

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

**“Caracterización preliminar de aislamiento de
Microorganismos, mediante la técnica de E.M., a nivel de
comunidades vegetales en dos zonas de vida ecológicamente
diferentes”**

TESINA DE SEMINARIO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIEROS AGROPECUARIOS

Presentada por:

**Jorge Luis Enríquez Brito
Jorge Luis Viera Briones**

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2010

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Felipe Mendoza, por su invaluable ayuda en el desarrollo de este Seminario.

Al Dr. Efrén Santos, Dra. Ester Lilia Peralta y Tnlg. David Catagua por su ayuda en laboratorio.

Al egresado Luvik Amores, por su información en el Bosque Sacha Wiwua.

DEDICATORIA

A DIOS,

A MIS PADRES

ALBERTO ENRÍQUEZ Y TERESA

BRITO POR DARME EL APOYO

PARA LA CULMINACIÓN DE MIS

ESTUDIOS.

JORGE ENRÍQUEZ B.

DEDICATORIA

A MI MADRE GUINETT BRIONES POR
SER LA LUZ EN TODO MOMENTO.

A MI PADRE JORGE VIERA POR SU
APOYO INCONDICIONAL.

A MI HERMANO ALBERTO.

A MI FAMILIA EN GENERAL POR
EL APOYO OTORGADO.

JORGE VIERA B.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Francisco Andrade S.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Ing. Felipe Mendoza G.
DIRECTOR DE TESINA

Dr. Efrén Santos O.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesina de Seminario, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Jorge Luis Enríquez B.

Jorge Luis Viera B

RESUMEN

Mediante la presente investigación se llevó a cabo el estudio de microorganismos nativos en dos zonas ecológicamente diferentes, estos fueron obtenidos alrededor de especies de plantas con flores (Angiospermas) que poseen documentada información de atracción sobre la microbiota del suelo.

Estos microorganismos nativos fueron capturados con la técnica del E.M, realizada por el Dr. Teuro Higa, quien es el precursor de este novedoso sistema. Los cuales son utilizados como materia prima en la fabricación artesanal de bioestimulantes para aplicación en suelos, cultivos, sectores pecuarios y ambientales.

Se realizó una caracterización preliminar de los microorganismos encontrados para establecer diferencias y similitudes entre las zonas del presente proyecto; sin embargo, se escogieron iguales familias de plantas con diferentes especies que demostraron en los resultados de laboratorio algunas similitudes y diferencias entre ellas.

Dichos resultados demostraron una variabilidad de características morfológicas de las bacterias; realizándose pruebas bioquímicas como la Prueba de Catalasa para determinar el proceso respiratorio que utilizan las bacterias para la obtención de energía; además se realizó la prueba de Óxido-Fermentación, mediante esta prueba se determinó si la utilización de los hidratos de carbono por parte de un microorganismos, es decir especificar si las colonias encontradas poseían proceso aeróbico (presencia de oxígeno); poseían un proceso anaeróbico (ausencia de oxígeno); o a su vez se determinó si el microorganismo poseía metabolismo facultativo (ambos procesos).

Se encontraron colonias con morfología interesantes, sobre el abanico de características presentes en ambas comunidades a nivel de bacterias; en pruebas bioquímicas como la Prueba de Catalasa, encontramos un factor indudable sobre el resultado negativo, sin importar de qué familias o bosques procedía el aislamiento. En lo que tiene que ver sobre la respiración se encontró un porcentaje mayor en respiración facultativo, seguidos por menores porcentajes en respiración aeróbica y anaeróbica respectivamente.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
SIMBOLOGÍA.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. COMUNIDADES VEGETALES Y MICROORGANISMOS	
EFICIENTES.....	4
1.1 Caracterización del medio biótico.....	4
1.2 Interacción entre la vegetación y microbiota de los suelos.....	6
1.3 Principales fuentes de microorganismos benéficos.....	7

1.4	Formación y composición del E.M.....	9
1.4.1	Origen del E.M.....	9
1.4.2	Bacterias Productos de Ácidos lácticos.....	10
1.4.3	Levaduras.....	10
1.4.4	Hongos Filamentados.....	10
1.4.5	Bacterias Fotosintéticas.....	11
1.5	Técnicas y sustratos utilizados en la colonización de microbios.....	12
1.5.1	Familias y especie de plantas seleccionadas para el proceso.....	12
1.5.2	Técnicas y procedimientos usados.....	18
1.6	Microorganismos efectivos en la agricultura.....	19
1.6.1	Fisiología del E.M en cultivos.....	20
1.6.2	Técnicas de aplicación.....	20
1.6.3	Efectos del E.M en la producción y fitosanidad de cultivos.....	21

CAPÍTULO 2

2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1	Características del ensayo.....	24
2.1.1	Ubicación, localizaciones geográficas y ecológica...	24
2.1.2	Clima, suelo y vegetación.....	26

2.2	Materiales, herramientas y reactivos usados.....	29
2.3	Sistemas de clasificación de angiospermas empleados.....	30
2.4	Formas y hábito de angiospermas consideradas en el muestreo y evaluación.....	31
2.4.1	Arbustos.....	31
2.4.2	Árboles.....	31
2.5	Manejo del ensayo.....	32
2.5.1	Fase de campo.....	32
2.5.1.1	Selección de familias y especies.....	32
2.5.1.2	Colocación de trampas.....	35
2.5.1.3	Recolección de trampas en campo.....	37
2.5.2	Fase de laboratorio.....	37
2.5.2.1	Siembra.....	41
2.5.2.2	Purificación.....	43
2.5.2.3	Técnica de siembra de dilución por estría...	44
2.5.2.4	Tinción de Gram.....	46
2.5.2.5	Pruebas Bioquímicas.....	49

CAPÍTULO 3

3.	ANÁLISIS Y RESULTADOS.....	55
3.1	Caracterizaciones morfológicas de las colonias obtenidas.....	56
3.1.1	Color.....	57

3.1.2	Forma.....	58
3.1.3	Relieve.....	60
3.1.4	Borde.....	62
3.2	Tinción de Gram.....	65
3.3	Análisis Bioquímicos obtenidos.....	69
3.3.1	Prueba Óxido/Fermentación.....	69
3.3.2	Prueba Enzimática en relación al oxígeno: Catalasa...	72

CAPÍTULO 4

4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	78
----	-------------------------------------	----

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

AN	Agar Nutrient
APG	Angiosperm Phylogen Group
BdTb	Bosque Deciduo de Tierras Bajas
BhPm	Bosque Húmedo Pie Montano
BPP	Bosque Protector Prosperina
BSW	Bosque Sacha Wiwua
EM	Microorganismos Eficientes
gr	Gramos
GPS	Sistema de Posicionamiento Global
H y L	Hugh y Leifson
Kg	Kilogramo
Km	Kilómetro
Lt	litro
ml	mililitros
mm	milímetros
msnm	metros sobre el nivel del mar
O/F	Oxido fermentativo
SAB	Saboraud

SIMBOLOGÍA

°C	Grados centígrados
%	porcentaje
°	Grados
'	Minutos
"	Segundos
S	Sur
O	Oeste
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Agua Oxigenada
ClNa	Cloruro de Sodio

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.1	Representación taxonómica del clado Magnoliide basado en FREIRE 2004.....	13
Figura 1.2	Representación taxonómica del grupo Urticales basado en BERG 2004.....	14
Figura 2.1	Trampa utilizada para la obtención de E.M.....	36
Figura 2.2	Trampa con microorganismos recolectada en campo.....	37
Figura 2.3	Materiales y reactivos en autoclave para esterilización.....	38
Figura 2.4	Medios de crecimiento utilizados en los cultivos bacterianos.....	40
Figura 2.5	Preparación de diluciones.....	41
Figura 2.6	Siembra de microorganismos.....	42
Figura 2.7	Rotulación de medios de cultivos en caja Petri...	43
Figura 2.8	Purificación de microorganismos en medios de cultivos.....	44
Figura 2.9	Siembra de dilución por estrías.....	46
Figura 2.10	Tinción de Gram.....	47
Figura 2.11	Resultado de tinciones.....	48
Figura 2.12	Prueba Óxido fermentativa.....	54
Figura 3.1	Porcentaje de colores de bacterias encontradas en BhPm.....	57
Figura 3.2	Porcentaje de colores de bacterias encontradas en BdTb.....	58
Figura 3.3	Porcentaje de formas de bacterias en BhPm.....	59
Figura 3.4	Porcentaje de formas de bacterias en BdTb.....	60
Figura 3.5	Porcentaje de relieve de bacterias en BhPm.....	61
Figura 3.6	Porcentaje de relieve de bacterias en BdTb.....	62
Figura 3.7	Porcentaje de borde de bacterias en BhPm.....	63
Figura 3.8	Tinción de Gram BhPm.....	67
Figura 3.9	Tinción de Gram BdTb.....	68
Figura 3.10	Prueba de Hugh-Leifson en aislamiento BhPm .	71
Figura 3.11	Prueba de Hugh-Leifson en aislamiento BdTb...	71

Figura 3.12	Porcentaje en Prueba de Catalasa BdTb.....	73
Figura 3.13	Porcentaje en Prueba de Catalasa BhPm.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Características ambientales de las zonas ecológicas en estudio.....	25
Tabla 2	Flora característica de las zonas de estudio basado en Bodero (1995) y Sierra (1999).....	27
Tabla 3	Flora característica de la zona de estudio basado en Amores (s/f) y Sierra (1999).....	28
Tabla 4	Materiales y equipos utilizados en la implementación del proyecto.....	29
Tabla 5	Modificación de APG en familias botánicas descritas en el ensayo respecto de otros sistemas de clasificación.....	30
Tabla 6	Referencias Técnicas usadas en la identificación de especies de árboles para colocación de trampas en la captura de microbios útiles.....	34
Tabla 7	Familias y especies de Angiospermas seleccionadas para colocación de trampas para captura de microbios útiles en la Microflora de suelos.....	35
Tabla 8	Reactivos y cantidades necesarias en prueba Óxido Fermentativa basado en MERCK 2008.....	52
Tabla 9	Grupos Taxonómicos en estudio.....	56
Tabla 10	Descripción de bacterias encontradas en laboratorio, correspondiente al Bosque Húmedo Pie Montano.....	64
Tabla 11	Descripción de bacterias encontradas en laboratorio, correspondiente al Bosque Deciduo de Tierras Bajas.....	65
Tabla 12	Descripción de bacterias según la prueba de Hugh-Leifson	72

INTRODUCCIÓN

Un papel fundamental en la diversidad biológica que se encuentra en nuestros suelos; es que en estos conviven numerosos tipos organismos microscópicos como bacterias y hongos, que pueden ofrecer grandes beneficios a la Agricultura; pues estos contribuyen a la formación del suelo y que participan en la degradación de la materia orgánica y en los ciclos de elementos como el carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, entre otros.

Estas sustancias aportan a la fertilidad del suelo y son utilizados por los seres vivos en su metabolismo, muchos de estos viven alrededor de las raíces de las plantas e influyen en su crecimiento ya que ayudan a absorber nutrientes y las protegen o evitan el ataque de microorganismos patógenos.

En la actualidad, biólogos, microbiólogos y ecólogos estudian las comunidades microbianas del suelo en busca de microorganismos beneficiosos que puedan ser utilizados en la agricultura, para proteger los cultivos del ataque de plagas o enfermedades, como fertilizantes “amigos” del medioambiente (biofertilizantes), lo cual da importancia al presente trabajo de investigación, el cual tuvo como punto principal de estudio la caracterización preliminar de colonias bacterianas presentes a nivel del Bosque Sacha Wiwua en la Provincia de Cotopaxi y el Bosque Protector

Prosperina en la Provincia del Guayas, para aportar información de la microbiota presente en las comunidades vegetales.

Para lo cual se realizó una investigación bibliográfica sobre los microorganismos más comunes presentes en los suelos en relación a familias de plantas con flores (Angiospermas), presentes en ambos ecosistemas.

Basándose en lo argumentado anteriormente, se planteó los siguientes objetivos

OBJETIVOS GENERAL.

Realizar un estudio comparativo a nivel de Microflora útil de suelos, mediante la caracterización in vitro de colonias de microorganismos y en relación a dos ecosistemas nativos

OBJETIVO ESPECÍFICO.

- Investigar las familias y especies de angiospermas arbustivas relacionadas con la mayor producción de Microflora benéfica del suelo.
- Implementar el método de E.M (microorganismos eficientes) en la captura de poblaciones de microorganismos nativos.
- Describir y resaltar las poblaciones de microorganismos encontrados desde trampas naturales hasta el aislamiento en el laboratorio.

CAPÍTULO 1

1. COMUNIDADES VEGETALES Y MICROORGANISMOS EFICIENTES.

1.1 Caracterización del medio biótico.

- Bosque deciduo de tierras bajas

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

entre las provincias de Manabí en el Parque Nacional Machalilla y en la base del Cerro Montecristi, en la provincia del Guayas en Cerro Blanco y las bases de los cerros Masvale, Cimalón, Perequetre, Mate y Pancho Diablo en la Reserva Ecológica Manglares-Churute. (35)

- Bosque húmedo pie-montano

Son bosques con alto endemismo (aproximadamente 10 %), los árboles alcanzan más de 30 m de alto, con una gran concentración de epífitas y un sotobosque arbustivo y herbáceo abundante en las familias Araceae, Heliconiaceae, Cyclanthaceae, Piperaceae, Orchidaceae y Gesneriaceae. Se ubica en el occidente de las provincias de Cotopaxi, Los Ríos, Bolívar y Azuay-Guayas, entre 300 y 1.300 m.s.n.m. El Bosque húmedo Pie-montano crece donde la estacionalidad del clima no es lo suficientemente fuerte como para producir una estación seca. La vegetación siempreverde puede desarrollarse aún si la precipitación se encuentra por debajo de los 100mm mensuales. (31)

1.2 Interacción entre vegetación y microbiota de los suelos.

Las plantas establecen distintos tipos de interacciones con las bacterias que colonizan al suelo, a las diferentes zonas de la raíz, de la superficie aérea y de su interior. Estos microorganismos pueden tener efectos benéficos o deletéreos para las plantas (13).

Las plantas surgieron entre el sol y el suelo con sus microorganismos. En el suelo se encuentra una de las diversidades más altas de bacterias, entre 10^4 - 10^5 o más especies diferentes por gramo de suelo con 10^{12} bacterias totales por gramo. Seguramente plantas y microorganismos han coevolucionado durante cientos de millones de años. Las relaciones que se establecieron entre plantas y bacterias son de lo más diversas, tanto mutualistas y las patogénicas. (23)

La microbiota del suelo juega un papel fundamental en la regulación de los ecosistemas terrestres, influyendo en la productividad, diversidad y estructura de las comunidades vegetales (2).

