



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE INGENIERÍA, INDUSTRIA Y CONSTRUCCIÓN

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMUNIDAD BACTERIANA CULTIVABLE DEL BOSQUE NATIVO Y BOSQUE DE PINO DENTRO DE LA MICROCENCA DEL MACHÁNGARA”

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA AMBIENTAL**

AUTOR: JESSICA JOHANNA CALLE IDROVO

DIRECTOR: Blga. JAZMÍN SALAZAR ORELLANA Mgt.

CUENCA – ECUADOR

2021

*Yo me gradué en
los 50 años de La Cato!
... y sostuve la Universidad*



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE INGENIERÍA, INDUSTRIA Y CONSTRUCCIÓN

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMUNIDAD BACTERIANA
CULTIVABLE DEL BOSQUE NATIVO Y BOSQUE DE PINO
DENTRO DE LA MICROCUENCA DEL MACHÁNGARA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA AMBIENTAL**

AUTOR: JESSICA JOHANNA CALLE IDROVO

DIRECTOR: Blga. JAZMÍN SALAZAR ORELLANA Mgt.

CUENCA – ECUADOR

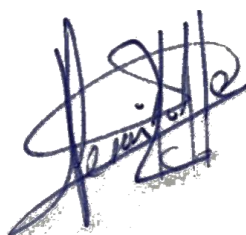
2021

*Yo me gradué en
los 50 años de La Cato!
... y sostuve la Universidad*

DECLARACIÓN

Yo, Jessica Johanna Calle Idrovo, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentada para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento; y eximo expresamente a la Universidad Católica de Cuenca y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

La Universidad Católica de Cuenca puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y la normatividad institucional vigente.



Jessica Johanna Calle Idrovo.

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Jessica Johanna Calle Idrovo, bajo mi supervisión.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Salazar', is centered on the page. The signature is fluid and cursive.

Blga. Jazmin Salazar Orellana.

DIRECTOR.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia doy gracias a Dios por permitirme cumplir una meta más en la vida y por la bendición de tener padres ejemplares que me han formado como persona de bien, me brindaron su apoyo incondicional a lo largo de mi vida estudiantil y como persona, para llegar a ser profesional, con dedicación, honradez y sobre todo humildad.

A las personas, profesores y compañeros que formaron parte de mi vida estudiantil algunas que aún forman parte de ella y otras que solo están en mis recuerdos quiero darles las gracias por sus consejos, amistad, compañía y por todo lo vivido.

Un agradecimiento especial a la Bióloga. Jazmin Salazar directora de tesis, quien me impartió sus conocimientos y experiencia orientados a la conclusión satisfactoria del presente.

DEDICATORIA

A mis padres Wilson y Fabiola, por ser mi pilar fundamental para cumplir cada una de mis metas, quienes con amor, trabajo, sacrificio y paciencia han sido y serán mi inspiración, impartíendome valores con el fin de hacer de mí una persona con valores grata ante los ojos de la sociedad.

