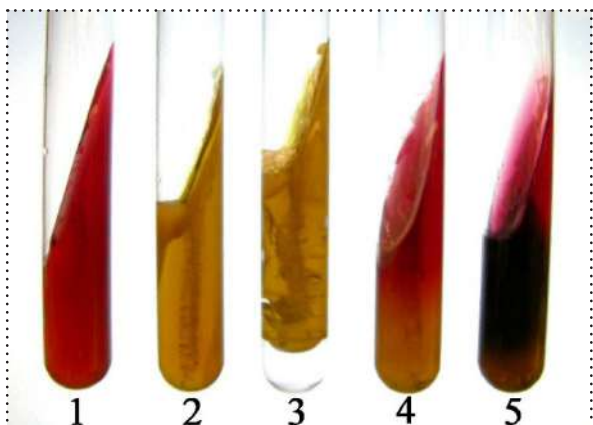
Esta prueba evalúa la reacción de un microorganismo en un medio de crecimiento básico que contiene hidratos de carbono específicos, como glucosa y lactosa, y puede detectar la producción de gas y ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S). La fermentación de los carbohidratos genera ácidos, detectados mediante el indicador rojo de fenol, que cambia a amarillo en un medio ácido. En el proceso de reducción, el tiosulfato de sodio se convierte en sulfuro de hidrógeno, que reacciona con una sal de hierro y produce sulfuro de hierro de color negro (Arellano & Yambay, 2016).



## Resultados

Según BritaniaLab (2011), las siguientes interpretaciones pueden realizarse en el medio de Kligler Hierro Agar:

- 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. Presencia de burbujas o ruptura del medio de cultivo:** indica que el microorganismo produce gas.
- 5. Ennegrecimiento del medio:** sugiere que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.



**Figura 1-1:** Resultados prueba de Kligler

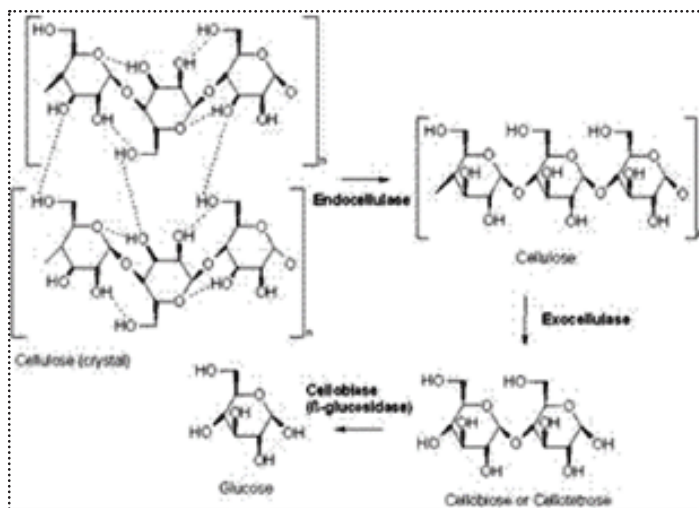
**Fuente:** Spilatro, 2004

## Degradación de celulosa

Según el Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio, 2011), los microorganismos que pueden degradar celulosa secretan un complejo sistema de enzimas extracelulares, como celulasas y xilanasas, que trabajan conjuntamente en la descomposición de la celulosa y hemicelulosa, los principales componentes de la madera. La degradación de las fibras de celulosa se realiza principalmente mediante dos tipos de sistemas



enzimáticos: los sistemas agregativos y los no agregativos.



**Figura 1-2.** Degradación enzimática de la celulosa

**Fuente:**enzymeindia

### 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>Ttrichoderma 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 y</i> <i>Thermoimonospora sp</i> .
Bacterias anaeróbicas mesofílicas y termófilas	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens y</i> <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



### a. **Uso de Carbohidratos**

Sousa (2012) señala que los carbohidratos comúnmente utilizados en pruebas de fermentación incluyen diversos tipos, destacándose monosacáridos como glucosa, manosa, galactosa y fructosa; disacáridos como lactosa, sacarosa, maltosa y celobiosa; así como algunos trisacáridos como la rafinosa y polisacáridos como la celulosa y el almidón. Estas pruebas determinan la capacidad fermentativa del microorganismo al metabolizar el carbohidrato en cuestión, produciendo sustancias ácidas como el ácido láctico, lo cual se evidencia con un cambio de color al variar el pH.

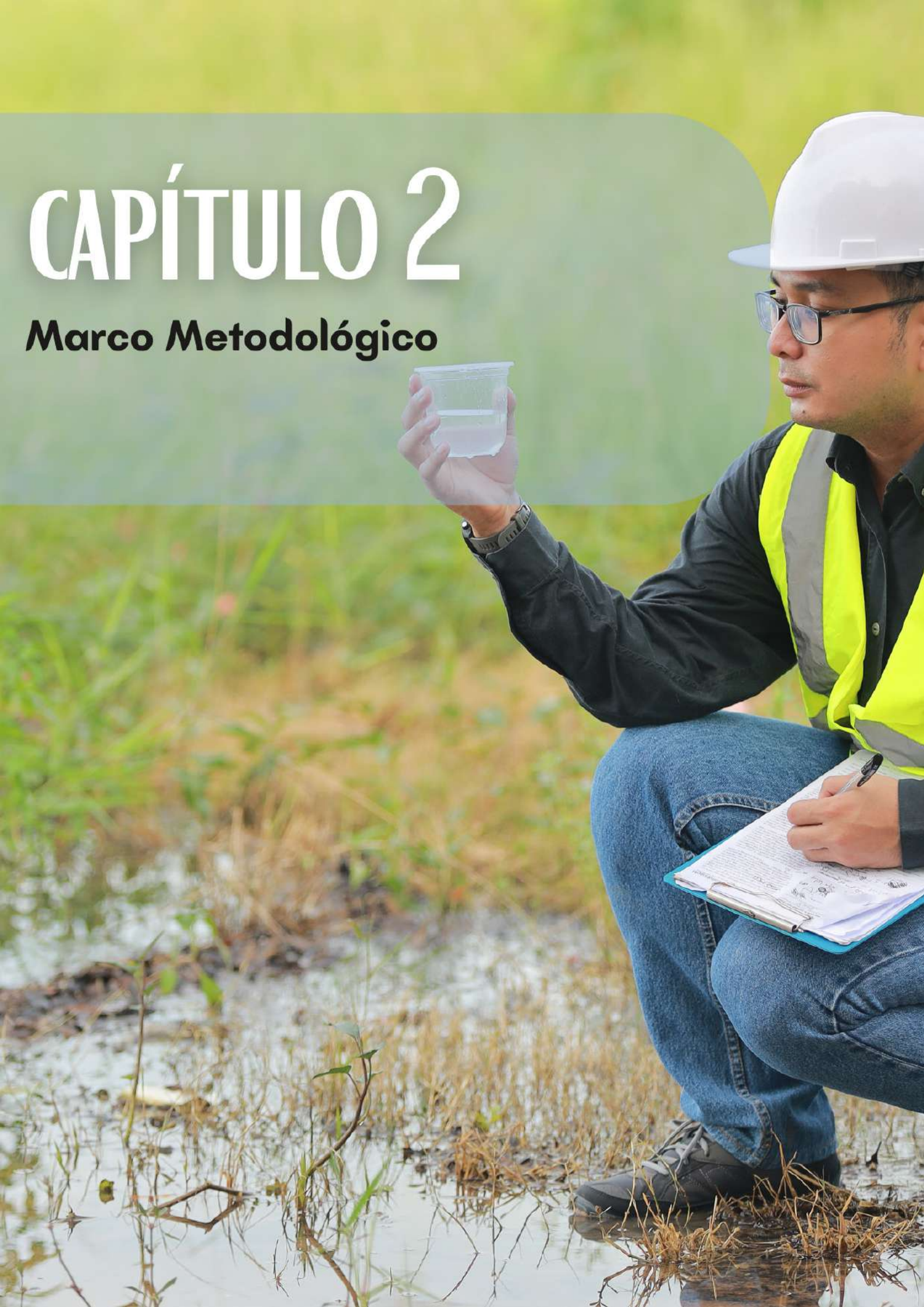
Desde el punto de vista bioquímico, la fermentación es un proceso catabólico anaeróbico en el que los carbohidratos y compuestos relacionados se oxidan, liberando energía sin la presencia de aceptores externos de electrones. En este proceso, los aceptores finales de electrones son compuestos orgánicos generados directamente en la descomposición de los carbohidratos. La fermentación produce una oxidación incompleta del compuesto original y solo libera una pequeña cantidad de energía (García, 2007).





# CAPÍTULO 2

## Marco Metodológico



## LUGAR DEL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

### LUGAR DE MUESTREO

#### CANTÓN CUMANDÁ

Cumandá está ubicado al suroeste de la provincia de Chimborazo, a aproximadamente 2 horas y 45 minutos de Riobamba. Su cabecera cantonal, también llamada Cumandá, se sitúa a orillas del río Chimbo, el cual la separa del centro poblado de Bucay, en la provincia del Guayas. Tiene una extensión de 158,7 km<sup>2</sup> y una población de alrededor de 12,900 habitantes.

El cantón se encuentra a altitudes que varían entre 300 y 1900 msnm, lo que le confiere una notable biodiversidad en la provincia y el país. Ubicado en la zona subtropical, presenta un clima con una temperatura promedio de 20°C.

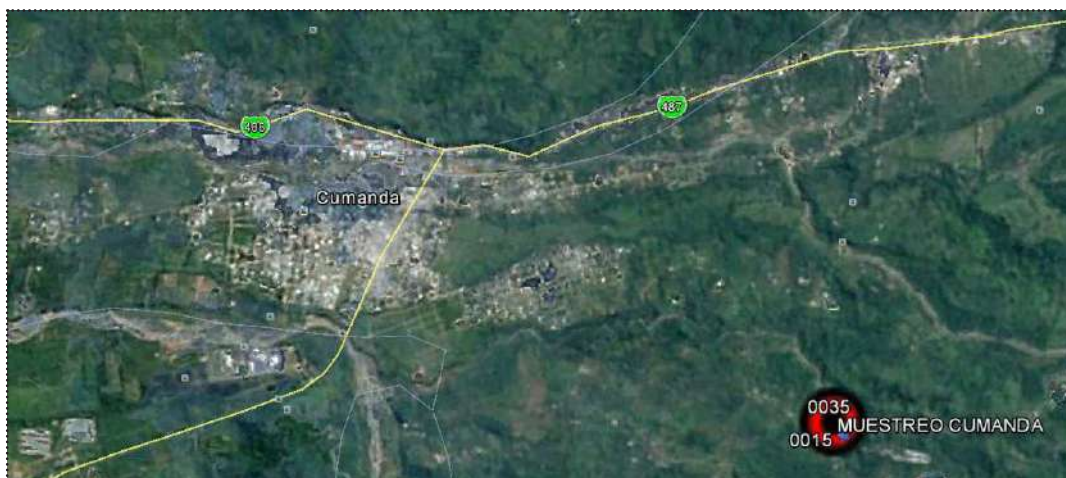
El proyecto se desarrolla específicamente en el recinto San Vicente, donde se establecieron tres puntos de muestreo, como se detalla en la Tabla 1-2.