Las diferentes especies de bacterias y hongos son los responsables de liberar los nutrientes del suelo, dejándolos

disponibles para que sean nuevamente absorbidos por las plantas; por ejemplo, el carbono inorgánico (dióxido de carbono) es convertido en carbono orgánico (Carbohidratos); convierten el nitrógeno atmosférico en sus formas asimilables como el amonio, y los nitratos (nitrificación), y liberan el fósforo atrapado en los minerales insolubles (solubilización). Además participan activamente en la transformación de la materia orgánica, liberando agua y nutrimentos (32).

1.3 Principales fuentes de microorganismos benéficos.

Hay al menos cinco grandes fuentes de microorganismos benéficos utilizables en agricultura.

Mantillos. La fuente primaria de microorganismos benéficos agrícolas se encuentra en el litter, mantillo o tierra de capote o primera película de tierra bajo la hojarasca y material desprendido de las selvas y bosques o de algunos agrosistemas poliestratificados, es decir, bajo sombrío de árboles (18).

Esta primera capa de tierra es a la vez efecto y residencia de los microorganismos que, vehiculizados en el humus, convierten los

residuos de vegetación y fauna en tierra fértil (30). Numerosas culturas antiguas han utilizado el mantillo como abono natural (18).

Compost. Diversas escuelas alternativas se aproximan al humus a través de diversos mecanismos, particularmente los compost y muy especialmente los lumbricompost; en estos últimos las excretas de las lombrices son resultado del complejo microbial digestivo. (33)

Caldos microbiales. Se trata de la multiplicación por vía líquida de microorganismos benéficos, de los cuales los cuatro grupos más cultivados son: bacterias fotosintetizadoras, llamadas algas unicelulares, levaduras, lactobacilos, actinomicetos. (36)

Micorrizas. Tienen un papel importante en el comportamiento del árbol, por aumentar la capacidad de absorción de los elementos nutritivos, al producir nuevas ramificaciones absorbentes y aumentar el área de contacto de la raíz con el suelo (36).

La función principal de las micorrizas es ayudar a que los nutrientes del suelo sean absorbidos fácilmente por las plantas ya cambio las plantas le suministran carbohidratos esenciales en la vida del hongo (24).

Entomopatógenos. Son microorganismos que causan enfermedades en artrópodos (insectos, ácaros, arácnidos, etc.) y por los mismos son útiles en controles biológicos (24).

1.4 Formación y Composición del E.M.

El EM (microorganismos eficientes), es una mezcla de varios microorganismos benéficos, tanto aeróbicos como anaeróbicos. Entre estos se encuentran bacterias ácido láctico y fotosintético, levaduras, hongos como los actinomicetos y hongos fermentadores (24). Estos microorganismos existen en gran cantidad en la naturaleza y son usados para el procesamiento de alimentos y de comida animal fermentada. Son totalmente seguros para los seres humanos y animales (18).

1.4.1 Origen del E.M.

El EM fue desarrollado por el Dr. Teuro Higa, profesor de agricultura de la Universidad de Ryukyus en Japón, con el fin de incrementar los microorganismos benéficos y la diversidad microbiana del suelo, y a su vez, aumentar el crecimiento, producción y calidad de los cultivos (18).

Desde entonces, esta tecnología ha sido investigada, desarrollada y aplicada a una multitud de usos agropecuarios y ambientales, siendo utilizada en más de 80 países del mundo (16).

1.4.2 Bacterias productoras de Ácido Láctico.

Producen ácido láctico a partir de azúcares que son sintetizados por las bacterias fotosintéticas y levaduras. El ácido láctico puede suprimir microorganismos nocivos como el Fusarium (24).

1.4.3 Levaduras

Degradan proteínas complejas y carbohidratos. Producen sustancias bioactivas (vitaminas, hormonas, enzimas) que pueden estimular el crecimiento y actividad de otras especies de EM, así como de plantas superiores (1).

1.4.4 Hongos filamentosos.

Son los que se encuentran presentes en la producción de alimentos fermentados. Este grupo coexiste con otros

microorganismos y, es en especial, eficaz en el aumento ésteres dentro del suelo, por la fuerte capacidad de formación de alcohol y ácidos orgánicos, hay prevención contra la aparición de larvas y otros insectos dañinos, se observa también gran efecto en la disipación del olor (22).

1.4.5 Bacterias fotosintéticas.

Las bacterias fotosintéticas son microorganismos autotróficos, que tienen como fuente de energía la luz y el calor recibidos por el suelo, sus secreciones son las que salen por la raíz de la planta, la materia orgánica y los gases nocivos. (Sulfato de hidrógeno). (15).

Pueden fijar Nitrógeno atmosférico y bióxido de Carbono en moléculas orgánicas, tales como aminoácidos y carbohidratos, también sintetizan sustancias bioactivas. Llevan a cabo una fotosíntesis incompleta, lo cual hace que la planta genere nutrimentos, carbohidratos, aminoácidos, sin necesidad de la luz solar, permite que la planta potencialice procesos completos las 24 horas del día. (15).

1.5 Técnicas y sustratos utilizados en la colonización de microbios.

Para la propagación de microbios se depositan 4 onzas de arroz cocinado sin aceite ni sal dentro del tarro de plástico, tapando con una tela nylon para cubrir la boca del recipiente. Asegúrelo bien y entierre el tarro junto a un talud húmedo, poniendo sobre el nylon materia orgánica semidescompuesta. (18)

Después de 2 semanas desentierre el tarro y saque el arroz que estará impregnado de bacterias descomponedoras de la materia orgánica (4).

Licúe el arroz y mézclelo en una solución a base de 1 litro de melaza y tres litros de agua pura, cocinada y fresca (solución madre) (7).

1.5.1 Familias y especies de plantas seleccionadas para el proceso.

✓ Clado Magnoliide

Es el nombre de un taxón de plantas usado por APG (Angiosperm Phylogeny Group), y que en otros

sistemas de clasificación (Cronquist et al) correspondía a las clases [Magnoliopsida](#) y Liliopsida, división [Magnoliophyta](#) (angiospermas). (15)

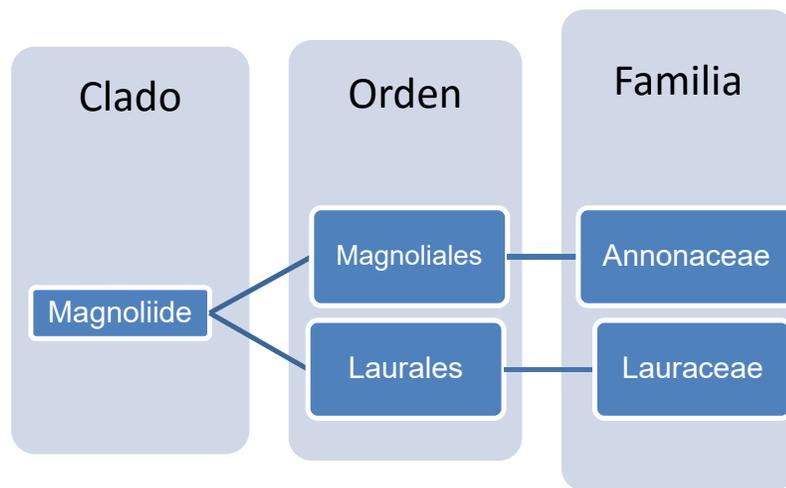


FIGURA 1.1 TAXONOMÍA DEL CLADO MAGNOLIIDE BASADO EN FREIRE (2004)

- Familia Lauraceae

[Árboles](#) de hojas simples alternas o subopuestas, sin [estípulas](#) (17). Esta familia presenta igual flujo de metabolitos secundarios; aporta con las funciones ecológicas en los suelos, además que aporta el 28 % de hojarasca en el suelo (21).

- Familia Annonaceae

Árboles o arbustos muy aromáticos con hojas simples, enteras, alternas y dísticas. (13). La familia Annonaceae, ha presentado interacciones planta – microorganismos por la actividad de metabolitos secundarios con marcada actividad biológica y con aplicación médica o agroindustrial (9).

✓ Orden Urticales

En la figura 1.2 se hace referencia a la representación del orden urticales con relación a las familias estudiadas en el ensayo.

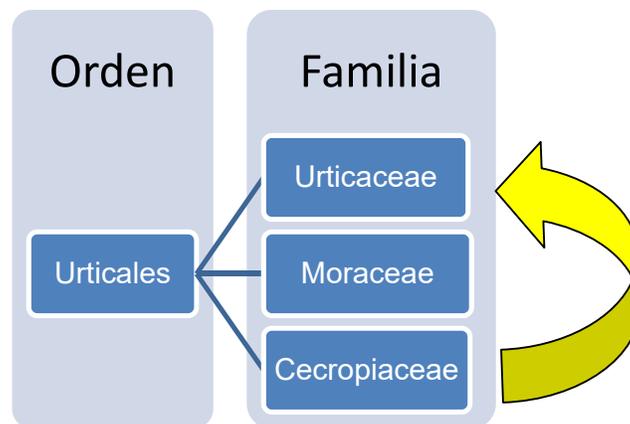


FIGURA 1.2 TAXONOMÍA DEL ORDEN URTICALES

BASADO EN BERG, 2004

- Moraceae

Comprende especies laticíferas, generalmente leñosas, distribuidas sobre todo por los países tropicales; están dominadas por árboles y arbustos con hojas alternas y flores unisexuales, sobre plantas dioicas. (38).

- Urticaceae y Cecropiaceae

Herbáceas o leñosas con hojas alternas u opuestas, estipuladas. Inflorescencia cimosa. Flores verdosas, regulares y unisexuales, rara vez bisexuales (5), aportan el 5 % de hojarasca al suelo; esto promueve a la comunidad desintegradora del suelo (microorganismos) como fuente de energía (6).

Cecropiaceae es colocada en el orden Urticales, junto con Moraceae y Urticaceae por Cronquist. Un estudio reciente sugiere que Cecropiaceae es un taxón polifilético y se ubicó en la familia Urticaceae. La mayoría de las

especies de Cecropia están habitadas por hormigas agresivas. (5).

✓ Familia Fabaceae

Árboles, arbustos, herbáceas y trepadoras, fácilmente reconocibles por su fruto legumbre y sus hojas compuestas y estipuladas (17). Esta familia presenta metabolitos secundarios que tienen un papel importante en la vida y supervivencia de especies en su entorno ecológico, por cuanto se desarrollan en la rizósfera de estas, nódulos radiculares en donde se establecen simbióticamente bacterias gram negativas, mótils que no esporulan. (9). Por lo tanto a estos tipos de bacterias y Microflora relacionada se la conoce como organismos endófitos. (23)

La presente familia constituye una de las principales familias más grandes de plantas, tal vez parte de su éxito se debe a su capacidad de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno. La diversidad de bacterias asociadas a plantas aún esta poca

explorada y seguramente tiene una función ecológica y agronómica muy importante (23).

✓ Familia Malvaceae – Bombacaceae

Familia de herbáceas, arbustos o árboles; recientes estudios genéticos realizados por Angiosperm Phylogeny Group (APG) han ampliado la familia a alrededor de 240-250 géneros y 1200 especies. La APG incluye en Malvaceae a *Bombacaceae*, *Sterculiaceae* y *Tiliaceae* por razones filogenéticas (38).

Las especies de este grupo presentan pelos estrellados o rígidos con hojas simples y presencia de estípulas; flores generalmente vistosas con cinco pétalos libres y fruto seco en cápsula, rara vez una baya. Tanto Malvaceae como Bombacaceae presentan informes de micorrizas y presencia de micro artrópodos que estimulan la captación del elemento carbono en el suelo (38).

✓ Familia Sapotaceae

Esta familia incluye 800 especies de árboles de hoja perenne y arbustos con laticíferos. Familia de importancia económica por la producción de madera, látex y frutos comestibles. (17) Contienen extractos con diferentes alcaloides y compuestos químicos para uso del ser humano; por lo tanto el flujo de metabolitos secundarios es importante para los beneficios que presenta esta familia. (31).

1.5.2 Técnicas y procedimientos usados

En un folleto divulgado por el ministerio de Agricultura en Costa Rica indica que se debe de cocinar una taza de arroz, que posteriormente se lo coloca dentro de una media “panty”; la cual se le hace una especie de nudo. Luego se lo ubica en un bosque (sin importar si es nativo o secundario), depositándolo en el suelo rodeado de materia orgánica (hojas en descomposición) por un periodo de 10 días. Una vez que el arroz haya sido colonizado por bacterias se deposita en un tanque; se le agrega una taza de melaza, una taza de leche cruda, dos cucharadas de levadura, agua

no clorada hasta $\frac{3}{4}$ partes del tanque; en vez de tapa se cubre el cuello del tanque con una tela y se sujeta, esto para facilitar la liberación de gases (11).

Con las trampas terminadas, se procede a enterrarlas en número de cinco, bajo la copa de los árboles seleccionados, se procura que la trampa quede bien cubierta por la misma tierra, y que cuente con la humedad necesaria; posteriormente se dejan las trampas por 2 semanas (33).

1.6 Microorganismos Efectivos en la Agricultura.

Los E.M. son utilizados en Agricultura porque mejoran las propiedades físico-químicas de los suelos, aumentan la Microflora bacteriana del mismo, promueven la descomposición de la materia orgánica utilizada en la elaboración de bioabonos, suprimen la acción de entes fitopatógenos (19), secretan fitohormonas que ayudan al crecimiento de los cultivos y actúan como correctores de la salinidad (32).

1.6.1 Fisiología del E.M. en cultivos

Los diferentes tipos de microorganismos en el E.M. toman sustancias generadas por otros organismos basando en ello su funcionamiento y desarrollo (13).

Las raíces de las plantas secretan sustancias que son utilizadas por los microorganismos eficientes para crecer, sintetizando aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos, hormonas; además cuando los microorganismos incrementan su población como una comunidad en el medio que se encuentra, se incrementa la actividad de los microorganismos naturales, enriqueciendo la Microflora; balanceando los ecosistemas microbiales; suprimiendo microorganismos patógenos. (11).

1.6.2 Técnicas de aplicación.

Para aplicaciones foliares o al suelo (utilizando un equipo de fumigación). Se usa 2 ml de EM más 2 ml de melaza en un litro de agua. Cuando se aplica con equipo de riego por goteo o microaspersión se incrementa la dilución 1 parte de EM + 1 parte de melaza en 10 litros de agua (30).

1.6.3 Efectos del E.M en la producción y fitosanidad de cultivos.

En semilleros:

Aumento de la velocidad y porcentaje de germinación de las semillas, por su efecto hormonal, similar al del ácido giberélico (35).