De igual manera a mis hermanos Mónica, Erika y Andrés, por ser un apoyo incondicional en mi proceso de educación y formación personal porque con sus consejos, oraciones y compañía hicieron de mí una buena persona.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|---------------|
| DECLARACIÓN | III |
| CERTIFICACIÓN | IV |
| AGRADECIMIENTOS | V |
| DEDICATORIA | VI |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | VII |
| LISTA DE ILUSTRACIONES. | IX |
| LISTA DE TABLAS | X |
| LISTA DE ANEXOS | XI |
| RESUMEN | XII |
| ABSTRACT | XIII |
| CAPÍTULO I | - 1 - |
| 1. INTRODUCCIÓN | - 1 - |
| 1.1 OBJETIVOS | - 2 - |
| 1.1.1 <i>Objetivo General</i> | - 2 - |
| 1.1.2 <i>Objetivos Específicos</i> | - 2 - |
| CAPÍTULO II | - 3 - |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA. | - 3 - |
| 2.1 BACTERIAS | - 3 - |
| 2.1.1 <i>Importancia.</i> | - 4 - |
| 2.1.2 <i>Crecimiento microbiano.</i> | - 5 - |
| 2.2 SUELO | - 5 - |
| 2.2.1 <i>Microbiología del Suelo.</i> | - 6 - |
| 2.2.2 <i>Materia Orgánica.</i> | - 6 - |
| 2.2.3 <i>Efectos reportados de la comunidad bacteriana en el suelo.</i> | - 7 - |
| 2.3 BOSQUE Y VEGETACIÓN PROTECTORA MACHÁNGARA TOMEBAMBA. | - 7 - |
| 2.4 MICROCUENCA DEL MACHÁNGARA. | - 8 - |
| 2.4.1 <i>Clima</i> | - 9 - |
| 2.4.2 <i>Uso de Suelo</i> | - 9 - |
| 2.4.3 <i>Hidrología</i> | - 11 - |
| 2.5 BOSQUE NATIVO. | - 12 - |
| 2.6 BOSQUE DE PINO. | - 13 - |
| 2.7 TÉCNICAS TRADICIONALES DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS. | - 13 - |
| 2.7.1 <i>Técnicas dependientes de cultivo.</i> | - 13 - |
| 2.7.2 <i>Técnicas independientes de cultivo.</i> | - 14 - |
| 2.7.3 <i>Tinción de Gram.</i> | - 14 - |
| 2.7.4 <i>Técnica MALDITOF.</i> | - 14 - |
| CAPÍTULO III | - 15 - |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | - 15 - |
| 3.1 ÁREA DE ESTUDIO | - 15 - |
| 3.1.1 <i>Levantamiento planimétrico y de la cuadrícula.</i> | - 17 - |
| 3.1.2 <i>Recolección y preparación de las muestras.</i> | - 17 - |
| 3.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS | - 18 - |

| | | |
|-----------|---|---------------|
| 3.1.1 | Cultivo y aislamiento de cepas bacterianas. | - 18 - |
| 3.1.2 | Conteo de unidades formadoras de colonias. | - 18 - |
| 3.1.3 | Caracterización morfológica y prueba GRAM de bacterias. | - 18 - |
| 3.2 | METODOLOGÍA DE MALDI-TOF | - 19 - |
| 3.3 | IDENTIFICACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS DE INTERÉS AMBIENTAL | - 19 - |
| 3.4 | ÍNDICES DE DIVERSIDAD | - 19 - |
| 3.4.1 | Índice de Shannon. | - 19 - |
| 3.4.2 | Índice de diversidad de Pielou. | - 20 - |
| 3.4.3 | Índice de diversidad y uniformidad de Simpson. | - 20 - |
| 3.4.4 | Índice de Sorenson Cuantitativo. | - 20 - |
| 3.4.1 | Índice de Sorenson Cualitativo. | - 21 - |
| 4. | RESULTADOS DISCUSIÓN. | - 22 - |
| 4.1 | RECUESTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC) | - 22 - |
| 4.2 | IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS CULTIVABLES | - 22 - |
| 4.2.1 | Descripción morfológica de las bacterias | - 22 - |
| 4.2.1 | Identificación d las cepas bacterianas cultivables mediante la técnica MALDI-TOF. | - 27 - |
| 4.3 | DIVERSIDAD DE BACTERIAS PRESENTES EN EL BOSQUE NATIVO Y BOSQUE DE PINO DE LA MICROCUENCA DEL MACHÁNGARA | - 31 - |
| | CAPÍTULO V | - 32 - |
| 5. | CONCLUSIONES | - 32 - |
| | CAPÍTULO VI | - 33 - |
| 6. | RECOMENDACIONES | - 33 - |
| | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | - 34 - |
| | ANEXOS | - 41 - |

LISTA DE ILUSTRACIONES.