**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



## CANTÓN GUANO

El cantón Guano se ubica 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 está situada a 2639 m.s.n.m., con un clima templado característico de los valles interandinos.

La altitud en Guano varía desde los 2280 m.s.n.m. en la Comunidad Cahuaji Bajo, parroquia Guanando, hasta los 6310 m.s.n.m. en el nevado Chimborazo, parroquia San Andrés. Esta diversidad altitudinal genera temperaturas que oscilan desde valores bajo 0°C en el nevado Chimborazo hasta 28,3°C en los meses más cálidos.

El proyecto se lleva a cabo específicamente en la parroquia rural La Providencia, donde se establecieron tres puntos de muestreo, detallados 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



## ***LUGAR DE RECOLECCIÓN DE DATOS***

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal, ubicado en la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. El laboratorio se encuentra en el Km 1 1/2 de la Panamericana Sur, en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo, a una superficie de 979,7 km<sup>2</sup> y con coordenadas de latitud 9807000 UTM y longitud 764600 UTM.

## **PROCESOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### ***AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE TIERRA DE MONTAÑA Y SUBTRÓPICO***

#### **A. Georreferenciación de los lugares de muestreo**

Se realizaron visitas a los lugares de estudio para identificar los puntos de muestreo. Se consideraron dos sitios geográficos claramente definidos: el cantón Guano (zona de montaña) y el cantón Cumandá (zona subtropical), de los cuales se capturarán los microorganismos, estableciendo tres sitios de captura en cada área.

#### **B. Captura y transporte de microorganismos**

La captura de microorganismos se llevó a cabo utilizando trampas en tarrinas plásticas, en las cuales se colocó arroz cocido como materia orgánica para actuar como sustrato en la producción de microorganismos eficientes. El arroz se cocinó previamente sin sal, y cada tarrina se selló con malla o nylon bien asegurado para evitar el derrame.

Las tarrinas fueron transportadas a los puntos de muestreo y enterradas bajo la copa de los árboles durante aproximadamente 8 días. Al finalizar este período, se retiraron las tarrinas, observándose que el arroz estaba cubierto de colonias de microorganismos de diferentes colores, con micelios blancos claramente visibles, como se muestra en la figura 1-2. Posteriormente, se llevaron 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

## **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**

<b>Fórmula (en gramos por litro)</b>		<b>Instrucciones</b>
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  $27^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 48 a 72 horas para verificar el crecimiento.

### Cultivo para bacterias

Para bacterias se lo colocó en la estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  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 seleccionaron las colonias más representativas de cada muestra obtenida en los puntos de Guano y Cumandá. El proceso incluyó la preparación de Agar Nutritivo y la inoculación mediante la técnica de siembra por estría por agotamiento, siguiendo estos pasos:

- Se esterilizó el asa de vidrio con un mechero.
- La caja Petri se dividió en cuatro cuadrantes.
- Se tomó una muestra de la colonia y se colocó en el primer cuadrante, realizando el estriado sobre la superficie del medio.
- Siguiendo el sentido de las agujas del reloj, se repitió el procedimiento en cada cuadrante, tomando la muestra del estriado del cuadrante anterior.
- Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 horas.

Para preservar las cepas para análisis posteriores, las muestras se refrigeraron a una temperatura entre 0-5°C. Para reactivarlas, se utilizó Tripteína Soya Caldo como fuente de nutrientes, cuya composición se detalla en la tabla 5-2. Posteriormente, se repitió el proceso de purificación para obtener las cepas bacterianas necesarias 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

## ***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**

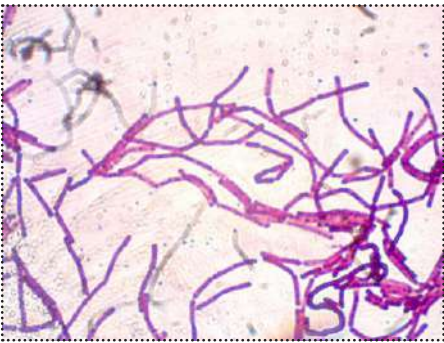
- Microscopio

## **Procedimiento**

1. Se tomó directamente de la caja Petri una muestra significativa con un asa de glasé, se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos y se extendió la muestra sobre la superficie.
2. La muestra se flameó con un mechero hasta que se secura completamente.
3. Se aplicaron los reactivos de tinción: primero, se añadió cristal violeta durante 1 minuto, luego se enjuagó y se aplicó Lugol durante 1 minuto, seguido de un lavado; a continuación, se expuso a alcohol cetona durante 1 minuto y se lavó nuevamente, para finalmente aplicar safranina y lavar.
4. Posteriormente, se añadió una gota de aceite de inmersión en la preparación y se observó al microscopio con el objetivo de 100x. Se diferencian las colonias Gram positivas de color azul y las Gram negativas de color rojo, como se muestra en las figuras 3-2 y 4-2, respectivamente. Esto ocurre debido a que el Lugol elimina los polisacáridos de la pared de las bacterias

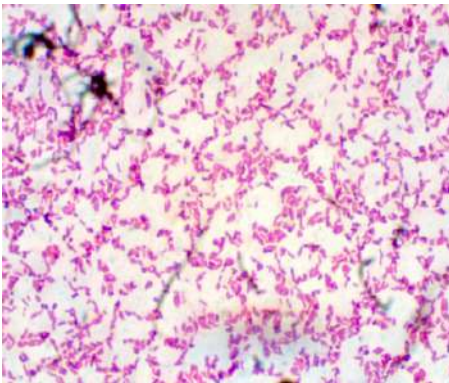


Gram negativas, dejándolas incoloras, mientras que las Gram positivas retienen el tono azulado. Finalmente, la safranina tiñe las bacterias Gram negativas de color rojizo.



**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 3M para el recuento de microorganismos en un sistema de medio de cultivo pre-preparado, lo que facilita la enumeración de colonias bacterianas y permite una estimación cuantitativa del número de microorganismos presentes. Se emplearon placas 3MTM PetrifilmTM específicas para el recuento de mohos, levaduras y aerobios totales.

El procedimiento es similar al utilizado para cultivos en cajas Petri, con la diferencia de que en este caso se aplicó 1 ml de la muestra en el film inferior de la placa. Luego, se ejerció una presión suave con el dispersor en el film superior para distribuir el inóculo de manera uniforme en la zona circular de la placa. Posteriormente, se incubó a 37°C durante 24-48 horas en el caso de bacterias, y a 27°C por un periodo de 48-72 horas para hongos y levaduras.

Para el reporte de resultados en grupos bacterianos, se utilizó 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:

**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).



## ***PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS***

### ***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 esterilizó en autoclave. Posteriormente, se colocaron 5 ml del medio en cada tubo y se dejaron enfriar en una inclinación de aproximadamente 15°, de modo que se formara un pico de flauta.

Con un asa, se tomó una pequeña muestra de la cepa bacteriana y se inoculó primero por picadura en el fondo del tubo y luego mediante una siembra por estría en la superficie del pico de flauta.

Los tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas.



## *DETERMINACIÓN DEL USO DE CARBOHIDRATOS*

Mediante esta técnica, se evalúa cómo los microorganismos metabolizan diferentes azúcares a través de pruebas bioquímicas. Para este propósito, se utiliza la galería API, en particular la galería API 20 NE (bioMérieux), diseñada para identificar bacilos Gram negativos que no pertenecen al grupo de las enterobacterias. Esta galería consta de 20 microtubos (bioMérieux, 2010).

En este procedimiento, los microorganismos se suspenden en un medio líquido, que luego se inocula en la galería API. Durante la incubación, el catabolismo de los glucósidos genera ácidos orgánicos, lo que provoca un cambio en el indicador de pH y resulta en el perfil bioquímico de la cepa (Salas, 2009).

### **Proceso de preparación e inoculación:**

- Se preparó una suspensión de las cepas bacterianas en Tripteína Soya Caldo para reactivar las cepas y obtener la muestra a inocular en la galería API.

### **Inoculación en la galería:**

- Se dispuso una pequeña muestra de la suspensión bacteriana en la galería API 20 NE, asegurándose de que estuviera homogénea.
- Se generó anaerobiosis con aceite mineral o parafina en las pruebas en las que el azúcar está subrayado.
- Las pruebas marcadas con un recuadro se llenaron completamente hasta la cúpula.
- Según las indicaciones, se cubrieron algunos tests con aceite mineral de parafina.
- Las muestras se incubaron a 37°C durante 24 horas, manteniendo una atmósfera húmeda para evitar que se sequen.

### **Lectura de resultados:**

- La lectura se realizó después de 24 horas de incubación.
- Se observó cada tubo en busca de acidificación: un cambio de color a rojo indicó una reacción alcalina, mientras que el amarillo indicó una reacción



ácida. La producción de H<sub>2</sub>S e hidrólisis de gelatina se identificó por un cambio a color negro.



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

**Fuente:** Mac Faddin J, 2003

### *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 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% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Cloruro de Bario dihidratado (BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)
- Agua destilada





## Equipos

- Cabina de flujo laminar

## Procedimiento

Ácido sulfúrico 1% v/v (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

- Agregar aproximadamente 90 ml de agua destilada en un frasco graduado de 100 ml.
- Con una pipeta de 1 ml agregar 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Llevar a 100 ml de volumen con agua destilada y mezclar.

## Cloruro de Bario.2H<sub>2</sub>O (1.75% p/v) (BaCl<sub>2</sub>)

- Pesar 1.175 g BaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O y pasarlo a u 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.

Se prepararon 10 estándares y, mediante espectrofotometría, se generó una recta patrón que permite detectar la concentración de las diluciones bacterianas. Esta escala se fundamenta en la capacidad del cloruro de bario para precipitar en presencia de ácido sulfúrico.