Aumento del vigor y crecimiento del tallo y raíces, desde la germinación hasta la emergencia de las plántulas, por su efecto como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Incremento de las probabilidades de supervivencia de las plántulas (11).

En las plantas:

Genera un mecanismo de supresión de insectos y enfermedades en las plantas, ya que pueden inducir la resistencia sistémica de los cultivos a enfermedades. Incrementa el crecimiento, calidad y productividad de los cultivos. Promueven la floración, fructificación y maduración por sus efectos hormonales en zonas meristemáticas e

incrementa la capacidad fotosintética por medio de un mayor desarrollo foliar (32).

En los suelos:

Los efectos de los microorganismos en el suelo, están enmarcados en el mejoramiento de las características físicas, químicas, biológicas y supresión de enfermedades (1); mejora la estructura y agregación de las partículas del suelo, reduce su compactación, incrementa los espacios porosos y mejora la infiltración del agua. (32)

Efectos en las condiciones químicas del suelo: Mejora la disponibilidad de nutrientes en el suelo, solubilizándolos, separando las moléculas que los mantienen fijados, dejando los elementos disgregados en forma simple para facilitar su absorción por el sistema radical (2).

Efectos en la microbiología del suelo: Suprime o controla las poblaciones de microorganismos patógenos que se desarrollan en el suelo, por competencia. Incrementa la biodiversidad microbiana, generando las condiciones

necesarias para que los microorganismos benéficos nativos prosperen (6).

Esta solución microbiana, que fue desarrollado originalmente por la naturaleza o los sistemas de agricultura ecológica, se amplió aún más para superar los problemas ambientales, facilitando así la reutilización de la mayoría de los residuos procedentes o bases de origen vegetal. El primer concepto de la utilización de EM en la gestión ambiental estaba en el proceso de compostaje; con materia o residuos de cosechas y desechos animales fueron “compostados” efectivamente para producir biofertilizantes. Investigación en diferentes países destaca el potencial de hacer compost con los desechos vegetales o animales, este provee un incremento en los rendimientos de los cultivos cuando es suministrado con este material, más beneficios de productividad cuando se lo hace en un cultivo con técnicas tradicionales. (33)

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Características del ensayo

2.1.1 Ubicación, localizaciones geográficas y ecológicas.

El presente trabajo se desarrollo a nivel de las provincias de Guayas y Cotopaxi en dos zonas de vida ecológicamente diferentes, bosque húmedo tropical y bosque seco tropical.

Estas zonas de vida fueron caracterizadas de acuerdo al sistema de clasificación propuesto por Rodrigo Sierra (1999) como “Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental”, que las clasifica como Bosque Deciduo de Tierras Bajas y Bosque Húmedo Pie-montano.

Para caracterizar al Bosque Deciduo de Tierras Bajas se escogió al Bosque Protector Prosperina que forma parte del campus Gustavo Galindo de la ESPOL; por otra parte la zona de vida correspondiente al Bosque Húmedo Pie Montano se ubicó en el Bosque Sacha Wiwua perteneciente al Sistema Educativo Intercultural ubicado a 5 km. De la parroquia Guasaganda al norte de la Maná.

Las características climáticas, altitudinales y latitudinales de las zonas de estudio se indican en la Tabla 1.

TABLA 1
CARACTERÍSTICAS AMBIENTALES DE LAS ZONAS
ECOLÓGICAS EN ESTUDIO

B.	LATITUD	T °C	PRECIPITACIÓN	ALTITUD
		ANUAL	mm ANUAL	
BPP	2 ^a 9' 7.54" S 79 ^o 57' 40.45" O	24 °C-30 °C	850mm	65msnm
BSW	0 ^a 47' 46" S 79 ^a 08' 45" O	18 °C-24 °C	1962,2mm	580msnm

2.1.2 Clima, suelo y vegetación.

- Bosque Protector Prosperina

La vegetación se caracteriza por perder las hojas durante una parte del año. Los árboles más conspicuos son de la familia Bombacaceae, tienen troncos abombados y copa ancha.

El bosque deciduo con un dosel relativamente cerrado y la casi ausencia de gramíneas predomina en la misma región en suelos rocosos, poco profundos en los cerros.

La información correspondiente a la flora característica de esta zona de vida se indica en la Tabla 2.

En apéndice A se puede observar la ubicación de las familias en estudio, para ambos ecosistemas.

TABLA 2
FLORA CARACTERÍSTICA DE LAS ZONAS DE
ESTUDIO BASADO EN BODERO (1995) y SIERRA
(1999)

BPP	<i>Tabebuia chrysantha</i>
	<i>Ceiba trichistandra</i>
	<i>Vitex gigantea</i>
	<i>Centrolobium ochroxylum</i>
	<i>Cecropia litoralis</i>
	<i>Capparis petiolaris</i>
	<i>Simira ecuadoriensis</i>
	<i>Cochlospermum vitifolium</i>
	<i>Triplaris cumingiana</i>
	<i>Pseudosamanea guachapele</i>
	<i>Pradosia montana</i>
	<i>Piscidia carthaginensis</i>

- Bosque Sacha Wiwua

En Guasaganda, hay variedad de textura dominando el suelo negro arenoso seguido por el amarillo arcilloso. La capa arable va de los 20 a 60 cm, en la mayor parte de la

superficie. La luz tiene una duración de 12 horas con nubosidad en el invierno al atardecer.

La información correspondiente a la flora característica de esta zona de vida se indica en la Tabla 3

TABLA 3
FLORA CARACTERÍSTICA DE LAS ZONAS DE ESTUDIO BASADO EN AMORES (s/f) y SIERRA (1999)

BSW	<i>Carapa nicaraguensis</i>
	<i>Rhodostemonodaphne kunthiana</i>
	<i>Guadua angustifolia</i>
	<i>Dussia lehmannii</i>
	<i>Protium ecuadoriensis</i>
	<i>Ficus citrifolia</i>
	<i>Tovomita weddelliana</i>
	<i>Cecropia gabrielis</i>
	<i>Grias peruviana</i>
	<i>Henrirtella tuberculosa</i>
	<i>Faramea monsalvaeae</i>
	<i>Inga carinata</i>

2.2 Materiales, herramientas y reactivos usados.

Los materiales, herramientas y reactivos utilizados en el presente ensayo, se indican en la tabla 4.

TABLA 4
MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS EN LA IMPLEMENTACIÓN
DEL PROYECTO

<u>A USARSE EN EL BOSQUE</u>	<u>RECOLECCIÓN DE ESPECÍMENES DE PLANTAS</u>	<u>A USARASE EN LABORATORIO</u>
Machete.	Podadoras manuales	Tubo de ensayos.
Melaza	Papel periódico	Microscópio
Agua	Papel de aluminio	Placas porta objetos.
Estacas	Alcohol etílico de 90 grados	Medio de cultivo tipo PDA y Agar
Tablero de apuntes	Solución Preservante: (46% alcohol etílico+ 3% formol).	Balanzas de precisión
Tarrinas	Atomizador	Autoclaves y estufa
Arroz precocido	Prensa	Alcohol de laboratorio
Nylon		Base de plumafón
Ligas elásticas		Parámetros de identificación morfológica de microorganismos
Cámara fotográfica		
GPS		Equipos y reactivos a usarse en el laboratorio de Química para identificación de microorganismos
Aerosol de color rojo		

2.3 Sistemas de clasificación de Angiospermas empleado.

En esta investigación se utilizó el sistema de APGII (Angiosperm Phylogeny Group Versión 2), el cual se caracteriza por implementar el sistema de clados, término equivalente a linaje, y que taxonómicamente incluye al taxón clase, propuesta por otros sistemas de clasificación; los clados representan tres grupos: Magnoliide, Monocots y Eudicots, equivalentes a las clases Mono y Dicotiledónea (Engler y Prantl, 1898) Liliopsida y Magnoliopsida (Cronquist, Zimmermann y Takhtajan) (Ver Tabla 5).

TABLA 5
MODIFICACIÓN DE APG EN FAMILIAS BOTÁNICAS
DESCRITAS EN EL ENSAYO RESPECTO DE OTROS
SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN.

APG	OTROS SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN
FAMILIA	FAMILIAS
Urticaceae	En esta Familia se incluye a Cecropiaceae (Cronquist et al, 1988) la cual a su vez era incluida en Moraceae (Engler y Prantl, 1898).
Fabaceae	Incluye las sub familias Caesalpiniaceae, Mimosaceae, Papilionaceae
Malvaceae	Incluye a la familia Bombacaceae

En esta propuesta se hace una revisión de órdenes y Familias, cuyos cambios en relación, a las familias de especies analizadas muestreadas en la presente investigación se indican en la Tabla 5.

2.4 Formas de hábito de Angiospermas consideradas en el muestreo y evaluación.

Para considerar el hábito de angiospermas solo se tomó en cuenta las categorías arbustivas, respecto del sistema de clasificación propuesto por Whittaker (1975)

2.4.1 Arbustos.

Se llama arbusto a una planta leñosa de cierto porte cuyo eje (fuste), se ramifica desde la misma base.

2.4.2 Árboles.

Un árbol es una planta, de tronco leñoso, que se ramifica por arriba de los seis metros de altura.

2.5 Manejo de Ensayo.

2.5.1 Fase de campo.

Esta fase se llevó a cabo en dos etapas: A) Selección de familias y especies de Angiospermas arbustivas a considerar en el ensayo, y B) colocación de trampas en las especies seleccionadas.

2.5.1.1 Selección de familias y especies.

Los criterios que se siguieron para seleccionar familias de Angiospermas fueron los siguientes:

- Las familias a considerar sean comunes para ambas zonas de vida.
- Se utilizó el sistema de clados de la APG, para incluir órdenes y familias con un linaje común y propiedades microbiales posiblemente afines.

- Que la actividad microbiana relacionada al aumento de la Microflora benéfica de suelos, incremente su fertilidad.

La identificación de especímenes correspondientes a los árboles que se utilizaron para la presente investigación se realizó a través del Ing. Felipe Mendoza, Profesor de Botánica, FIMCP (ESPOL) y Director de esta investigación, quien utilizó clados taxonómicos y literatura especializada. Las referencias técnicas usadas para este propósito se indican en la tabla 6 a su vez en el apéndice B se encuentra la ficha completa de la identificación y muestras herborizadas.

TABLA 6
REFERENCIAS TÉCNICAS USADAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE
ESPECIES DE ÁRBOLES.

TÍTULO	AUTOR	EDICIÓN
A Field Guide to the families and genera of woody plants of Northwest of South American (Colombia, Ecuador, Perú) with supplementary notes on herbaceous taxa	Alwyn Gentry (1993)	Missouri Botanical Garden
Clave para la identificación del género Inga en el Ecuador: morfología, distribución y usos	T. D. Pennington (1997)	Royal Botanical Garden
Determinación de la cobertura Vegetal de un bosque húmedo pre-montano en la parroquia Guasaganda, Provincia de Cotopaxi	L. Amores S/F	ESPOL

La lista de familias, grupos taxonómicos y especies investigadas se muestra en la tabla 7.

TABLA 7

FAMILIAS Y ESPECIES DE ANGIOSPERMAS SELECCIONADAS PARA COLOCACIÓN DE TRAMPAS PARA CAPTURA DE MICROBIOS ÚTILES EN LA MICROFLORA DE SUELOS.

		ORDEN / CLADO	FAMILIA	ESPECIE
BSW	1		Fabaceae	<i>Inga carinata</i>
				<i>Dussia lehmannii</i>
	2	Urticales	Moraceae	<i>Ficus cf. Citrifolia</i>
			Urticaceae	<i>Cecropia cf gabrielis</i>
	3	Magnoliide	Lauraceae	<i>Rhodostemonodaphne kunthiana</i>
4		Malvaceae	<i>Matisia cf. Coloradorum</i>	
BPP	1		Fabaceae	<i>Centrolobium ochroxilum</i>
				<i>Caesalpinia glabrata</i>
	2	Urticales	Urticaceae	<i>Cecropia litoralis</i>
	3	Magnoliide	Annonaceae	<i>Annona muricata L</i>
			Annonaceae	<i>Annona squamosa L</i>
4		Sapotaceae	<i>Pradosia montana</i>	

2.5.1.2 Colocación de trampas.

Una vez seleccionadas las especies se colocan trampas para proceder a la captura de microbios eficientes desde la rizósfera de éstas especies. Previamente se cocinó 1 Kg de arroz (sin sal), el

cual se mezcló con 1 lt de melaza; luego se distribuyó el arroz en varias tarrinas plásticas, que fueron cubiertas con un pedazo de nylon bien asegurado.

Con las trampas terminadas, se procedió a enterrarlas en número de tres, bajo la copa de los árboles seleccionados. Se procuró que la trampa quede bien cubierta por la misma tierra, y que cuente con la humedad necesaria. Las trampas se dejaron así por 4 semanas. (Figura 2.1)



**FIGURA 2.1 TRAMPA UTILIZADA PARA LA
OBTENCIÓN DE EM. FUENTE: autores**

2.5.1.3 Recolección de trampas en campo.

Después de cuatro semanas se desenterró las tarrinas, observándose que el arroz estaba cubierto de diversas colonias de microorganismos de diferentes colores, siendo así se la tapo, y se las condujo al laboratorio para su respectivo análisis. (Figura 2.2)



FIGURA 2.2 TRAMPA CON MICROORGANISMOS RECOLECTADA EN CAMPO. FUENTE: autores

2.5.2 Fase de Laboratorio.

Es importante indicar que en este ensayo se realizó el aislamiento de bacterias principalmente; a su vez ciertas

características generales de hongos no saprofiticos encontrados en el ensayo, se indican en los apéndices G, H, I.

- Asepsia y esterilización

Antes de preparar cualquier medio o solución en laboratorio, se procedió a realizar una esterilización de todos los materiales y reactivos en el autoclave por 30 minutos, como se muestra en la figura 2.3.



FIGURA 2.3 MATERIALES Y REACTIVOS EN AUTOCLAVE PARA ESTERILIZACIÓN.

FUENTE: autores

- Preenriquecimiento.

Esto se realizó en medios líquidos (agua peptona, caldo nutritivo, caldo lactosado, etc.) que son medios no inhibidores del resto de la flora acompañante.

- Preparación de medios.

Se prepararon 2 soluciones, la primera realizada con 12,65 gr de AGAR NUTRITIVO diluidos en 500 ml de agua destilada, y para el segundo medio se usó 23,5 gr de SABOURAUD en 500 ml de agua destilada.
(Fig. 2.3)

Ambas fueron homogenizadas en un plato calentador, durante 25 minutos aproximadamente a una temperatura de 40 °C.