| | |
|--|---------------|
| <i>Ilustración 1 Cobertura Vegetal.....</i> | <i>- 10 -</i> |
| <i>Ilustración 2 Afluentes de la Microcuenca del Machángara.....</i> | <i>- 12 -</i> |
| <i>Ilustración 3. Ubicación de la Zona de la Microcuenca del Machángara.....</i> | <i>- 16 -</i> |
| <i>Ilustración 4. Ubicación de las parcelas en el sector Labrados.</i> | <i>- 16 -</i> |
| <i>Ilustración 5 Abundancia de las especies en el bosque nativo y bosque de pino.</i> | <i>- 28 -</i> |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|--------|
| Tabla 1 Coordenadas Geográficas del Área de Estudio..... | - 15 - |
| Tabla 2 pH y Temperatura. | - 17 - |
| Tabla 3 UFC/ML. | - 22 - |
| Tabla 4 <i>Aeromonas encheleia</i> | - 23 - |
| Tabla 5 <i>Buttiauxella ferraguliae</i> | - 23 - |
| Tabla 6 <i>Buttiauxella gaviniae</i> | - 23 - |
| Tabla 7 <i>Yersinia enterocolítica</i> | - 24 - |
| Tabla 8 <i>Paenibacillus stellifer</i> | - 24 - |
| Tabla 9 <i>Serratia proteamaculans</i> | - 24 - |
| Tabla 10 <i>Serratia plymuthica</i> | - 25 - |
| Tabla 11 <i>Bacillus muralis</i> | - 25 - |
| Tabla 12 <i>Mycobacterium sp.</i> | - 25 - |
| Tabla 13 <i>Yersinia kristensenii</i> | - 26 - |
| Tabla 14 <i>Bacillus pumillus</i> | - 26 - |
| Tabla 15 <i>Aeromonas molluscorum</i> | - 26 - |
| Tabla 16 Especies de bacterias cultivables del suelo de un bosque nativo y bosque nativo en la Microcuenca del Machángara. | - 27 - |
| 17 Familias de Bacterias. | - 28 - |
| Tabla 18 Índices de Diversidad específica. | - 31 - |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|---------------|
| <i>Anexos A Diseño de cuadrícula en el Bosque Nativo.</i> | <i>- 41 -</i> |
| <i>Anexos B Diseño de cuadrícula en el Bosque de Pino.</i> | <i>- 42 -</i> |
| <i>Anexos C Morfología de las bacterias presentes en el Bosque Nativo.</i> | <i>- 43 -</i> |
| <i>Anexos D Morfología de las bacterias presentes en el Bosque de Pino.</i> | <i>- 44 -</i> |
| <i>Anexos E Análisis técnica de MALDITOFF.</i> | <i>- 45 -</i> |
| <i>Anexos F Cálculos de diversidad del bosque nativo y bosque de pino.</i> | <i>- 46 -</i> |

RESUMEN

El suelo es uno de los ecosistemas más diversos, pero menos estudiado del planeta, hábitat de una gran cantidad de microorganismos que cumplen diversas funciones ecológicas, entre estos, las bacterias juegan un papel fundamental en la dinámica del suelo. El objetivo del presente estudio es la caracterización de la comunidad bacteriana cultivable del suelo de un bosque nativo y de un bosque de pino dentro de la Microcuenca del Machángara. Se tomaron muestras compuestas de suelo de cada bosque, se aislaron 40 cepas bacterianas que fueron identificadas mediante la técnica MALDITOFF, agrupándose en un total de 9 géneros y 12 especies. Al comparar los bosques evaluados no existió diferencias significativas en cuanto a la riqueza y diversidad de bacterias cultivables. En cuanto al posible rol de las bacterias se pudo identificar que las especies *A.enchelia*, *B.pumilus*, *B.muralis*, *P.stellifer*, podrían estar involucradas en procesos de nitrificación, otras como *A.enchelia* y *A.molluscorum*, *Mycobacterium.sp*, se les atribuye la capacidad de degradar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). Las especies *S.plymutica* y *S.proteamaculans* se las conoce como agentes de control biológico antifúngicos, también se identificaron géneros como *Y. entercolitica*, *Y.kristensenii*, *B.gaviniae*, *B.ferraguliae* que se caracterizan por ser patógenos de origen ambiental que causa infecciones humanas. El aislamiento, conservación y aplicación de estas cepas bacterianas puras servirán de base para nuevas investigaciones asociadas a procesos de biorremediación.