**Tabla 6-2:** Escala McFarland

Escala McFarland	BaCl <sub>2</sub> al 1% (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1% (ml)	UFC/ml (x10 <sup>8</sup> )
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 ( $H_2SO_4$ )
- Cloruro de Bario.  $2H_2O$  (1.75% p/v) ( $BaCl_2$ )

### **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

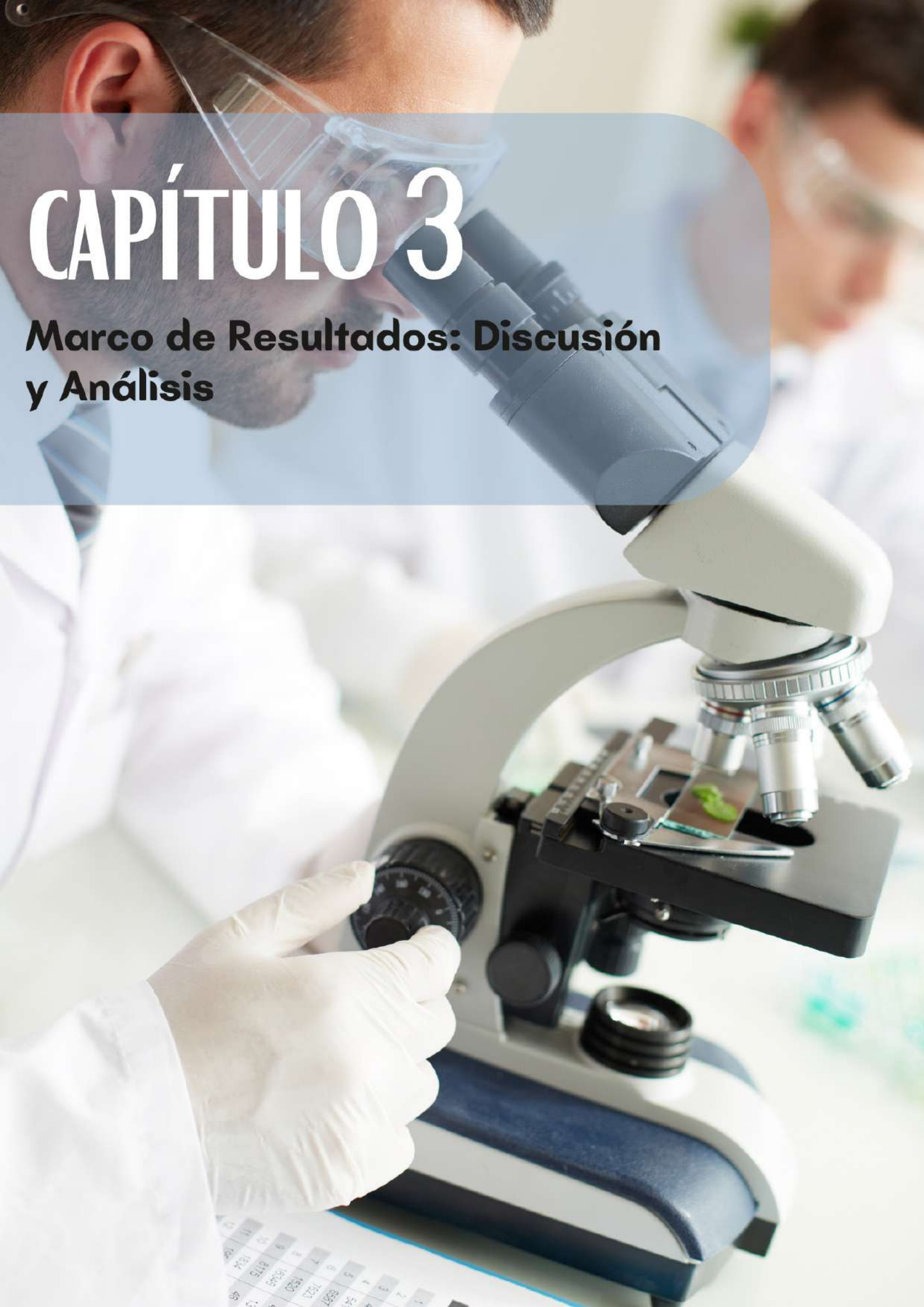
### **Procedimiento**

Para este procedimiento, se tomó 1 ml de la solución con la cepa bacteriana previamente preparada y se colocó en una caja Petri. Luego, se añadió el medio de cultivo y se dejó solidificar.

Posteriormente, se realizaron pequeños cortes en el agar en tres secciones diferentes, en los cuales se colocó un trozo de papel higiénico en cada corte. Se repitió este procedimiento con las otras cepas bacterianas.

Las muestras se incubaron a 37 °C y se revisaron diariamente para observar si las bacterias seleccionadas producían degradación de celulosa.





# CAPÍTULO 3

**Marco de Resultados: Discusión  
y Análisis**

## ANÁLISIS DEL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

### CULTIVOS GENÉRICOS

#### Bacterias

Después de 24 horas de la siembra, se observó crecimiento bacteriano en las cajas con Agar Nutriente, el cual permanece sólido incluso a altas temperaturas y facilita la visualización de colonias pequeñas debido a que el crecimiento bacteriano ocurre en la superficie (Casado et al., 2012). Cada muestra fue codificada según su lugar y punto de muestreo. En el anexo A se presentan los cálculos correspondientes para las cajas donde se aplicó el método indicado, y 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 <sup>-6</sup>	MNPC
M2C	10 <sup>-6</sup>	9,8x10 <sup>9</sup>
M3C	10 <sup>-6</sup>	MNPC
MIG	10 <sup>-6</sup>	1,3 x10 <sup>9</sup>
M2G	10 <sup>-6</sup>	4,9 x10 <sup>9</sup>
M3G	10 <sup>-6</sup>	5,5 x10 <sup>9</sup>

\*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

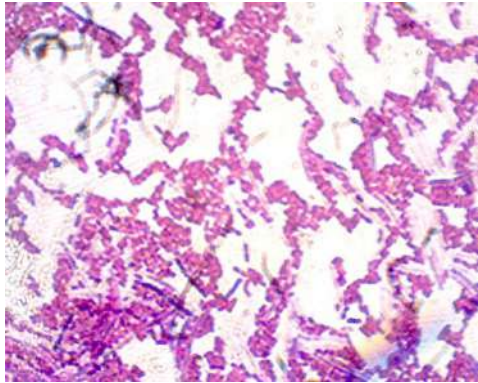
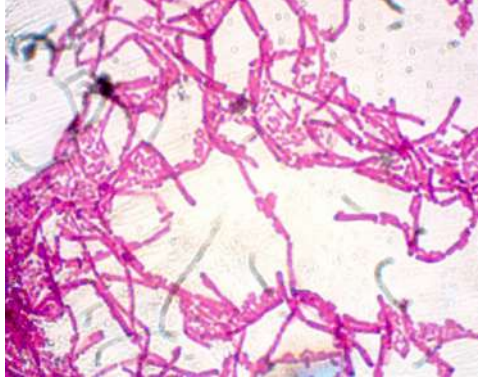
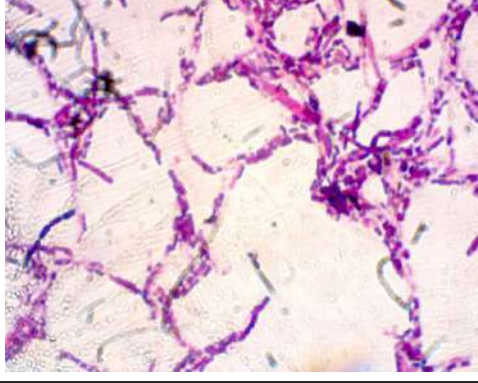
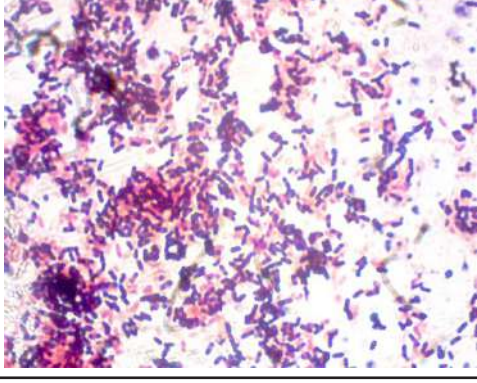
### CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

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


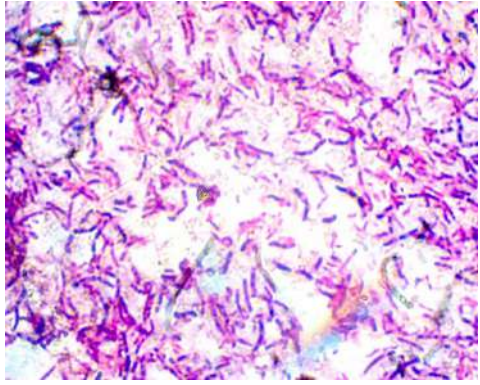
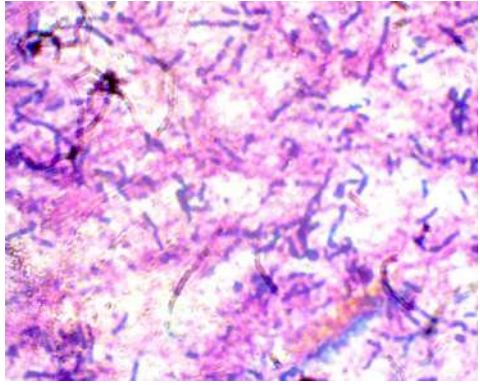
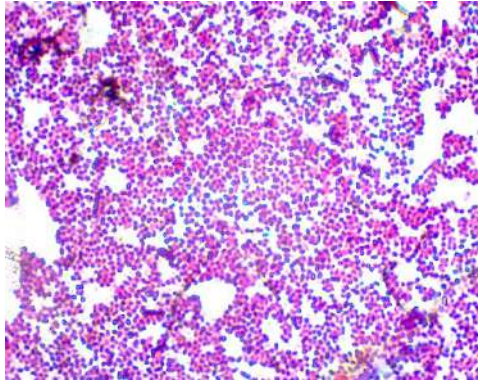
En la tabla 2-3 se presentan los resultados obtenidos de la Tinción Gram, con lo cual se puede definir la morfología de los grupos bacterianos, así como definir el grupo al que pertenecen si son Gram Positivos(+) y Gram negativos(-).



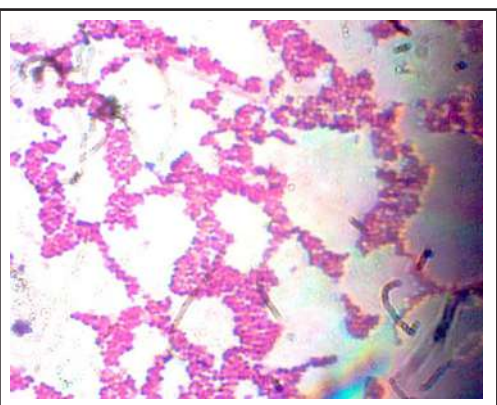
**Tabla 2-3:** Caracterización microscópica de microorganismos en condiciones óptimas de temperatura 37°C

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 observadas mediante tinción de Gram resultaron en su mayoría ser bacilos Gram positivos y bacilos esporulados. García et al. (2013) demuestran en un estudio la presencia de diversos géneros de bacilos Gram positivos, incluyendo *Lactobacillus* y bacilos esporulados, en muestras de microorganismos eficientes del suelo. Las bacterias ácido-lácticas poseen la capacidad de suprimir enfermedades causadas por microorganismos como *Fusarium*, que suelen aparecer en cultivos continuos, y además facilitan la solubilización de cal y fosfato de roca (Microorganismos eficientes y amigables con el ambiente, 2008, pp. 34-36).