**FIGURA 2.4 MEDIOS DE CRECIMIENTO UTILIZADOS
EN LOS CULTIVOS BACTERIANOS.**

FUENTE: autores

- Preparación de diluciones.

Se preparan varios tubos de ensayo con 9 ml de agua peptona rotulados con 1^{-1} , 1^{-2} , 1^{-3} , 1^{-4} , 1^{-5} , (Fig. 2.4) dependiendo del número de diluciones a preparar.



FIGURA 2.5 PREPARACIÓN DE DILUCIONES.

FUENTE: autores

2.5.2.1 Siembra.

- Siembra de diluciones.

De la muestra a estudiar, previamente macerada o sumergida en agua destilada, se tomó 1 gr de la muestra y se la vertió en el tubo rotulado con 1^{-1} , se homogenizó y de éste tubo 1 ml se vertió en el tubo rotulado con 1^{-2} y así sucesivamente hasta terminar con las diluciones de cada muestra.



**FIGURA 2.6 SIEMBRA DE
MICROORGANISMOS.**

FUENTE: autores

Luego de cada tubo se tomó un 1ml y se sembró en una caja petri diferente (figura 2.5), luego se agregó una capa líquida de un medio de cultivo apropiado, siendo los medios utilizados AGAR NUTRITIVO (AN) y SABOURAUD (SAB), se debe homogenizar antes de que se solidifique el medio de cultivo respectivo; Finalmente se procedió a rotular utilizando las abreviaturas de cada medio de acuerdo a la dilución respectiva como se muestra en la figura 2.4 (esto es AN o SAB

M1⁻¹, M1⁻², M1⁻³, M1⁻⁴, M1⁻⁵) y la fecha respectiva (día y año).

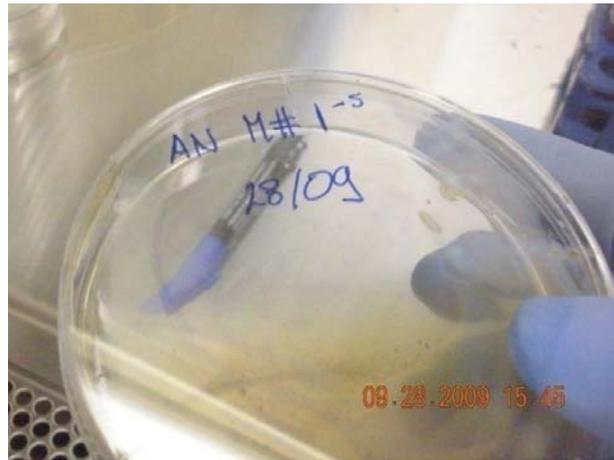
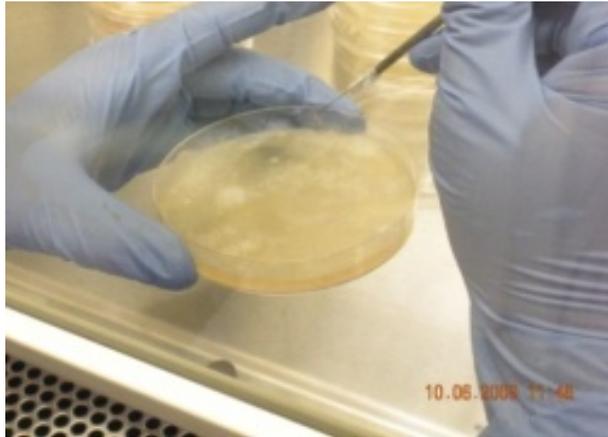


FIGURA 2.7 ROTULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN CAJAS PETRI.

FUENTE: autores

2.5.2.2 Purificación.

Se procedió a extraer las colonias de microorganismos encontradas en los medios de cultivos, (figura 2.6) pero en forma separada; colocando cada microorganismo encontrado en una caja petri.



**FIGURA 2.8 PURIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS EN MEDIOS DE CULTIVO**

FUENTE: autores

2.5.2.3 Técnica de siembra de dilución por estrías.

Se utilizó un asa bacteriológica, la cual se puso en contacto con la muestra que contenga bacterias; con este se van haciendo estrías sobre una placa de Agar nutritivo de tal manera que el material se vaya “diluyendo” sobre la superficie, hasta que las bacterias luego de cierto tiempo se vayan multiplicando muchas veces (Figura 2.7); luego de esto se forma sobre la superficie del medio un pequeño promontorio constituido por células bacterianas llamado Colonia, la cual aislada está

constituida de un solo tipo de bacterias. En el apéndice C se muestra las técnicas de aislamiento usadas en esta investigación.

Las características usadas para describir colonias de bacterias, se basaron en la metodología de Murray, P (2006) y Olivas, E (2001).

Las principales variables son:

- Forma: Puntiforme, circular, irregular, alargada, fusiforme, filamentosa, rizoide.
- Superficie: Lisa, rugosa, en anillos concéntricos.
- Elevación: plano, elevada, convexa, umbonada, umbilicada.
- Margen: entero, ondulado, lobulado, estrellado, filamentos.

- Color: Según sea observado por la luz reflejada o por la luz transmitida, puede ser de color blanco, amarillo, rojo ladrillo, anaranjado.

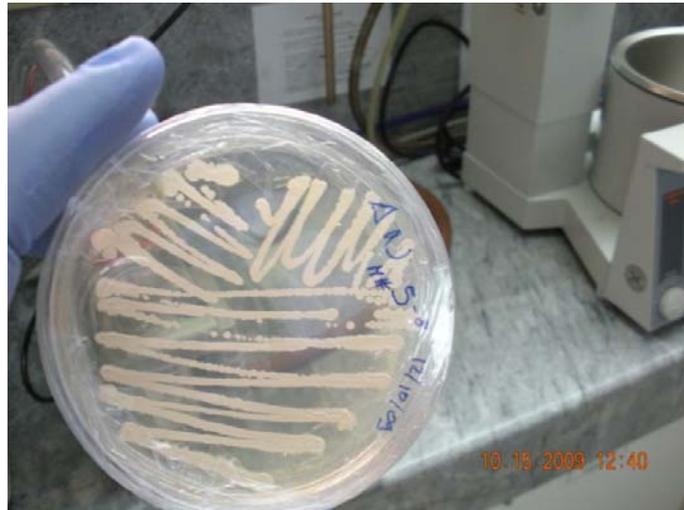


FIGURA 2.9 SIEMBRA DE DILUCIÓN POR ESTRÍAS. FUENTE: autores

2.5.2.4 Tinción de Gram.

De acuerdo a esta técnica el protocolo que se siguió para llevar a cabo la Tinción de Gram fue el siguiente:

Se hizo un frotis en la placa porta objetos de cada muestra de colonias de bacterias obtenidas.

Se cubrió con cristal violeta durante 1 minuto (Figura 2.8). En este paso, todas las células quedan teñidas por el colorante.

Se decantó el anterior colorante volcando el portaobjeto y se adicionó solución lugol durante 1 minuto. Para reforzar la interacción entre el colorante y la pared celular.



FIGURA 2.10 TINCIÓN DE GRAM. FUENTE: autores

Se decantó la solución de lugol, y posteriormente se lavó con alcohol por goteo continuado durante 20 segundos, luego se añadió agua para evitar el arrastre completo de todo el colorante. En esta

fase se produjo la decoloración diferencial de las bacterias Gram negativas. Posteriormente se trató con safranina durante 1 minuto como colorante de contraste; se lavó con agua abundante, se secó al aire (Figura 2.9) y se observó con el lente de inmersión (100x). En esta fase las Gram negativas adquirirán color rojo de la safranina mientras que las Gram positivas continuarán con el color azul propio del primer colorante. En el apéndice D se muestran las colonias de bacterias identificadas con la tinción Gram. Esta prueba se basa en la Teoría de (Parks, L 1997)

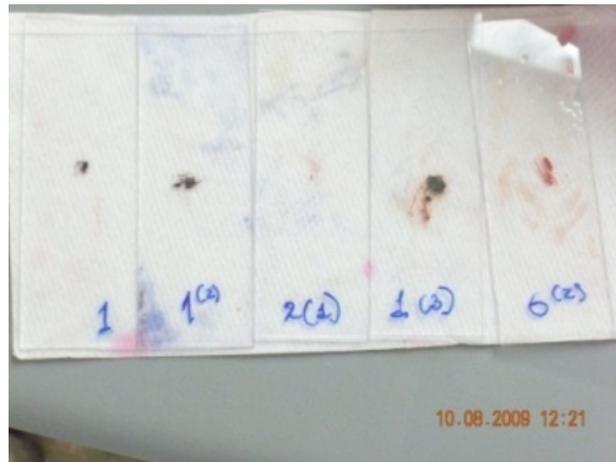


FIGURA 2.11 RESULTADO DE TINCIÓNES.

FUENTE: autores

2.5.2.5 Pruebas Bioquímicas.

Para la identificación de bacterias se emplearon pruebas bioquímicas que reflejaron las actividades metabólicas en relación con los distintos tipos de nutrientes.

Las pruebas utilizadas fueron las siguientes:

- Pruebas de metabolismo de carbohidratos (Prueba de óxido-fermentación O/F)
- Pruebas enzimáticas con la relación del oxígeno (Catalasa)

Estas pruebas se basan en la metodología Merck, (2008) Y Madigan, (2004).

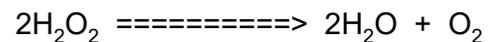
✓ Prueba de la Catalasa

Se trata de un ensayo muy simple que intenta determinar si la bacteria tiene capacidad para degradar el peróxido de

hidrógeno, uno de los agentes oxidantes producidos como consecuencia de determinadas reacciones metabólicas oxidativas propias del metabolismo aerobio.

La enzima encargada de degradar este producto es denominada catalasa y aparece en casi todos los microorganismos aerobios obligados o facultativos.

Se añadió una gota de agua oxigenada sobre una colonia del cultivo y se observó si de esta se empiezan a desprender burbujas de oxígeno como consecuencia de la actividad enzimática de la catalasa:



Con el asa de siembra se recogió el centro de una colonia pura de 18-24 horas.

Se agregó con un gotero o pipeta Pasteur una gota de H_2O_2 al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.

Finalmente se observó la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

En el apéndice E se puede observar la reacción de la prueba Catalasa sobre colonias de bacterias.

✓ Prueba óxido fermentativa

Los reactivos utilizados en esta prueba se indican a continuación en la Tabla 8:

TABLA 8
REACTIVOS Y CANTIDADES
NECESARIAS EN PRUEBA ÓXIDO
FERMENTATIVA. BASADO EN MERCK
(2008).

CANTIDAD	REACTIVO
0.6 gr	Peptona
1.5 gr	Cloruro de sodio
0.09 gr	K ₂ HPO ₄
0.9gr	Agar
0.45 ml	Solución Azul Bromotimol al 1%
1.5 gr	Glucosa
150 ml	Agua Esterilizada

El medio se esterilizó en la forma más conveniente, excepto la glucosa, la cual se lo hizo por separado en autoclave por 5 minutos. Luego se añadió 5 ml del medio y se dejó solidificar en tubos de ensayo en forma vertical.

La siembra se hizo con un asa de platino (Fig. 2.10); y para cada grupo

microorganismos se emplearon dos tubos de hemólisis que contienen el medio de Hugh – Leifson. Una vez sembrados, uno de los tubos es sellado con parafina estéril, de esta manera quedó aislado del aire. La incubación se realizó con 27°C durante 24 – 48 horas.

Si el tubo abierto da positivo (vira al amarillo por consumo de la glucosa y acidificación del medio) y el tubo sellado da negativo (sin viraje, cercano al verde, puede ser oscuro) entonces se trata de un metabolismo oxidativo típico de aerobios estrictos como *Pseudomonas*.

Si ambos tubos dan positivos, corresponde a un metabolismo fermentativo típico de un organismo aerobio facultativo (no sería *Pseudomonas*). En el apéndice F se puede observar las diversas reacciones de esta prueba en el laboratorio.

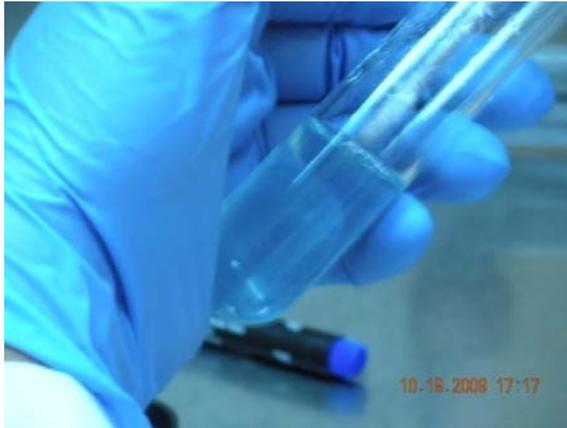


FIGURA 2.12 PRUEBA ÓXIDO FERMENTATIVA

FUENTE: Autores

CAPÍTULO 3

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los análisis de laboratorio en las colonias de microorganismos obtenidas, a partir de los aislamientos de las dos comunidades vegetales estudiadas (BhPm y BdTb), se los agrupó de acuerdo a los grupos taxonómicos evidenciados a partir del muestreo y selección de especies en ambos ecosistemas.

Los grupos taxonómicos en estudio se indican en la tabla 9

TABLA 9

GRUPOS TAXONÓMICOS EN ESTUDIO

COMUNIDAD VEGETAL	GRUPO TAXONÓMICO	FAMILIA
BhPm	Fabaceae	Fabaceae
	Urticales	Moraceae
		Urticaceae
	Magnoliide	Lauraceae
	Heterogéneo	Malvaceae
BdTb	Fabaceae	Fabaceae
	Urticales	Urticaceae
	Magnoliide	Annonaceae
	Heterogéneo	Sapotaceae

3.1 Caracterizaciones morfológicas de las colonias obtenidas.

En las tabla 1 y 2 se describen, las características principales de las bacterias encontradas en ambos bosques.

3.1.1 Color.

Tanto en los dos bosques, existió un patrón de colores en las bacterias analizadas en el laboratorio.

En la figura 3.1 se presentan los resultados del estudio realizado en el Bosque Húmedo Pie Montano, donde el color Blanco posee un porcentaje de 41,17 %, seguido por el color amarillo con un porcentaje de 35,29% y el anaranjado con 23,54 %.