El uso de bacterias ácido-lácticas también contribuye a reducir las poblaciones de nematodos y controlar la propagación de *Fusarium*, lo que mejora el ambiente para el crecimiento de los cultivos (Sharifukkin, 1993, citado en García et al., 2013).

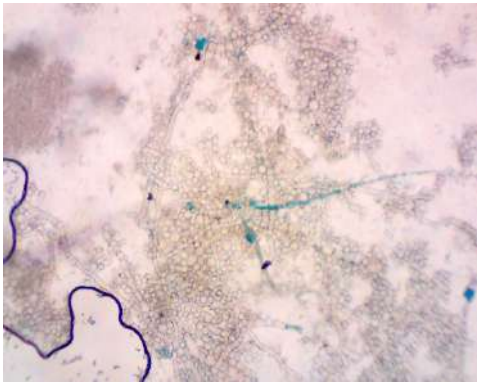
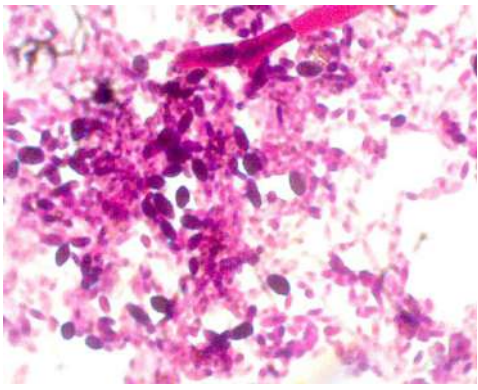
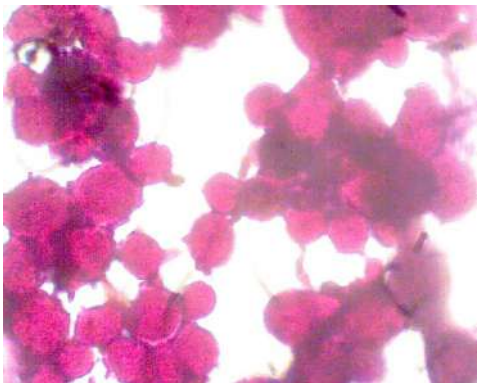
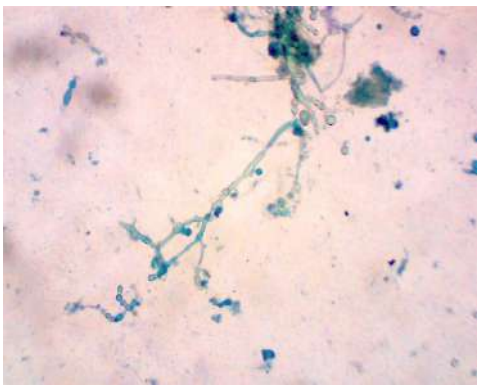
#### a. **Identificación de hongos**

En la tabla 3-3 se presentan los resultados obtenidos para la identificación de hongos. Es importante señalar que la identificación se realizó utilizando dos métodos: la tinción de Gram, que permite diferenciar algunas levaduras, y la tinción con azul de metileno, que facilita la observación de la morfología de los hongos. Esto último fue necesario, ya que la tinción de Gram no permitió visualizar adecuadamente las características morfológicas distintivas de los hongos.

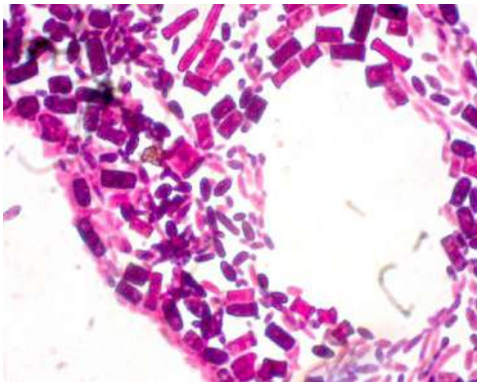
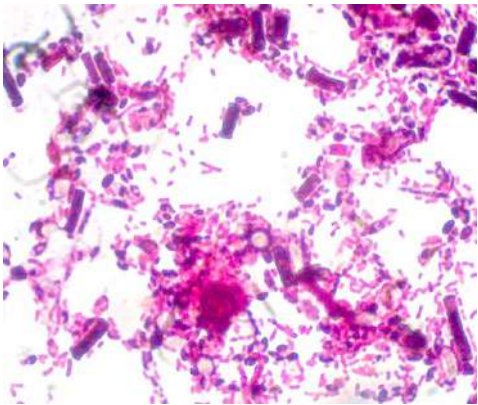
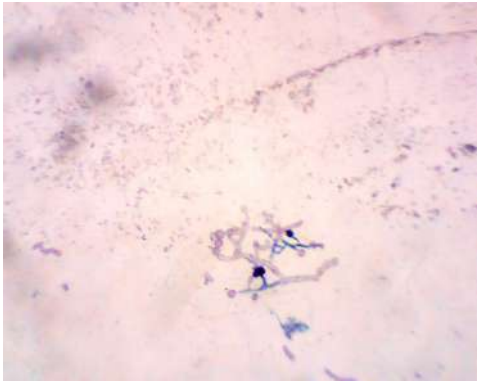
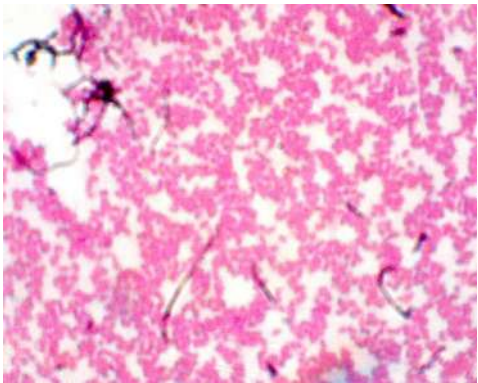




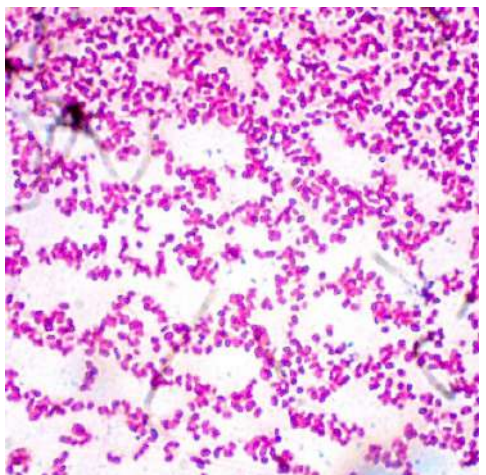
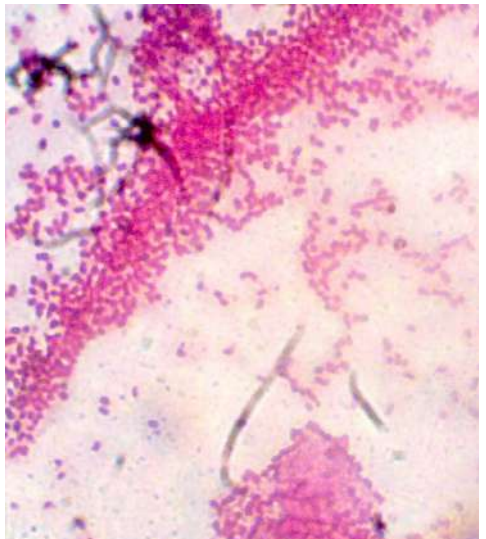
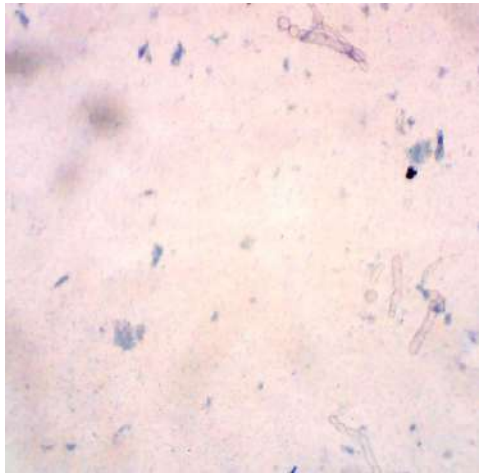
**Tabla 3-3:** Caracterización microscópica de hongos

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	

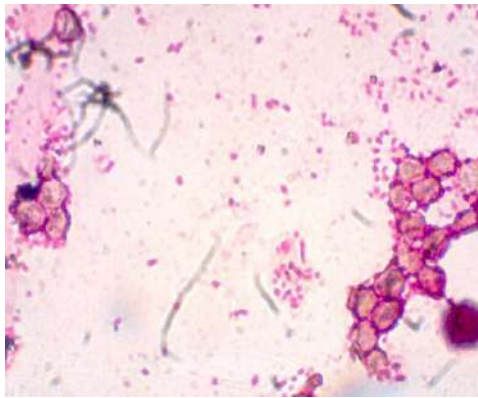
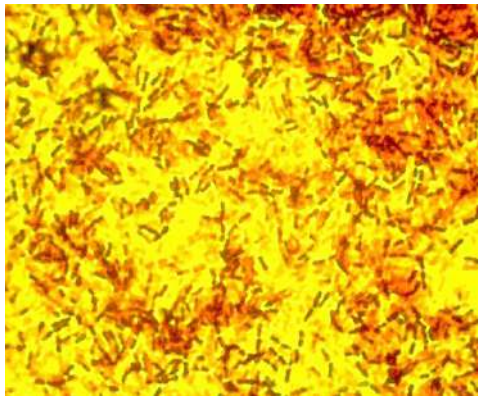


<p>M2C2</p> <p>Tinción Gram</p>	<p>Levaduras</p>	
<p>M3C</p> <p>Tinción Gram</p>	<p>Cocobacilos Gram -</p>	
<p>M3C</p> <p>Azul de metileno</p>	<p>Levaduras</p> <p>Hongo micelial</p>	
<p>M1G</p> <p>Tinción Gram</p>	<p>Cocobacilos Gram -</p>	



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



M3G Tinción Gram	Levaduras	
	Cocobacilos Gram -	
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 observó la morfología de diversas levaduras y hongos miceliales en las muestras analizadas, confirmando la presencia de estos organismos, que son responsables de degradar proteínas complejas y carbohidratos. Estos hongos y levaduras producen 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 de García et al. (2013) también demuestra la observación de hongos miceliales y levaduras, indicando la relevancia de estos organismos en los procesos que involucran el uso de microorganismos eficientes.