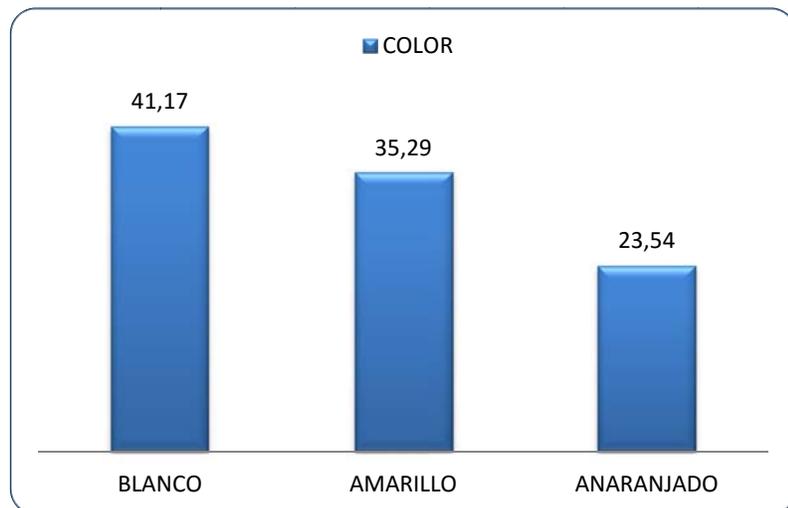


FIGURA 3.1 PORCENTAJE DE COLORES DE BACTERIAS ENCONTRADAS EN BhPm

En la figura 3.2 se presentan los resultados del estudio realizado en el Bosque Deciduo de Tierras Bajas, en el cual se obtuvo que el color amarillo tiene 53,33 %; seguido por el color blanco con un 30 %, y un 16,67 % del color anaranjado.

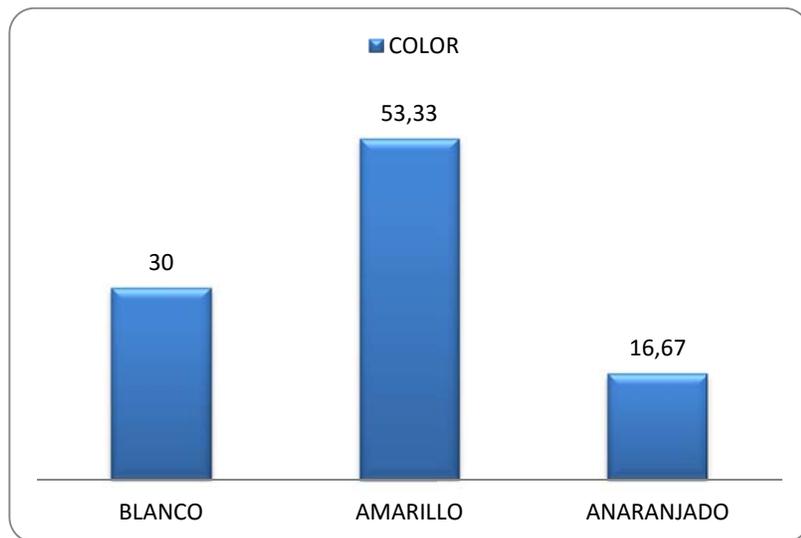


FIGURA 3.2 PORCENTAJE DE COLORES DE BACTERIAS ENCONTRADAS EN BdTb

3.1.2 Forma.

Al observar al microscopio se visualizó un predominio de cocos, ya sea en forma de racimos de uvas (estafilococos); en forma de cadenas (streptococos); en pares (diplococos) y aisladas (monococos).

En la figura 3.3 se presentan los resultados del estudio realizado en el Bosque Húmedo Pie Montano con porcentajes de 29,41 % de forma Alargada, seguido con 23,52 % de Puntiformes, luego con porcentajes iguales para Circular e Irregular con 17,64 %, finalizando con 11,7 % de forma Rizoide.

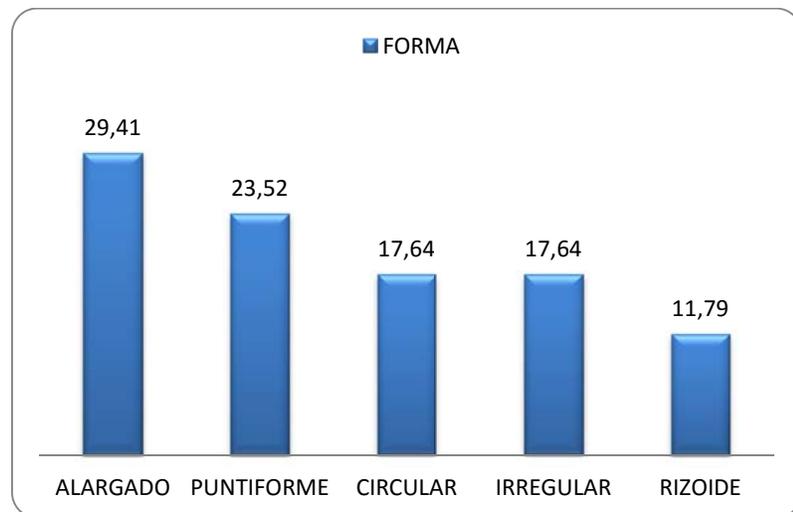


FIGURA 3.3 PORCENTAJE DE FORMA DE BACTERIAS EN BhPm

En la figura 3.4 se presentan los resultados del estudio realizado en el Bosque Deciduo de Tierras Bajas, donde se estableció porcentajes de 40% de la forma Alargado; seguidos con 33.33% de forma Puntiforme; finalizando con

13,33% para formas Circular y un 0% para las formas Irregular y Rizoides.

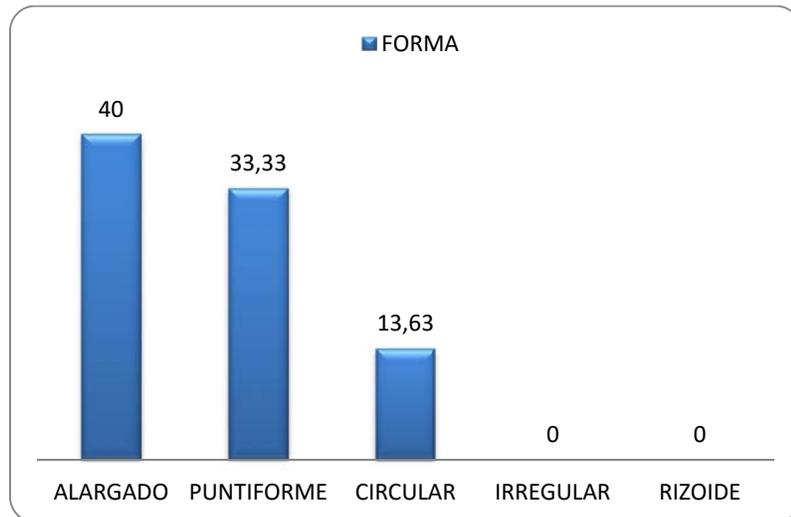
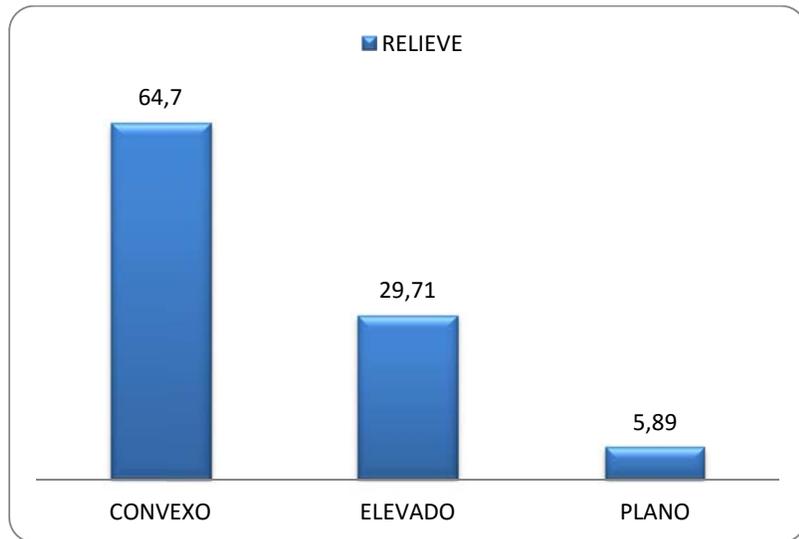


FIGURA 3.4 PORCENTAJE DE FORMA DE BACTERIAS EN BdTb

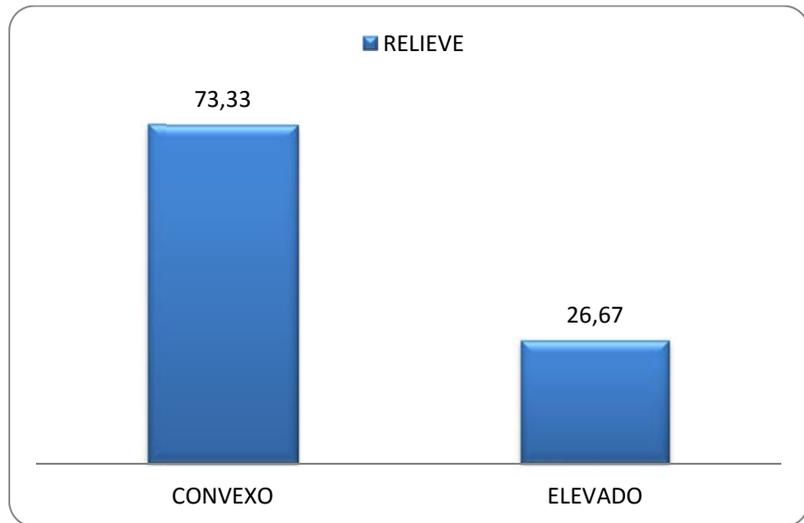
3.1.3 Relieve.

En la figura 3.5 se presentan los resultados del estudio realizado en el Bosque Húmedo Pie-Montano donde las bacterias encontradas presentaron una dominancia de relieve Convexo con 64,70 %; seguidos por 29,71 % de relieve Elevado y 5,89% de relieve Plano (Fig. 3.5);



**FIGURA 3.5 PORCENTAJE DE RELIEVE DE BACTERIAS
EN BhPm**

En la figura 3.6 se presentan los resultados del estudio realizado en el Bosque Deciduo de Tierras Bajas donde se encontró los siguientes porcentajes del relieve de colonias de bacterias, las cuales se distribuyeron de la siguiente manera: El 73,33 % de relieve Convexo y 26,67 % de relieve Elevado.



**FIGURA 3.6 PORCENTAJE DE RELIEVE DE BACTERIAS
EN BdTb**

3.1.4 Borde.

El borde Entero se encontró a nivel de las colonias de bacterias aisladas, en ambos bosques con un 100 % en el Bosque Deciduo de Tierras Bajas.

En la figura 3.7 se presentan los resultados del estudio realizado en el Bosque Húmedo Pie Montano donde se encuentra una gran variedad de bordes como 82,35 % del borde entero; seguido por un 5,8% de los bordes:

Filamentoso, Ondulado y Estrellado, respectivamente para este ecosistema.

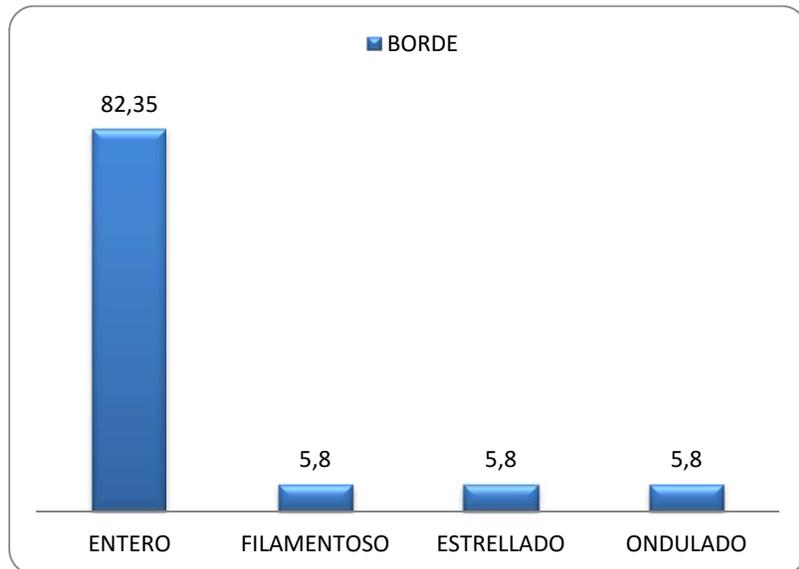


FIGURA 3.7 PORCENTAJE DE BORDE DE BACTERIAS EN BhPm

En la tabla 10 y en la tabla 11 se presenta en forma comparativa la caracterización morfológica de colonias de bacterias aisladas, desde un Bosque Húmedo Pie Montano (BSW) y un Bosque Deciduo de Tierras Bajas (BPP).

TABLA 10

**DESCRIPCIÓN DE BACTERIAS ENCONTRADAS EN LABORATORIO,
CORRESPONDIENTE A BOSQUE HÚMEDO PIE-MONTANO.**

Bacteria	Color	Forma	Elevación	Margen
FABACEAE				
A	Blanco	Puntiforme	Convexo	Entero
B	Amarillo	Alargado	Convexo	Entero
G	Blanco	Rizoide	Elevada	Filamentoso
H	Anaranjado	Circular	Convexo	Entero
A	Blanco	Puntiforme	Convexo	Entero
B	Amarillo	Alargado	Convexo	Entero
URTICACEAE				
A	Blanco	Puntiforme	Convexo	Entero
B	Amarillo	Alargado	Convexo	Entero
C	Anaranjado	Circular	Elevado	Entero
D	Blanco	Irregular	Elevado	Estrellado
E	Blanco	Irregular	Elevado	Entero
F	Amarillo	Irregular	Plano	Ondulado
MAGNOLIIDE (LAURACEAE)				
A	Blanco	Puntiforme	Convexo	Entero
B	Amarillo	Alargado	Convexo	Entero
MALVACEAE				
A	Blanco	Puntiforme	Convexo	Entero
B	Amarillo	Alargado	Convexo	Entero
H	Anaranjado	Circular	Convexo	Entero

TABLA 11

**DESCRIPCIÓN DE BACTERIAS ENCONTRADAS EN LABORATORIO,
CORRESPONDIENTES A BOSQUE DECIDUO DE TIERRAS BAJAS.**

Bacteria	Color	Forma	Elevación	Margen
FABACEAE				
A	Blanco	Puntiforme	Convexo	Entero
B	Amarillo	Alargado	Convexo	Entero
C	Amarillo	Circular	Elevado	Entero
A	Blanco	Puntiforme	Convexo	Entero
B	Amarillo	Alargado	Convexo	Entero
SAPOTACEAE				
D	Anaranjado	Irregular	Elevado	Entero
B	Amarillo	Alargado	Convexo	Entero
URTICACEAE				
A	Blanco	Puntiforme	Convexo	Entero
B	Amarillo	Alargado	Convexo	Entero
C	Amarillo	Circular	Elevado	Entero
MAGNOLIIDE (ANNONACEAE)				
A	Blanco	Puntiforme	Convexo	Entero
B	Amarillo	Alargado	Convexo	Entero
A	Blanco	Puntiforme	Convexo	Entero
B	Amarillo	Alargado	Convexo	Entero
D	Anaranjado	Irregular	Elevado	Entero

3.2 Tinción de Gram.

- Aislamientos en el bosque húmedo pie-montano.