## B. Identificación de la Atmósfera de cultivo

Esta prueba permitió verificar la presencia de microorganismos capaces de sobrevivir en ambientes anaeróbicos, es decir, en ausencia total de oxígeno. Tras 24-48 horas de incubación, se observó crecimiento en estas condiciones.



En la tabla 4-3 se muestra el recuento de microorganismos anaeróbicos, mientras que en la tabla 5-4 se presenta su identificación mediante la técnica de tinción de Gram.

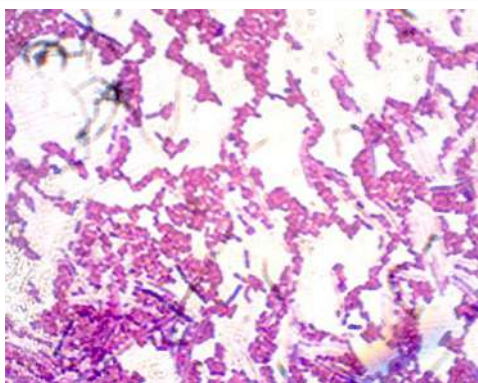
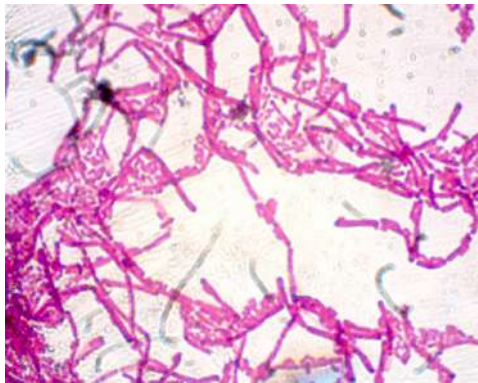
**Tabla 4-3:** Recuento en placa de microorganismos anaeróbicos

Muestra	Dilución	Resultado UFC/g
M1C	10 <sup>-6</sup>	2,1 x10 <sup>9</sup>
M2C	10 <sup>-6</sup>	Colonia Pura
M3C	10 <sup>-6</sup>	MNPC
M1G	10 <sup>-6</sup>	1,9 x10 <sup>8</sup>
M2G	10 <sup>-6</sup>	1,9 x10 <sup>8</sup>
M3G	10 <sup>-6</sup>	1,3 x10 <sup>8</sup>

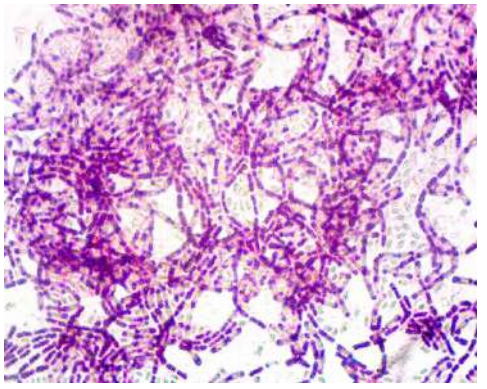
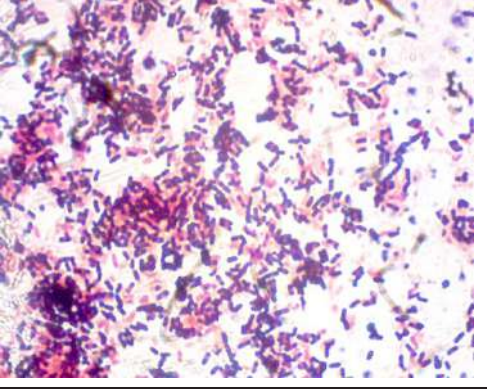

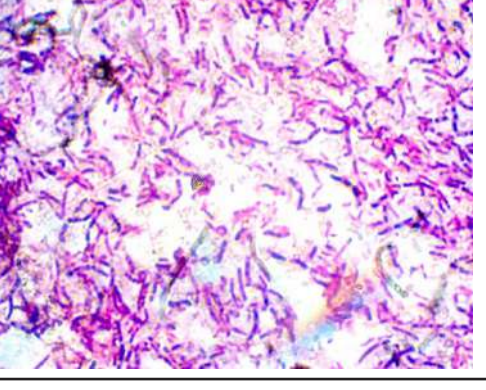
\*Los números 1, 2,3 corresponden al punto de muestreo; las letras C, G, corresponden respectivamente al lugar de muestreo Cumandá y Guano; MNPC: muy numeroso para contar.

**Realizado por:** Moreno J; Velarde K, 2016

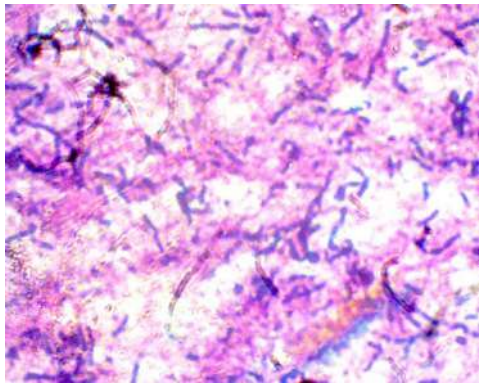
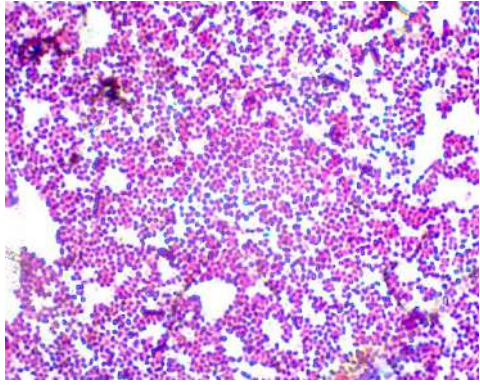
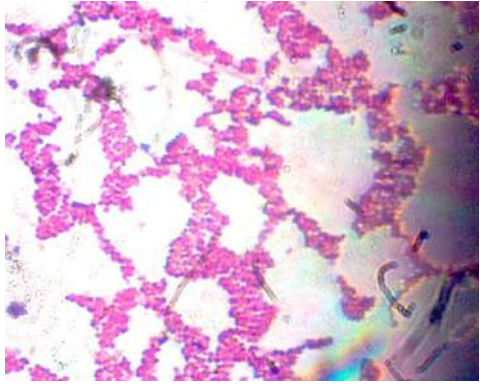
**Tabla 5-3:** Caracterización microscópica de microorganismos anaeróbicos

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

Los resultados obtenidos indican una abundancia de bacilos Gram positivos, la mayoría de los cuales se desarrollan incluso en condiciones anaeróbicas. Esto refleja que el suelo es un sistema complejo, capaz de albergar una gran diversidad de microorganismos que pueden adaptarse tanto a ambientes aeróbicos como anaeróbicos.



### C. Identificación del número de organismos por ml de inóculo.

Después de 24 horas de incubación a 37°C y utilizando una dilución de 10<sup>-6</sup>, se obtuvieron los siguientes resultados. Según la Guía de interpretación 3M (2013) para el Recuento de Aerobios Totales, el medio de cultivo listo para usar contiene nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador rojo que facilita el recuento de colonias. Las placas Petrifilm AC se emplean para determinar la población total de bacterias aerobias en productos y superficies.

En la tabla 6-3 se muestra el recuento de microorganismos aerobios totales por mililitro de inóculo en placa Petrifilm. Los cálculos correspondientes para estas placas, en las que se aplicó el método especificado, se encuentran en el Anexo B.

**Tabla 6-3:** Recuento de aeróbios totales

Muestra	Dilución	Resultado UFC/ml
M1C	10 <sup>-6</sup>	1,2x10 <sup>8</sup>
M2C	10 <sup>-6</sup>	1,2x10 <sup>8</sup>
M3C	10 <sup>-6</sup>	2,2 x10 <sup>9</sup>
M1G	10 <sup>-6</sup>	MNPC
M2G	10 <sup>-6</sup>	MNPC
M3G	10 <sup>-6</sup>	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 mil de inóculo

Muestra	Dilución	Resultado UPC/ml
M1C	10 <sup>-6</sup>	0
M2C	10 <sup>-6</sup>	6 x10 <sup>7</sup> mohos
		2,1 x10 <sup>8</sup> levaduras
M3C	10 <sup>-6</sup>	3,6 x10 <sup>8</sup> levaduras
MIG	10 <sup>-6</sup>	TNTC
M2G	10 <sup>-6</sup>	9 x10 <sup>7</sup> mohos
M3G	10 <sup>-6</sup>	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 un valor de 0 en la lectura, ya que la placa presentó un color uniforme en el medio, lo cual se atribuye a la presencia de “fosfatasa natural” en la muestra analizada. Todas las células vivas contienen la enzima fosfatasa, que activa el indicador en las placas Petrifilm de Levaduras y Mohos, coloreando de azul las colonias de estos microorganismos (3M, 2013).

Adicionalmente, se realizaron pruebas para detectar Salmonella, E. coli/ Coliformes y Staphylococcus aureus, tomando aleatoriamente dos muestras, en este caso la muestra 1 de Cumandá.

#### a. **Recuento de *Salmonella***

El análisis mostró la ausencia de Salmonella después de 24 horas de incubación.

#### b. **Recuento de *E. Coli/Coliformes***

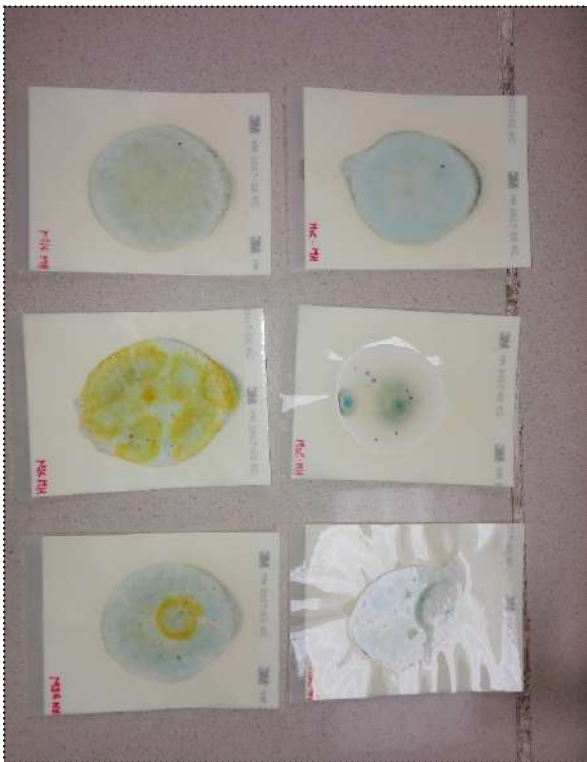
Según la Guía de interpretación 3M (2013), las Placas Petrifilm™ para el recuento de E. coli/Coliformes contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de colonias. Los resultados mostraron una sola colonia, lo que indica una concentración de 2x10<sup>7</sup> UFC/ml.



### c. Sistema de Recuento 3M Petrifilm Staph Express

La placa Petrifilm Staph Express, con medio cromogénico tipo Baird-Parker modificado, es selectiva y diferencial para *Staphylococcus aureus*, manifestándose en colonias rojo-violeta. En la identificación de *Staphylococcus aureus*, no se encontraron estas bacterias, ya que las colonias observadas eran de color azul-verdoso, lo cual indica que no se trataba de *S. aureus* (3M, 2013).

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



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

**Fuente:** Moreno J; Velarde K, 2016

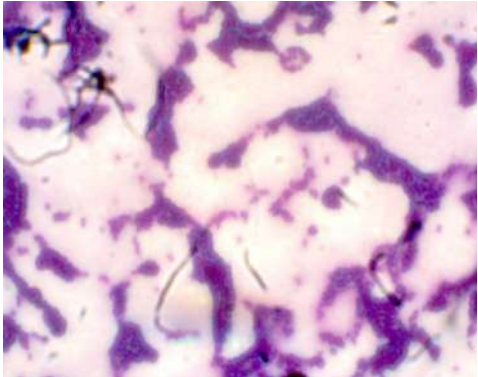
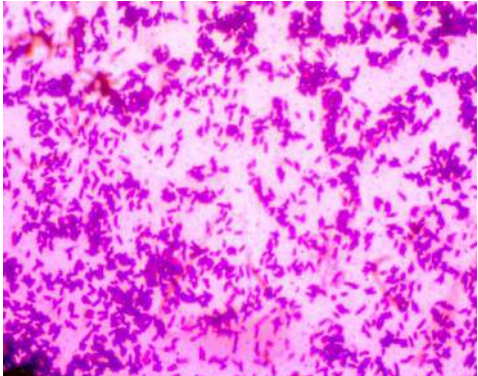
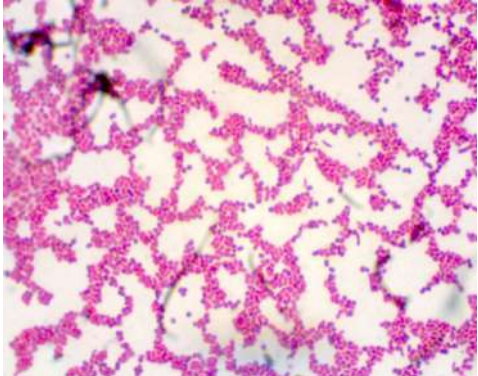
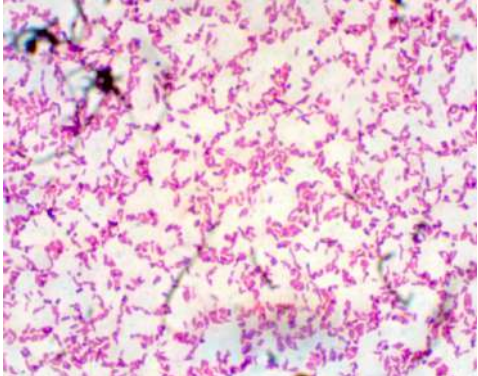
### D. Rango de comodidad calorífica

#### a. Microorganismos Psicrófilos

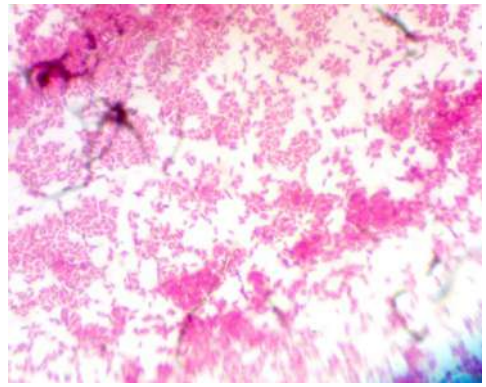
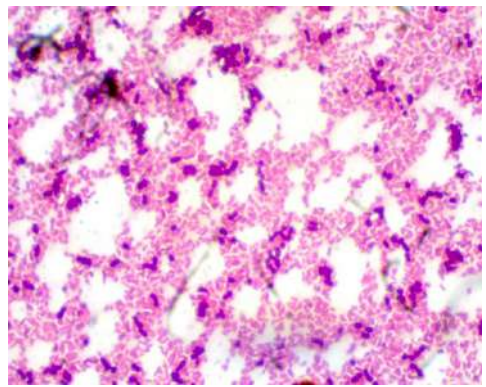
Los resultados obtenidos para microorganismos sometidos a una temperatura de 5 °C se muestran en la tabla 7-3.



**Tabla 8-3:** Microorganismos psicrofílos

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 los que los microorganismos estaban en condiciones óptimas para su desarrollo, a bajas temperaturas no se observó la presencia de bacilos en ninguna de las muestras. Según la tabla 7-3, se identificaron únicamente cocobacilos Gram positivos y Gram negativos. A temperaturas inferiores a la óptima, la velocidad de crecimiento de los microorganismos disminuye y los períodos de latencia se prolongan considerablemente.

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

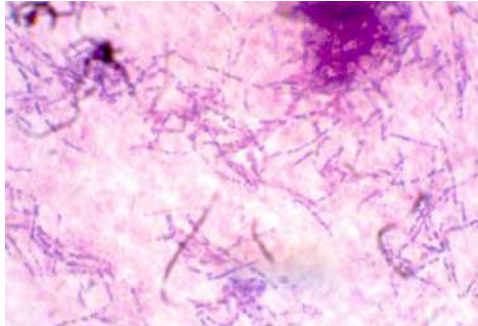
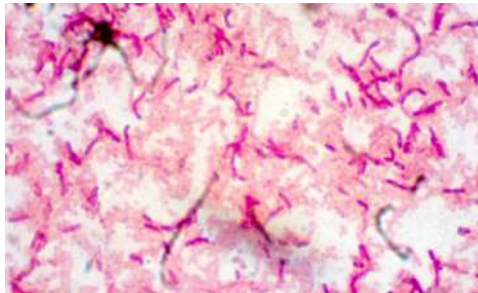
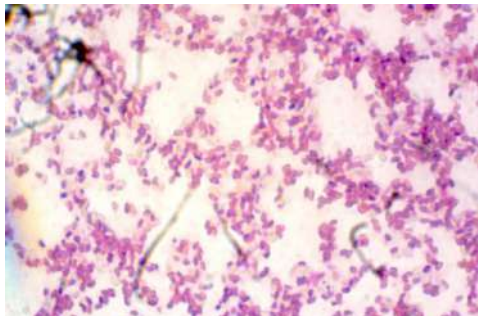
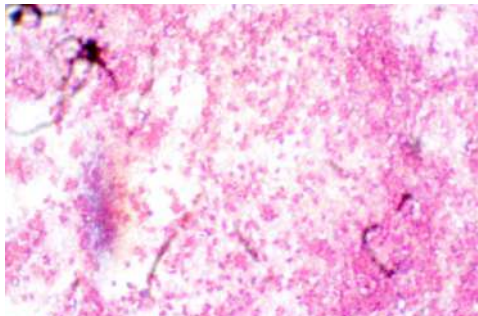
#### b. **Microorganismos mesófilos**

Los resultados de esta prueba se presentan en la tabla 2-3, que muestra las características microscópicas de los microorganismos, ya que 37°C es la temperatura óptima para el crecimiento de bacterias mesófilas.

#### 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



Algunos microorganismos pueden tolerar temperaturas superiores a la óptima, con un mínimo de 45°C y un rango ideal de 55 a 75°C para su desarrollo. Las técnicas de tinción permitieron identificar ciertos grupos morfológicos, como bacilos Gram positivos, bacilos Gram positivos esporulados y algunos cocobacilos Gram positivos y negativos.

Los microorganismos termófilos prosperan a temperaturas relativamente altas, superiores a 45°C, como aquellos que habitan en la superficie del suelo expuesto a radiación solar directa o en compost. En el caso de la muestra 3 de Cumandá y la muestra 1 de Guano, no se observó crecimiento debido a la falta de radiación solar directa en estos puntos, lo cual impidió que estos microorganismos soportaran el rango de temperatura indicado (EcuRed, 2016).

## ***PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS***

### *POTENCIAL DE ACIDIFICACIÓN*

El medio Kligler permitió determinar que los microorganismos aislados fermentan glucosa y lactosa, además de identificar la formación de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S). En este medio, la lactosa y la glucosa son los hidratos de carbono fermentables, mientras que el tiosulfato de sodio actúa como sustrato para la producción de ácido sulfhídrico. El citrato de hierro y amonio proporciona iones Fe<sup>3+</sup>, los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico para formar sulfuro de hierro de color negro.

El rojo de fenol se emplea como indicador de pH, virando a amarillo en medio ácido, mientras que el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar actúa como agente solidificante. Al fermentar los azúcares, los microorganismos producen ácidos, detectables gracias al cambio de color del indicador rojo de fenol. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno, que reacciona con la sal de hierro para formar el típico sulfuro de hierro negro (BritaniaLab, 2011).

Los resultados de este análisis indican la presencia de microorganismos que fermentan principalmente glucosa.



## USO DE CARBOHIDRATOS

Tras realizar la prueba en la galería API 20 NE (bioMérieux), se verificó que las cepas sometidas fermentan algunos azúcares, lo cual se evidenció por el cambio de color en los microtubos que contenían la muestra. En el anexo C se presentan las lecturas basadas en los cambios de color que indican la fermentación de los azúcares.

Las 6 cepas analizadas fermentaron los siguientes azúcares: D-glucosa (Glu), L-arginina, urea, esculina con citrato férrico, gelatina (hidrólisis de proteasa en GELatina) y asimilación de glucosa (|Glu|). A diferencia de las demás, la cepa de la muestra 2 de Guano mostró un cambio de color notable en la reacción con 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, lo cual no se observó en las otras cepas.

La tabla 9-3 presenta en detalle los resultados obtenidos en las pruebas de potencial de acidificación mediante el medio Kligler y el uso de carbohidratos con la galería 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 <sub>2</sub> 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

Las pruebas fermentativas realizadas confirman que las cepas bacterianas analizadas fermentan principalmente glucosa, como se observó en la prueba de Kligler y en la galería API. Esto se debe a la presencia de microorganismos cuyo principio activo es la fermentación de ciertas sustancias; un ejemplo de ello son las bacterias del ácido láctico, conocidas por fermentar azúcares y otros carbohidratos, así como las bacterias fotosintéticas, que son capaces de sintetizar compuestos útiles como aminoácidos, ácidos nucleicos, compuestos bioactivos y azúcares.