A nivel de la familia Fabaceae se extrajeron 6 colonias de bacterias las cuales reportaron que eran 100% Gram positivas entre ellas se aislaron tres colonias de estreptococos y tres colonias de mono cocos.

En el orden Urticales (Urticaceae + Moraceae) presentó 6 colonias de bacterias, de las cuales el 62,5% fueron Gram positivas y el 37,5% Gram negativas, también se aislaron por medio del microscopio 2 colonias de estreptococos, 1 de mono cocos y dos de bacilos.

A nivel del clado Magnoliide (Lauraceae) se obtuvieron dos colonias de bacterias las cuales fueron 100% Gram positivas, de las cuales se diferenció una colonia de streptococos y una de mono cocos.

La familia Malvaceae presentó tres colonias de bacterias, las cuales reportaron ser 100% Gram positivas, donde se pudo observar dos colonias de estreptococos y una de monococos.

Esto podemos observar en la Figura 3.8.

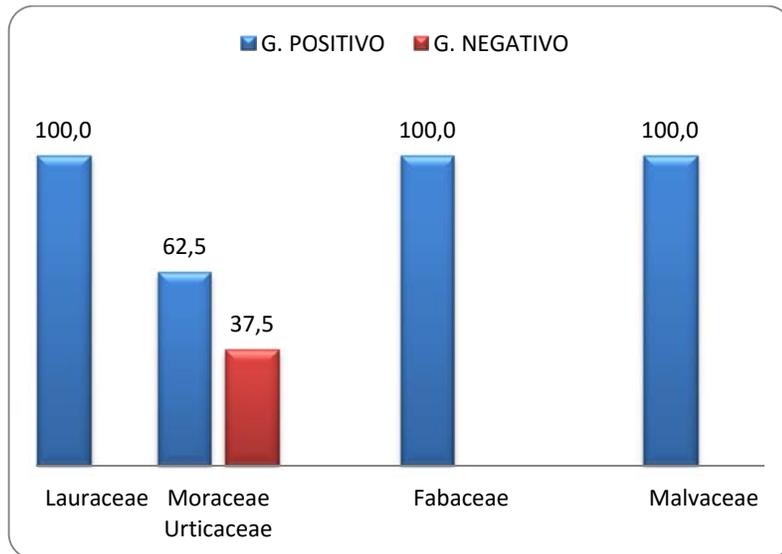


FIGURA 3.8 TINCIÓN DE GRAM BHPm

- Aislamientos en el bosque decíduo de tierras bajas.

A nivel de este bosque en la familia Fabaceae se extrajeron 5 colonias bacterianas de las cuales se encontraron que el 67% de estas fueron Gram positivas y el 33% Gram negativas, aislándose 2 colonias de estreptococos y 3 colonias de mono cocos.

En el Grupo Urticales (Urticaceae), se reportó tres colonias bacterianas, en donde el 100% de éstas fueron Gram positivas; observándose 2 colonias de mono cocos y una estreptococos.

La familia Sapotaceae reportó dos colonias bacterianas, las cuales fueron 100% Gram positivo; se identificó una colonia de bacilos y una de colonia de monococos.

El clado Magnoliide (Annonaceae) produjo cinco colonias de bacterias, de las cuales se reportó que el 83,5% era Gram positivos y el 16,5% Gram Negativos, y obtuyéndose aislamientos de 4 colonias de monococos y una de bacilos, esto se puede apreciar en la figura 3.9.

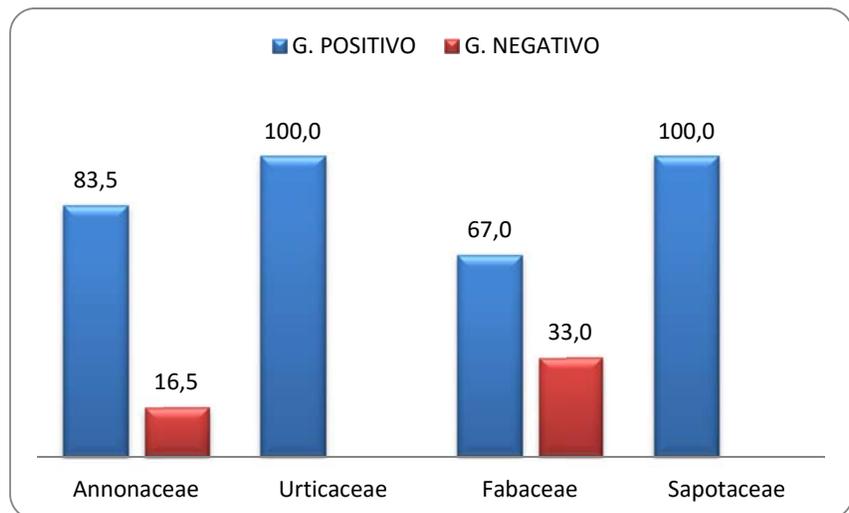


FIGURA 3.9 TINCIÓN DE GRAM BdTB

3.3 Análisis Pruebas Bioquímicas obtenidas.

3.3.1 Prueba Óxido/Fermentación.

En esta investigación, en cuanto a Pruebas de óxido fermentación se obtuvieron aislamientos de bacterias con las siguientes características:

- A. Forma Puntiforme, con relieve Convexo y borde Entero en la prueba el aislamiento demostró que tiene Metabolismo Fermentativo (anaerobio).

- B. Forma Alargada con relieve Convexo y borde Entero en la prueba el aislamiento reflejó que tiene Metabolismo Oxidativo (aeróbico).

- C. Forma Circular, con relieve Elevado y borde Entero en la prueba el aislamiento demostró que tiene una respiración Facultativa.

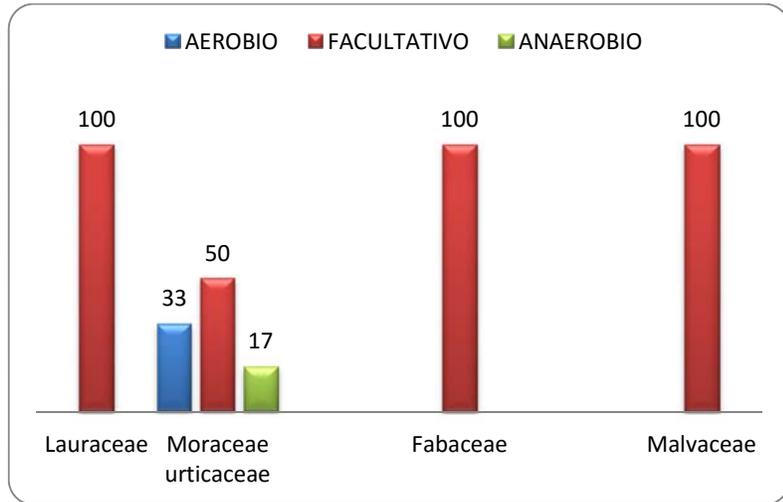
- D. Forma Irregular con relieve Elevado y borde Estrellado en la prueba comprobó que el aislamiento tiene Metabolismo Oxidativo (aeróbico).

- E. Forma Irregular con relieve Elevado y borde Entero en la prueba reveló que el aislamiento tiene Metabolismo Oxidativo (aeróbico).

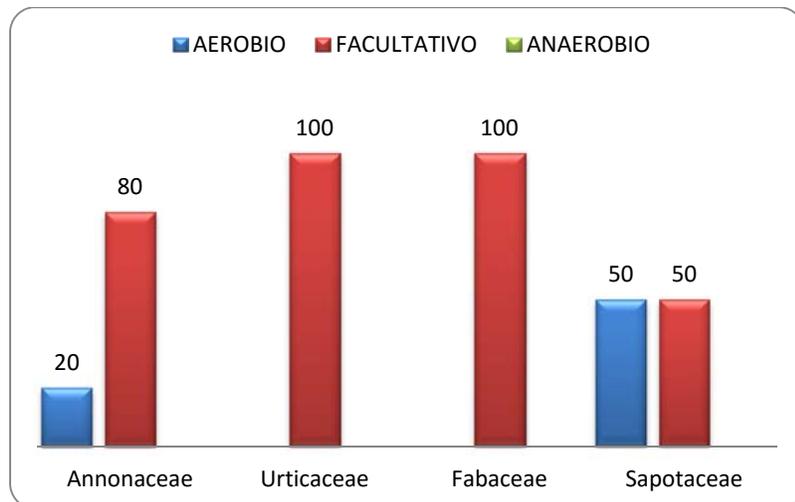
- F. Forma Irregular, con relieve Plano y borde Ondulado en la prueba demostró que el aislamiento tiene Metabolismo Fermentativo (anaerobio).

- G. Forma Rizoide, con relieve Elevado y borde Filamentoso en la prueba demostró que el aislamiento tiene una respiración Facultativa.

- H. Forma Circular, con relieve Convexo y borde Entero en la prueba demostró que el aislamiento tiene una respiración Facultativa. Véase en la Figura 3.10 y la Figura 3.11 los gráficos según las dos comunidades vegetales.



**FIGURA 3.10 PRUEBA DE HUGH-LEIFSON EN
AISLAMIENTO BhPm**



**FIGURA 3.11 PRUEBA DE HUGH-LEIFSON EN
AISLAMIENTO BdTb**

En la tabla 12 se puede observar las características de los aislamientos de colonias de bacterias obtenidas en esta prueba.

TABLA 12

DESCRIPCIÓN DE BACTERIAS SEGÚN LA PRUEBA DE HUGH-LEIFSON

Bacteria	Forma	Elevación	Margen	Prueba Hugh-Leifson		
				Aerobia	Facultativa	Anaerobia
A	Puntiforme	Convexo	Entero		X	
B	Alargado	Convexo	Entero		X	
C	Circular	Elevado	Entero		X	
D	Irregular	Elevado	Estrellada	X		
E	Irregular	Elevado	Entero	X		
F	Irregular	Plano	Ondulado			X
G	Rizoide	Elevada	Filamentoso		X	
H	Circular	Convexo	Entero		X	

3.3.2 Prueba Enzimática en relación al oxígeno: Catalasa.

En los cultivos bacterianos que se observaron en el laboratorio las muestras que corresponde del bosque Protector Prosperina, se encontraron 5 colonias de bacterias pertenecientes a la familia Fabaceae que dio como resultado 100% positivos en esta prueba.

El clado Magnoliide presentó 5 colonias de bacterias, las cuales reportaron negativa en la prueba de catalasa.

En el grupo Urticales (Urticaceae) de las 3 colonias de bacterias encontradas todas resultaron ser positivo en la prueba de catalasa.

En la familia Sapotaceae las dos colonias de bacterias encontradas resultaron ser positivas en la prueba de Catalasa.

Todos los datos obtenidos se pueden apreciar en la Figura 3.12.

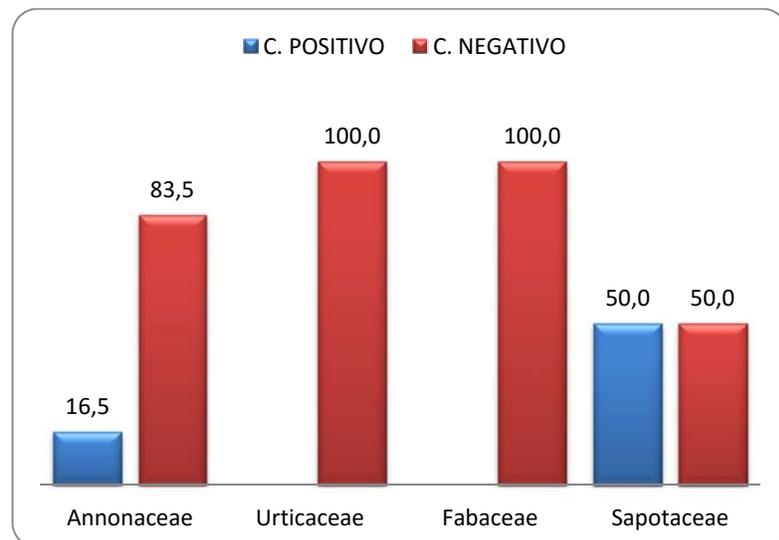


FIGURA 3.12 PORCENTAJE DE LA PRUEBA DE CATALASA BdTb

En las muestras correspondientes al Bosque Húmedo Pie-Montano, se encontraron seis colonias de bacterias pertenecientes a la Familia Fabaceae, en las cuales se obtuvo 12,5% Catalasa Positiva y 87,5% Catalasa negativa.

En el clado Magnoliide se encontró dos colonias bacterianas, las cuales reportaron ser 100% negativa en la prueba Catalasa.

En la familia Malvaceae se encontró tres colonias bacterianas las cuales reportaron ser 100% Catalasa negativa.

En el orden Urticales (Urticaceae + Moraceae) de las 6 bacterias encontradas encontramos dos bacterias representativas; siendo el 25% Catalasa positiva y el 75% Catalasa negativa. (Figura 3.13)

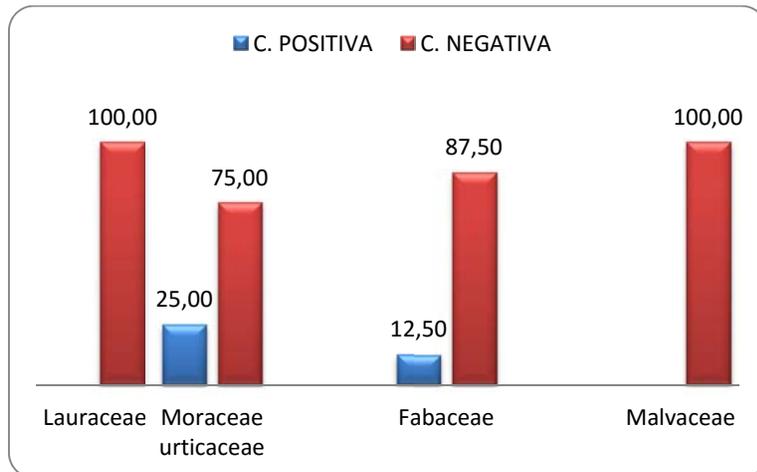


FIGURA 3.13 PORCENTAJE DE CATALASA EN BHPm

✓ Análisis de discusión

- A nivel de la familia Annonaceae sobre la captura de radicales libres en metabolitos secundarios; investigaciones recientes se demuestra que esto sucede cuando existe ausencia de enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa; es decir existe inactividad de varias enzimas. Esto se pudo aseverar que en nuestro estudio se encontró poca presencia de enzima catalasa en las muestras de bacterias recolectadas de la Familia Annonaceae en el BHPm. Esto es corroborado por la autora Nora Jiménez del Grupo de investigación en sustancias Bioactivas de la Facultad de Químicas Farmacéuticas de la Universidad de Antioquia; Colombia.