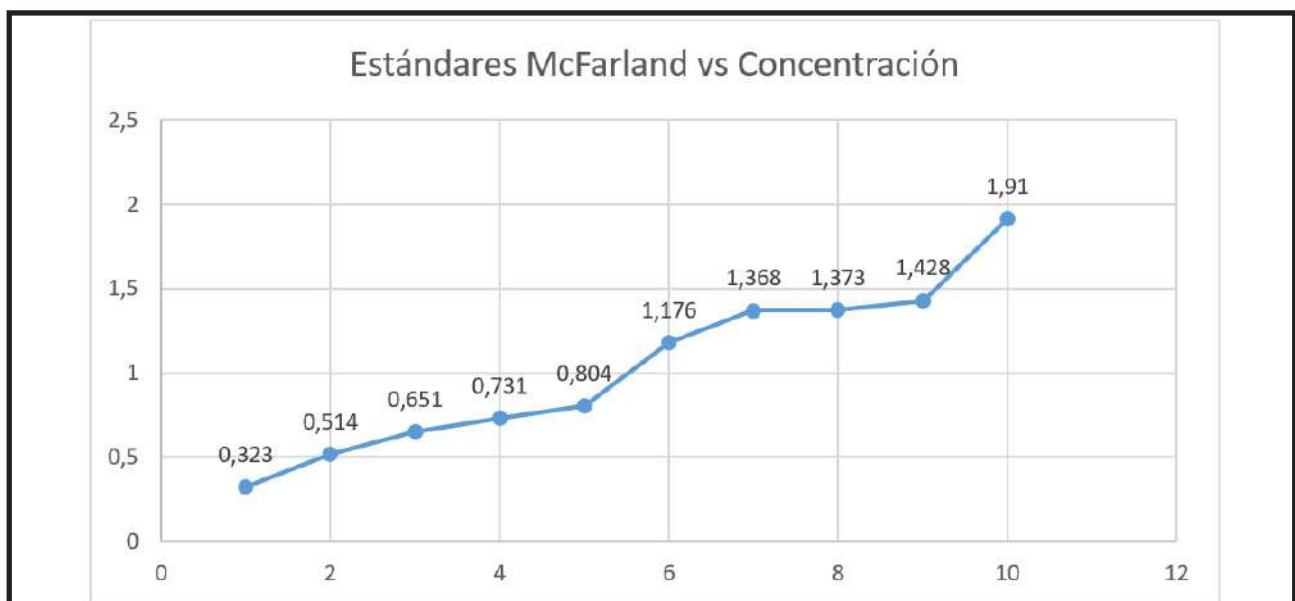
Las cepas M3C y M1G producen H<sub>2</sub>S, lo cual se identificó por la aparición de un color negro en el medio, indicando un entorno ácido y, por lo tanto, un proceso de fermentación. Asimismo, las cepas M2C, M3C y M1G muestran evidencia de producción de gas, observable por el desprendimiento y ruptura del agar, lo cual también sugiere actividad fermentativa en estos microorganismos.

## **POTENCIAL DE DEGRADACIÓN DE CELULOSA**

### **a. Escala de McFarland**

El uso de la escala de McFarland permitió determinar la concentración aproximada del inóculo bacteriano necesario para realizar la prueba de degradación de celulosa en microorganismos aislados de suelos de montaña y subtropicales.

En el anexo H se presentan los resultados obtenidos mediante espectrofotometría para los 10 estándares de la escala de McFarland, así como para las cepas bacterianas de cada punto de muestreo. En el gráfico 1-3 se muestran los valores de los 10 estándares de McFarland junto con los valores obtenidos en el espectrofotómetro.



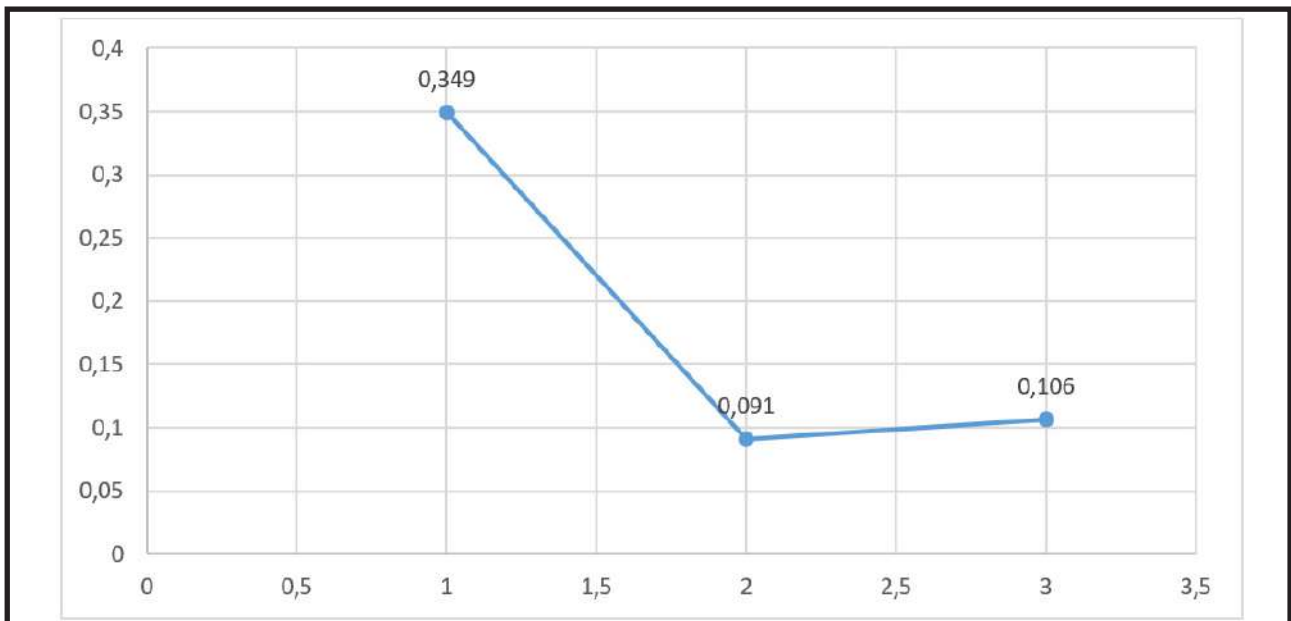
**Grafico 1-3.** Resultados de los 10 estándares de McFarland y sus concentraciones.

**Realizado por:** Moreno J; Velarde K, 2016



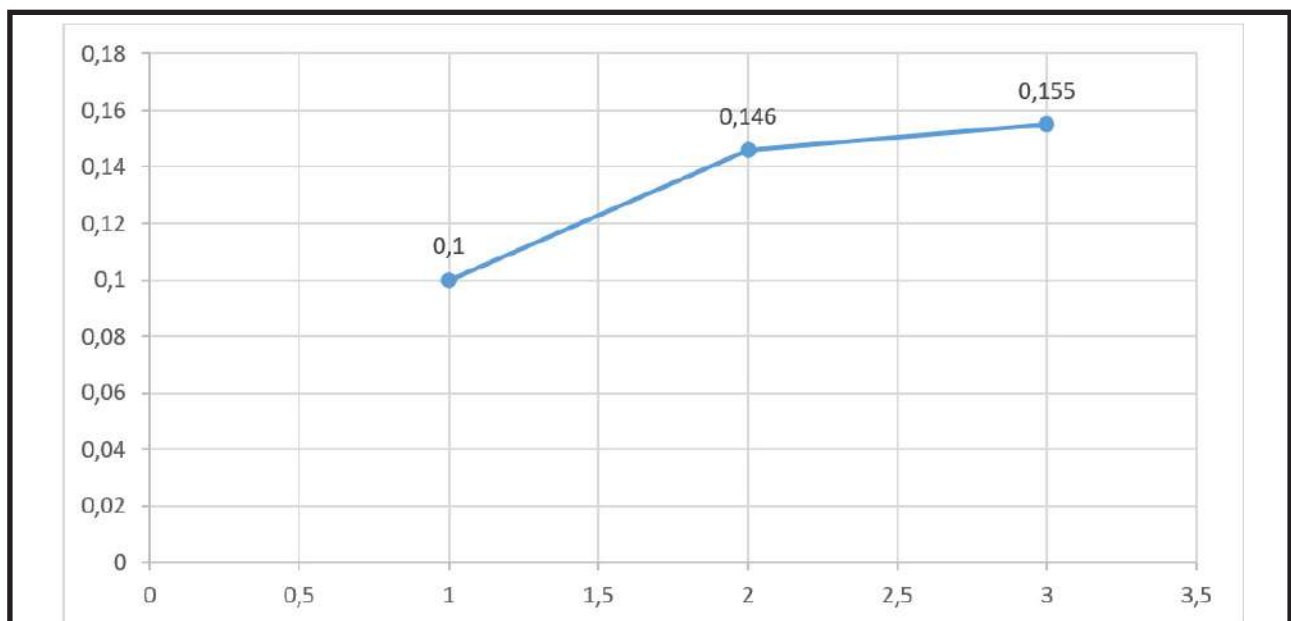


El grafico 2-3 y 3-3 representan respectivamente las cepas de cada punto de muestreo con los valores obtenidos de la lectura mediante espectrofotometría.



**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 calcular la concentración de UFC/ml en las cepas de estudio, se seleccionaron los valores más representativos de la gráfica 1-3, es decir, aquellos sin variaciones significativas. Se tomaron tres puntos dentro del intervalo de 0.514-0.731, eligiendo el valor intermedio de 0.651.

En el anexo H se observa que el valor de 0.651 es la media de las tres lecturas realizadas para el estándar 3 de McFarland, lo que corresponde a una concentración de  $9.0 \times 10^8$  UFC/ml.

Para calcular los valores en la tabla 10-3, que muestra los resultados de UFC/ml para cada cepa bacteriana analizada, se aplicó una regla de tres, utilizando el valor de referencia de 0.651 de la siguiente manera:

- **M1C**
- **M2C**
- **M3C**
- **M1G**
- **M2G**
- **M3G**

**Donde:**

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

**Tabla 11-3:** Resultados de la U.F.C/ml de las cepas bacterianas de cada lugar de muestreo

Muestra	u.f.c/ml
M1C	$4,82 \times 10^8$
M2C	$1,25 \times 10^8$
M3C	$1,46 \times 10^8$
M1G	$1,38 \times 10^8$
M2G	$2,01 \times 10^8$
M3G	$2,14 \times 10^8$

**Realizado por:** Moreno J; Velarde K, 2016



## **b. Prueba de degradación de celulosa**

Las observaciones de las cajas Petri a las 24, 48 y 72 horas mostraron que las cepas bacterianas analizadas no degradaron la celulosa, ya que el papel permaneció intacto. Esto indica que los microorganismos eficientes aislados de suelos de montaña y subtropicales no son degradadores de celulosa, aunque sí pueden fermentarla.

La celulosa, un carbohidrato, puede ser descompuesta a través de la fermentación. Entre los productos de esta fermentación se encuentran alcoholes, ácidos orgánicos, dióxido de carbono e hidrógeno. Estos productos son aprovechados por ciertas bacterias en procesos de fermentación especiales, incluyendo la fermentación anaeróbica, que produce metano y, en presencia de sulfato, ácido sulfhídrico (Mandujano, 2010).



## CONCLUSIONES

- Se aislaron microorganismos eficientes de tierra de montaña y subtropical mediante la técnica del arroz cocido, desarrollada por el Dr. Teruo Higa en la década de los 80. Estos microorganismos fueron inoculados en medios selectivos para bacterias y hongos, determinando que poseen un notable potencial biotecnológico.
- La caracterización in vitro de las cepas permitió definir su morfología, destacando que los aislados de subtropical presentan una mayor variedad de características en comparación con los de montaña, posiblemente debido a diferencias de temperatura y tipo de suelo. En todos los puntos de muestreo, se observó una predominancia de bacterias Gram positivas, presentes tanto en condiciones anaeróbicas como en ambientes con temperaturas bajas y altas. En el caso de hongos, la coloración con azul de metileno facilitó la identificación de hongos miceliales con formación de micelios distintivos, mientras que la tinción de Gram mostró una alta presencia de levaduras.
- Las pruebas bioquímicas realizadas evidenciaron que las cepas bacterianas aisladas poseen una gran capacidad para fermentar sustratos ricos en glucosa, lo que indica que estos microorganismos son útiles en procesos fermentativos. Aunque no son degradadores de celulosa, demostraron potencial como fermentadores, produciendo alcoholes, ácidos orgánicos, dióxido de carbono e hidrógeno como productos finales.
- Por su capacidad fermentativa, estos microorganismos tienen aplicaciones como activadores de biofertilizantes o abonos orgánicos y pueden contribuir a la fermentación de materia orgánica.



## RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización molecular de las cepas bacterianas para identificar su género y familia, y determinar con mayor precisión los tipos de bacterias presentes en las mezclas de microorganismos eficientes.
- Ampliar las pruebas bioquímicas de los microorganismos para evaluar su potencial biotecnológico en distintos sectores industriales.
- Realizar un estudio detallado de los hongos para comprender los procesos que llevan a cabo, mediante pruebas específicas adecuadas para estos microorganismos.
- Con las cepas bacterianas aisladas, efectuar pruebas de campo adicionales para confirmar su actividad biotecnológica.
- Evaluar la capacidad de las bacterias para degradar celulosa utilizando distintos sustratos con celulosa en diversas concentraciones.
- Aplicar las bacterias aisladas en procesos de fermentación, utilizando sustratos con carbohidratos para observar su efectividad.



## 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](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/123456789/4955/1/236To202.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](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\\_SistemasAPI.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_SistemasAPI.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/](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/handle/123456789/4962#sthash.QNisiOdK.dpdf>



edu.ec/bitstream/123456789/4909/1/236To189.pdf

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

**CRUZMORA, 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](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](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<sup>ta</sup> ed. Barcelona-España: Medica Panamericana, 2006, pp.164

**MADIGAN, Michael; et al. Paul.** *Biología de los microorganismos.* 12<sup>ma</sup> 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/curso%20microbiologia%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](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.** *Biotecnología 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.fundesyram.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.espech.edu.ec/bitstream/123456789/1390/1/17To893.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.





## ING. KRISTINA ESTEFANÍA VELARDE ESCOBAR, M.SC

Kristina Estefanía Velarde Escobar es una profesional ecuatoriana especializada en Biotecnología Ambiental y en Contaminación, Toxicología y Sanidad Ambiental, áreas en las que ha logrado una formación integral y profunda a través de sus estudios en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y su maestría en la Universidad de Valencia, España. Su carrera académica y profesional se enfoca en la preservación y mejora del medio ambiente, con un enfoque particular en el tratamiento de aguas y suelos, así como en el análisis de riesgos ambientales asociados a contaminantes.

En el ámbito profesional, desde 2020 es docente en la Universidad Estatal de Bolívar, donde ha impartido asignaturas como Química General, Bioquímica y Toxicología, además de colaborar en instituciones como el Sindicato de Chóferes Profesionales de Chimborazo. A lo largo de su trayectoria, ha fortalecido sus conocimientos a través de capacitaciones en gestión de residuos peligrosos, auditoría ambiental, metodologías de aprendizaje virtual y desarrollo de competencias docentes, demostrando un compromiso constante con la actualización profesional y la aplicación de nuevas tecnologías en la educación.

En el campo de la investigación, ha realizado estudios significativos sobre la detección de micotoxinas en alimentos y el uso potencial de microorganismos de montaña y zonas subtropicales, publicando sus hallazgos en revistas académicas y congresos internacionales. Su trabajo ha contribuido a la comprensión de la calidad de los alimentos y el agua en comunidades locales, con el objetivo de desarrollar estrategias de prevención y tratamiento de contaminantes. Su perfil profesional está caracterizado por la proactividad, el enfoque en el trabajo colaborativo y el compromiso con el desarrollo sostenible, buscando siempre implementar soluciones que promuevan un ambiente saludable y seguro para las generaciones futuras.

*Sé el cambio que quieres ver en el mundo*

- Mahatma Gandhi



## ING. VERÓNICA JANETH ARGÜELLO PAZMIÑO, M.SC

Verónica Janeth Argüello Pazmiño es una profesional ecuatoriana con formación sólida en ingeniería de sistemas informáticos, complementada con dos títulos de maestría. Obtuvo su primer título en Ingeniería en Sistemas Informáticos en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en 2014. Posteriormente, continuó sus estudios de posgrado, obteniendo una Maestría en Tecnologías de la Información con mención en Seguridad de Redes y Comunicaciones en la Universidad Particular Internacional SEK en 2018, y una Maestría en Matemática con mención en Modelación y Docencia en 2022, también en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

En su carrera académica, ha desempeñado diversos cargos docentes en prestigiosas instituciones de educación superior, tales como la Universidad Estatal de Bolívar y la Universidad de las Américas. Ha impartido materias en los campos de matemáticas, bioestadística, álgebra lineal, ecuaciones diferenciales, cálculo diferencial e integral, y estadística educativa, destacándose por su enfoque en la enseñanza de herramientas matemáticas aplicadas y su integración con tecnologías de la información.

Además, ha sido ponente en varios congresos académicos nacionales e internacionales, en temas relacionados con modelos matemáticos, análisis de datos y tecnologías de la información aplicadas.

También ha realizado investigaciones destacadas, entre las que sobresalen sus trabajos en modelos lineales generalizados para el análisis de defunciones en menores de un año y estudios relacionados con sistemas informáticos en salud. Ha publicado en diversas revistas académicas como la Revista Alfa Publicaciones, la Revista Polo del Conocimiento y la Revista Ibérica de Sistemas y Tecnologías de la Información. Uno de sus libros más destacados es Modelos lineales generalizados para el análisis de defunciones en menores de un año en la región Sierra del Ecuador (2023), que refleja su enfoque multidisciplinario entre matemáticas y salud.

Con amplia experiencia tanto en docencia como en investigación, ha contribuido significativamente al ámbito académico en Ecuador, impulsando el uso de tecnologías digitales en la educación y promoviendo el desarrollo de competencias en el área de la matemática aplicada y la estadística.

*La educación no es una preparación para la vida. La educación es la vida misma*

- John Dewey



## VET. OSWALDO AMANGANDI SINCHIPA, M.SC

Oswaldo Amangandi Sinchipa es un profesional veterinario con amplia formación y experiencia en el ámbito académico y agropecuario. Graduado como Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia en 2004 por la Universidad Estatal de Bolívar, ha profundizado sus conocimientos con una maestría en Desarrollo Local con mención en Movimientos Sociales (2015) en la Universidad Politécnica Salesiana y otra en Producción y Nutrición Animal (2019) en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

En el ámbito laboral, Oswaldo ha desempeñado roles clave en el Ministerio de Agricultura y Ganadería, destacándose como Técnico de Campo y Responsable de Planificación y Gestión Estratégica, además de ser Responsable Pecuario de PIPPA en Bolívar.

Su experiencia docente es notable en la Universidad Estatal de Bolívar, donde ha impartido asignaturas como Anatomía, Embriología, Nutrición Animal, y Patología General, contribuyendo a la formación de futuros veterinarios desde 2022. A lo largo de su carrera, ha participado en diversos congresos y seminarios nacionales e internacionales, manteniéndose actualizado en metodologías educativas y en las últimas innovaciones en el sector agropecuario, como inseminación artificial y buenas prácticas agropecuarias.

Entre sus logros académicos, destacan sus publicaciones en revistas científicas, donde ha abordado temas de nutrición y producción animal, aportando al conocimiento científico en el área. Su perfil destaca por su compromiso con el desarrollo rural y la educación superior en ciencias agropecuarias.

*Educando para una vida de calidad en el mundo*

*- Marcelino Muñuz*



## VET. JENIFFER PATRICIA CHAFLA VALVERDE, MGTR.

### **TRAYECTORIA PROFESIONAL DEL AUTOR:**

Medica Veterinaria y zootecnista – Universidad Estatal de Bolívar, Magister en Medicina Veterinaria mención clínica y cirugía Universidad Católica de Cuenca.

### **HABILIDADES PROFESIONALES**

Soy una persona en continuo entrenamiento y formación, dentro y fuera del país. Mis principales características son: el liderazgo, la responsabilidad, la honradez y la versatilidad. A lo largo de estos años, he desarrollado ampliamente mis aptitudes profesionales.

### **RECONOCIMIENTO**

Reconocimiento de la Subsecretaria de Producción Pecuaria, del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, por el trabajo realizado durante el Proyecto Nacional de Ganadería Sostenible resaltando su dedicación y compromiso en el cumplimiento de los objetivos establecido.

### **EXPERIENCIA PROFESIONAL**

He desempeñado cargos como

- Medica Veterinaria Ministerio de Agricultura y ganadería.
- Docentecapacitador / Centro de capacitación desarrollo de ciencia y educación.
- Investigadora de la Universidad Católica de Cuenca con publicaciones en Revista Arbitrada Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud y Vida "Estudio Evaluación del marcador tumoral (PSA) en suero sanguíneo para el diagnóstico de trastornos prostáticos caninos".

### **CURSOS Y SEMINARIOS REALIZADOS**

Curso práctico en ecografía reproductiva bovina, Curso en autorización de responsable técnico y/o almacenista, Formación de implementadores en buenas prácticas, Sanidad animal, Administración de fincas, establos ganaderos y escuela, Influenza aviar y su incidencia en la industria avícola, Capacitación fiebre aftosa, estrategias, Curso práctico en podología bovina

*Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos*

- Aristóteles



AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES POTENCIALES DE  
**MICROORGANISMOS DE  
TIERRA, DE MONTAÑA Y  
SUBTRÓPICO**

**ingenius**  
Académico

ISBN: 978-9942-48-666-0



9 789942 486660



ingenius