- Las bacterias aeróbicas y facultativas poseen enzimas catalasa y peroxidasa; lo cual dentro de su metabolismo de respiración poseen citocromo que se lo considera una proteína transportadora de electrones, esto es una característica de las bacterias aeróbicas. Con este concepto se puede discutir con bases sobre los resultados bioquímicos en el Bosque Húmedo Pie-Montano donde se encontró bacterias con respiración aeróbicas y facultativas que además son de catalasa positiva. Esto coincide con la metodología con la que hasta el momento viene realizando Murray en su trabajo sobre metabolismo aeróbicos de bacterias.
- Sobre la familia Fabaceae se han realizados varios estudios sobre la actividad microbiana; sin embargo, los metabolitos secundarios y las bioactividades que puedan poseer las especies de esta familia; solo un pequeño porcentaje han sido analizados en detalle; algo similar se puede deducir en nuestro país. Este criterio es respaldado por discusiones emitidas por Zampini I. C. en trabajos relacionados de la familia Fabaceae.
- La familia Fabaceae por lo general están ligadas a bacterias gram-negativas en cultivos, pero en comunidades vegetales

como los bosques; los estudios son limitados. Sobre los resultados obtenidos tanto en el BhPm y el BdTb se presentó un mayor porcentaje de colonias Gram Positivos, y esto puede ser dado por la variabilidad de factores a nivel en biodiversidad regional. Según Rodrigo Sierra indica que en el Ecuador existen veinticuatro regiones con diferencias marcadas a nivel de factores climáticos, caracterizaciones edáficas, entre otros.

CAPÍTULO 4.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

De los resultados obtenidos a partir de la caracterización del aislamiento de microorganismos en dos zonas ecológicamente diferentes mediante la técnica de microorganismos eficientes se pueden establecer las siguientes conclusiones.

1. La morfología de colonias de bacterias a nivel del bosque húmedo Pie-montano presenta mayor diversidad de características morfológicas, respecto de los aislamientos obtenidos en el bosque deciduo de tierras bajas, lo cual puede deberse a la diferencia en factores ambientales, como clima, temperatura y precipitación.
2. En ambas comunidades se obtuvieron poblaciones de bacterias Gram positivas, indiferente a la familia o grupo taxonómico en donde se realizó el aislamiento.

3. A nivel sobre la familia Fabaceae y el clado Magnoliide se comportaron en forma semejante en ambos ecosistemas en estudio, pues se presentó predominio de bacterias Gram positivas principalmente los aislamientos correspondientes al bosque húmedo Piemontano y poca presencia de Gram negativas en el bosque deciduo de tierras bajas.
4. Acerca del grupo heterogéneo a nivel de tinción de Gram, demostró ser bacterias gram positivas las familias que conforman este grupo (familia Malvaceae y familia Sapotaceae) y cabe resaltar que el orden Urticales presentó porcentajes interesantes en cuanto a bacterias Gram negativas.
5. La prueba de Catalasa, produjo resultados interesantes respecto de los aislamientos en cada comunidad vegetal. Siendo así, las colonias obtenidas desde el bosque deciduo de tierras bajas dieron reacción positiva al 100% en Fabaceae y para el orden Urticales; mientras que el clado Magnoliide representado por la familia Annonaceae produjo un ínfimo porcentaje de colonias con reacción catalasa positiva.

6. Sobre la misma prueba bioquímica el grupo heterogéneo a través de la familia Sapotaceae dio como resultado que las colonias aisladas se distribuyan equitativamente; se encontró reacciones positivas y negativas, esto a nivel de la comunidad del BdTb.
7. El metabolismo respiratorio de los aislamientos de bacterias realizadas permitieron establecer q los cultivos obtenidos a partir de esta familia presentaron preponderadamente respiración facultativas en ambos ecosistemas.
8. Los aislamientos encontrados a nivel del clado Magnoliide respecto en el BhPm presentaron mayoritariamente en su totalidad respiración facultativa, en cambio los aislamientos de este grupo en el BdTb presentaron sólo un pequeño porcentaje de colonias que poseen respiración aeróbica.
9. El orden Urticales a través de sus aislamientos obtuvo un metabolismo de tipo fermentativo, oxidativo y facultativo solo a nivel de Bosque húmedo Pie montano; siendo todo lo contrario en el Bosque decíduo de tierras bajas; que en los resultados demostraron en su totalidad colonias facultativas.

RECOMENDACIONES

En relación a las conclusiones generadas en esta investigación, se pueden emitir las siguientes recomendaciones:

1. Obtener muestras de suelos, como respaldo para la obtención de microorganismos, en forma paralela a la colocación de trampas para su captura.
2. Evaluar otros grupos taxonómicos de plantas con flores respecto de su relación con Microflora benéfica de suelos, y desde diferentes comunidades vegetales.
3. Se deben realizar pruebas de campo posterior al aislamiento de microbios. Estas cepas deberán fijarse en melaza, y aplicarse a los sistemas radiculares de cultivos, para autenticar su rol benéfico en la agricultura.
4. Realizar la mayor cantidad de pruebas bioquímicas para los organismos unicelulares, incluyendo la realización de pruebas de bioactividad a nivel de familia Fabaceae.

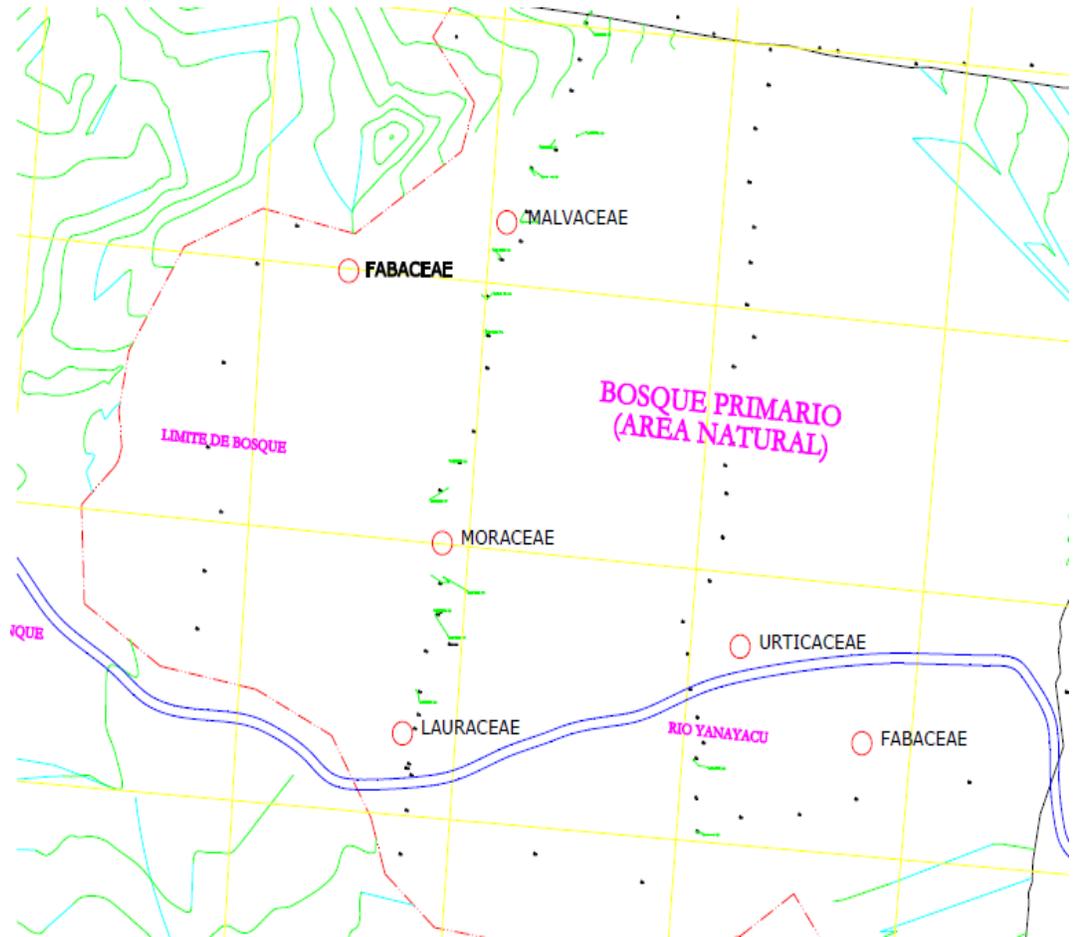
APÉNDICES

APÉNDICE A

UBICACIÓN DE FAMILIAS DE PLANTAS EN BdTb.



UBICACIÓN DE FAMILIAS DE PLANTAS EN BHPm



APÉNDICE B.

MATERIAL HERBORIZADO

MATERIAL DE LEÑOSAS INVESTIGADAS A NIVEL BdTb

FAMILIA FABACEAE



Centrolobium ochroxilum



Caesalpinia glabrata

CLADO MAGNOLIIDE



Annona squamosa L.



Annona muricata L.

FAMILIA SAPOTACEAE



Pradosia montana

MATERIAL DE LEÑOSAS INVESTIGADAS A NIVEL BHPM

FAMILIA FABACEAE



Dussia lehmannii



Inga carinata

CLADO MAGNOLIIDE



Rhodostemonodaphne kunthiana

FAMILIA URTICACEAE



Cecropia gabrielis



Ficus citrifolia

FAMILIA MALVACEAE



Matisia coloradum

Guayaquil, 11 de Enero del 2010

Señores

Jorge Enríquez B.
Jorge L. Viera B.

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECIES PARA LAS COMUNIDADES EN ESTUDIO

BOSQUE SACHA WIWUA. GUASAGANDA, LA MANÁ (COTOPÁXI)

#	FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRES COMUNES
01	FABACEAE	<i>Inga carinata</i> T. D. Penn.	“Guaba”
02	FABACEAE	<i>Dussia lehmannii</i> Harms	“Yuca”
03	LAURACEAE	<i>Rhodostemonodaphne kunthiana</i> (Nees) Rower	“Canelo blanco”
04	MALVACEAE	<i>Matisia cf. coloradorum</i> Benoist	“Helecho”
05	MORACEAE	<i>Ficus cf. citrifolia</i> Mill	“Matapalo”
06	URTICACEAE	<i>Cecropia cf. gabrielis</i> Cuatrec.	“Guarumo”

BOSQUE PROTECTOR PROSPERINA. PROSPERINA, GUAYAQUIL, GUAYAS

#	FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRES COMUNES
07	FABACEAE	<i>Centrolobium ochroxylum</i> Rose ex Rudd	“Amarillo”
08	FABACEAE	<i>Caesalpinia glabrata</i> Kunth	“Cascol”
09	SAPOTACEAE	<i>Pradosia montana</i> T. D. Penn.	“Paipai” / “Tillo colorado”
10	URTICACEAE	<i>Cecropia litoralis</i> Snethl	“Guarumo”
11	ANNONACEAE	<i>Annona muricata</i> L.	“Guanabana”
12	ANNONACEAE	<i>Annona squamosa</i> L.	“Chirimoya”

Muy Atentamente:

Ing. Felipe Mendoza G.
Profesor de Botánica de Espol
Director de Seminario de graduación

APÉNDICE C

TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN EN COLONIAS DE MICROORGANISMOS



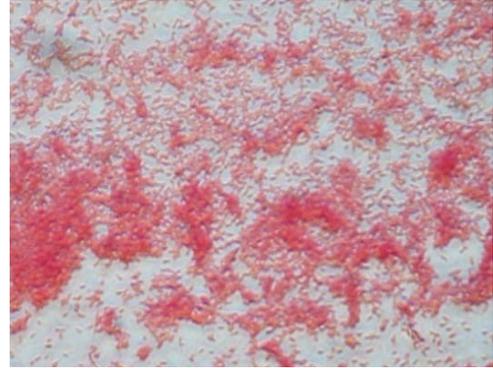
Técnica de dilución por estrías en bacterias.



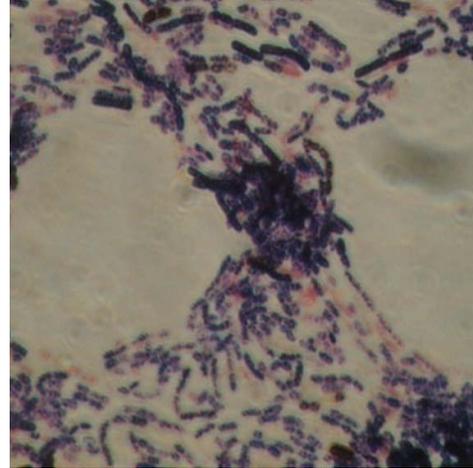
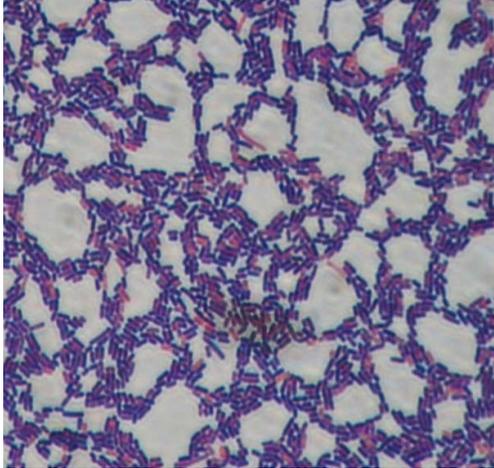
Técnica de Purificación de hongos.

APÉNDICE D

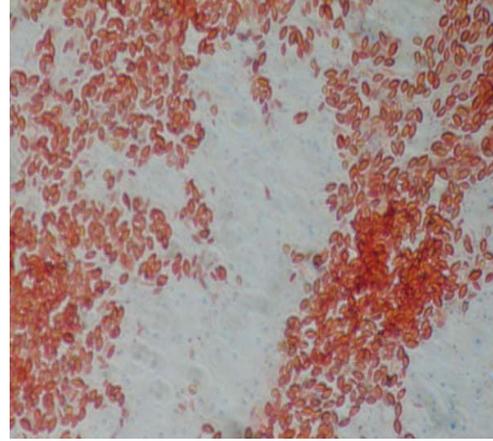
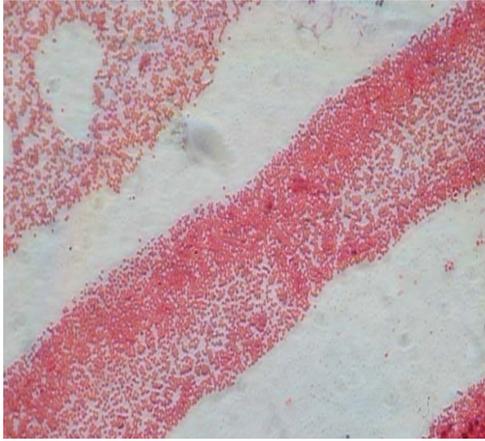
PRUEBAS EN TINCIÓN DE GRAM



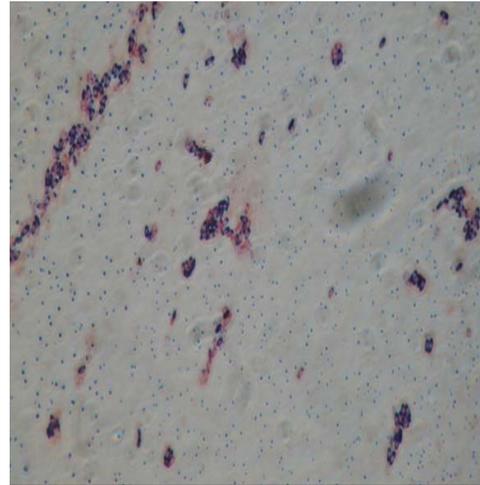
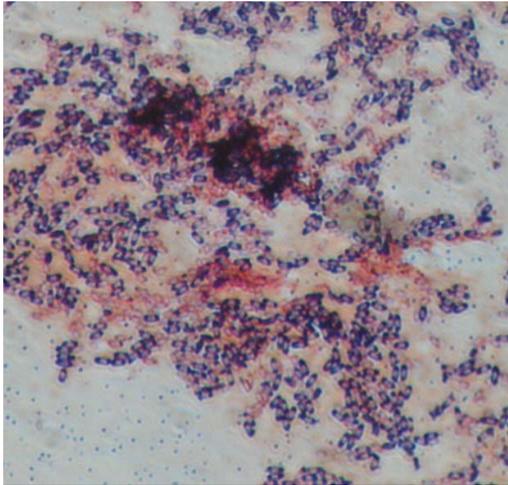
BACILOS GRAM NEGATIVOS



BACILOS GRAM POSITIVOS



COCOS GRAM NEGATIVOS.



COCOS GRAM POSITIVOS

APÉNDICE E.

PRUEBA ENZIMÁTICA EN RELACIÓN AL OXIGENO: CATALASA



REACCION CATALASA POSITIVA



APENDICE F.

REACCIONES DE LA PRUEBA OXIDO FERMENTATIVA

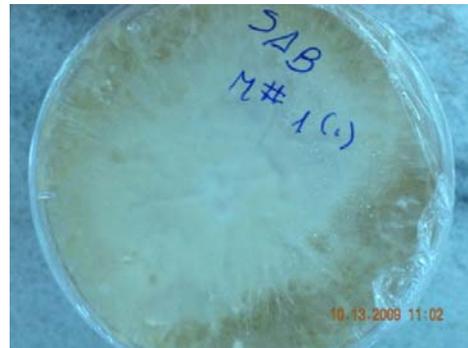


Prueba oxido fermentativa

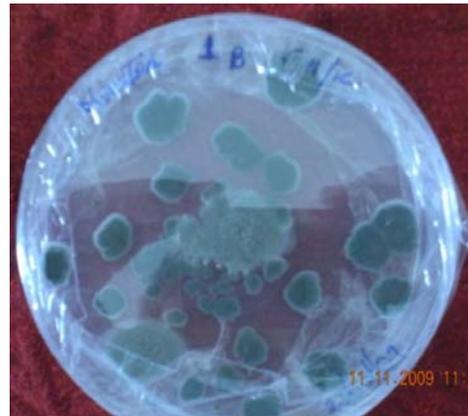


APENDICE G.

COLONIAS DE HONGOS ENCONTRADAS DESDE MUESTRAS DE CAMPO



Formas de hongos encontrados.



APENDICE H

DESCRIPCIÓN DE COLONIAS DE HONGOS ENCONTRADAS

DESCRIPCION DE HONGOS ENCONTRADAS EN LABORATORIO,
EXTRAIDAS DEL BOSQUE PROTECTOR PROSPERINA.

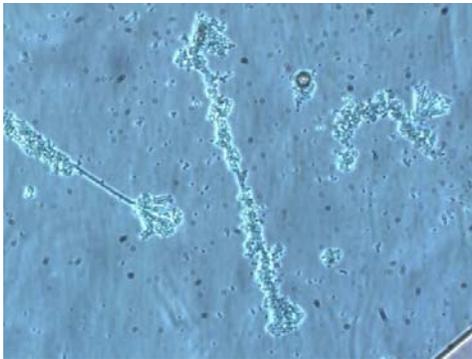
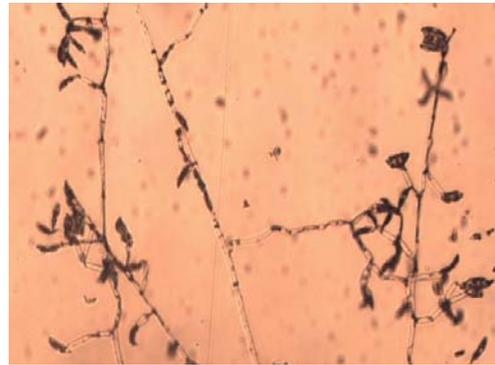
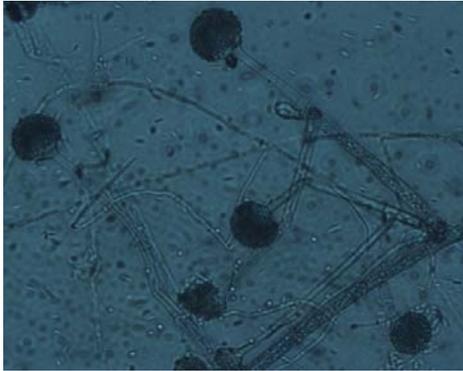
Color Colonia	Crecimiento	Estructura	Hifas	Presencia
FABACEAE				
Crema	Vertical	Algodonosa	Septadas delgadas	Esporas
SAPOTACEAE				
Verde con borde blanco	Irregular	Esporulado	No visto	Esporas
URTICALES				
Blanco	Lateral	Algodonosa	No visto	Esporangioforos
Blanco	Vertical	Algodonosa	Septadas delgadas	
MAGNOLIIDE (ANNONACEAE)				
Blanco	Lateral	Algodonosa	Septadas delgadas	Hifas lobosas
Verde, negro y borde blanco	Irregular	Esporulado	No visto	Esporas

**DESCRIPCION DE HONGOS ENCONTRADAS EN LABORATORIO,
EXTRAIDAS DEL BOSQUE SACHA WIWUA.**

Color Colonia	Crecimiento	Estructura	Hifas	Presencia
FABACEAE				
CREMA	LATERAL	ALGODONOSA	SEPTADAS	ESPORAS
MALVACEAE				
BLANCIO con borde negro	irregular	Esporulado	No visto	Esporas
URTICALES (MORACEAE y URTICACEAE)				
Crema	Vertical	algodonosa	septadas	esporas
blanco	irregular	esporulado	No visto	Esporangioforo
LAURACEAE				
crema	vertical	algodonoso	septadas	hifas
Verde	irregular	esporulado	No visto	esporas

APENDICE I

COLONIA DE HONGOS VISTAS AL MICROSCOPIO.



BIBLIOGRAFÍA

1. **ACUÑA, H.** Manual Agro-Pecuario, Editorial Biblioteca del Campo, Bogotá, Colombia, Volumen Agro, 2002.
2. **ALVAREZ, S. & F. GARCÍA** (Eds); Ecología del suelo en la selva Tropical húmeda de México; Instituto de Ecología A.C., Xalapa – México. 2003.
3. **AMORES, L.** "Determinación de la cobertura Vegetal de un bosque húmedo pre-montano en la parroquia Guasaganda, Provincia de Cotopaxi". (Tesis Ing. Agrop.) ESPOL, FIMCP. Guayaquil, Ecuador. 2010. (En Prensa).

4. **ARIAS, C.** Estudio de dos grupos de microorganismos como agentes aceleradores de descomposición de los Desechos Sólidos Orgánicos originados en los comedores de la ESPOL. (Tesis Ing. Agrop.) ESPOL, FIMCP. Guayaquil, Ecuador 2007.
5. **BERG, C. C.** Cecropiaceae. Pp: 92-93. In: Flowering plants in the Neotropics, N. Smith, et al. Princeton, New Jersey, USA. 2004
6. **BIANCHINOTI, M.** Comunidades fúngicas asociadas a ramas y ritidoma troncal de *Geoffroea decorticans*; Revista Técnica Agrícola. No 67; México 2007
7. **BIZZORERO, F.** Tecnologías Aplicadas- Biofertilizantes; Centro Uruguayo de tecnologías Apropriadas. (CEUTA). Uruguay. 2006
8. **BODERO, A.** Bosque Protector Prosperina. URL: [HTTP://:www.bosqueprotector.espol.edu.ec](http://www.bosqueprotector.espol.edu.ec) 1996. (visitado el día Septiembre 17/09/2009).

9. **BURTIN, D., N. ROAS, AL L. MARK.** BIOLOGÍA MOLECULAR, una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario de plantas en Colombia; REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA VOL. VI No. 2 Diciembre 2004 67-77

10. **CAMPOS, S.** Producción de abonos orgánicos a partir de desechos de porquerizas. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. 2009

11. **CANOVAS, A.** Tratado de Agricultura Ecológica, Ed. Instituto d Estudios Almerienses de la Diputación de Almería - España, 1993.

12. **ESQUIVEL-COTE, R.** Microorganismos que alimentan y protegen a las plantas; Correo del Maestro Núm. 141, febrero 2008.

13. **FERRERA-CERATO, R & J. PÉREZ-MORENO**(eds). *Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Estado de México. 1995.

14. **FREIRE, A.** Botánica sistemática Ecuatoriana. Miss. Bot. Gard./ Fundacyt / RLB/ Funbotánica QCNE. Quito 2004

15. **GARCIA, J.** Artículo Los Microorganismos Eficientes en la Agricultura, Revista El Agro Edición 95, Editorial UMINASA S.A. Guayaquil - Ecuador, 2004.

16. **GENTRY, A.** "A Field Guide to the families and genera of woody plants of Northwest of South American (Colombia, Ecuador, Perú) with supplementary notes on herbaceous taxa". Conservation International. Washington DC, USA. 895 pp. 1993.

17. **GONZALEZ, F.** Monocotiledóneas y Dicotiledóneas. Un sistema de clasificación que acaba con el siglo. Revista Ciencia Académica Colombiana; Volumen 23 Numero 87; Junio 1999. Colombia

18. **HIGA, T.** Una revolución para salvar la tierra; Emro Europe Branch, Tarragona, 2002

19. **JIMENEZ, N, J. LONDOÑO & G. ARANGO** Actividad captadora de radicales libres y citotoxicidad de plantas colombianas de la Familia Annonaceae. Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas, Facultad de Quím. Farmac., Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2005

20. **KUSAKA, H, E. ORTEGA.** Artículo Microorganismo Autóctono y la Aplicación a Bokashi, Revista El Agro Edición 116, Editorial UMINASA S.A., Guayaquil, Ecuador, 2006.
21. **MADIGAN, M, J. MARTINKIO, J. PARKER, BROCK.** Biología de los Microorganismos. Pearson / Prentice Hall, Decima Edición, Madrid, 2004.
22. **MARTÍNEZ, D, & F. PUGNAIRE** Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Departamento de Ecología funcional y evolutiva; Revista ecológica. Almería, España. Mayo 2009.
23. **MARTÍNEZ, E., L. LLORET, E. ORMEÑO, P. VINUESA, M. ROSENBLUETH, R. RINCÓN, M. A. ROGEL, C. SILVA, J. MARTÍNEZ, I. TOLEDO & A. LÓPEZ.** "Diversidad genética de bacterias mutualistas de plantas". pp: 293-297. En: Simposio de Recursos genéticos para América latina y El Caribe. N. Altier et al (eds.). Montevideo, Uruguay. 2005.
24. **MEJÍA, G.** Agricultura Ecológica; Terranova Editores Ltda.; Segunda edición, Bogotá - Colombia, 2001.

25. **MERCK** Microbiology Manual, Merck KGA. Doceava Edición; Alemania, 2008.
26. **MURRAY, P, K. ROSENTHAL, M. PFAUER.** Microbiología Medica; ELSEVIER Imprentas; Madrid – España, 2006.
27. **OLIVAS, E.** Manual de prácticas. Microbiología I, II y Parasitología: Programas de Medicina. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez; Primera edición. Chihuahua – México. 2001.
28. **PARKS, L.** HandBook of Microbiological Medium; CRC Press Inc, E.E.U.U.; 1997.
29. **PENNINGTON, T. D. & N. REVELO.** Clave para la identificación del género Inga en el Ecuador: morfología, distribución y usos. Royal Botanic Garden. Kew, UK. 177pp. 1997.
30. **PEÑA, E & M. CARRION.** Manual para la producción de abonos orgánicos en la agricultura urbana, Edición INIFAT, 2002.

31. **PINTO, F.** Manual de prácticas de Fruticultura. IICA (Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura). San José, Costa Rica. 1986.
32. **PORTA, J, & M. LÓPEZ-ACEVEDO.** Edafología para la agricultura y el medio ambiente, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 1994.
33. **RESTREPO, J.** Elaboración de Abonos Orgánicos Fermentados y Biofertilizantes Foliare, IICA, 2001.
34. **SANGAKKARA, U. R.** "the technology of effective microorganisms case studies of application". En: curso: ¿microorganismos benéficos en la agricultura moderna: estrategias para sistemas más sostenibles Earth, Costa Rica. 2001.
35. **SIERRA, R.** Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental. Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y Eco Ciencia, 1999
36. **SUQUILANDA, M.** Agricultura Orgánica, alternativa tecnológica del futuro, UPS, Fundagro, Quito, Ecuador, 1996.

37. **WHITTAKER, R. H** Communities and ecosystems Ed. Mc Millan, 2da.

Edición, 385p. Ny. USA. 1975

38. **ZAMPINI I.C., CUELLO S., & ARIAS M.**, Caracterización Fitoquímica

y biológica de preparados fitoterápicos de especies pertenecientes al

género Acacia. (edit.) Jornadas Científicas de la Asociación de

Biología de Tucumán. ARGENTINA. 2007