Palabras clave: bacterias, suelo, nitrificación, diversidad, biorremediación.

ABSTRACT

Soil is one of the most diverse but least studied ecosystems on the planet, habitat of a large number of microorganisms that fulfill diverse ecological functions, among which bacteria play an important role in soil dynamics. The objective of this study is the characterization of the cultivable bacterial community of the soil of a native forest and a pine forest within the Machángara micro-watershed. Composite soil samples were taken from each forest, 40 bacterial strains were isolated and identified using the MALDI-TOF technique, grouped in a total of 9 genera and 12 species. When comparing the evaluated forests, there were no significant differences in the richness and diversity of culturable bacteria. Regarding the possible role of bacteria, it was identified that the species *A.enchelia*, *B.pumilus*, *B.muralis*, *P.stellifer*, could be involved in nitrification processes, others such as *A.enchelia* and *A.molluscorum*, *Mycobacterium.sp* is attributed to the ability to degrade Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). *S.plymutica* and *S.proteamaculans* are known as antifungal biological control agents, also identified genera such as *Y. enterocolitis*, *Y.kristensenii*, *B.gaviniae*, *B.ferraguliae* that are characterized by being pathogens of environmental origin that cause human infections. The isolation, conservation, and application of these pure bacterial strains will serve as a basis for further research associated with bioremediation processes.

Keywords: bacteria, soil, nitrification, diversity, bioremediation.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema vivo que ha sido alterado por actividades antrópicas que modifican las características físico, químicas y biológicas, mismas que representan riesgos para la salud y el medio ambiente, afectando el desarrollo y composición de las comunidades biológicas preponderantes como indicadores de calidad y salud del ecosistema, sin la existencia de estas comunidades, el suelo sería considerado un soporte donde se incorporan nutrientes que sirven para el desarrollo de las plantas, ignorando el rol que cumplen los microorganismos (Van Bruggen, Semenov, Van Diepeningen, De Vos, & Blok, 2006).

Los microorganismos que forman parte del suelo, en su mayoría hongos y bacterias, cumplen un papel importante en las funciones ecológicas y la conservación de la dinámica del suelo (Recharte, 2015). Estos desempeñan alrededor del 80% al 90% de las funciones edáficas más relevantes, juegan un papel fundamental en el ciclo del nitrógeno, carbono y el flujo de energía, afectan la capacidad de almacenamiento de agua, la tasa de infiltración, la susceptibilidad a la compactación, entre otras.

Los estudios de diversidad del componente biológico del suelo representan un acercamiento a la evaluación de la estabilidad y riqueza del ecosistema. Una comunidad biológica diversa y activa puede producir efectos favorables, no obstante, se conoce muy poco de la microbiología del suelo, pero aún más desconocidas son las ventajas de los microorganismos que se encuentran presentes, lo que ha motivado a grupos de investigación en diferentes países al estudio de la composición de comunidades biológicas (Sernaque, Cornejo, Pierre, & Mialhe, 2019), siendo necesario cuantificar e identificar los microorganismos, y conocer su rol fundamental (Efron, Sarti, Quinteros, & Catán, 2012).

En este estudio se pretende determinar el uso potencial de las bacterias aisladas del suelo de un bosque nativo y bosque de pino en procesos de biorremediación que permitan generar una alternativa para regenerar y recuperar la calidad del agua y suelos afectados, basándose en la degradación o transformación de los contaminantes (Cando, 2011).

Entre los problemas ambientales donde las bacterias han sido utilizadas en procesos de biorremediación, se mencionan: la recuperación de suelos que presentan una desnitrificación (Sepúlveda, González, & Inostroza, 2012), debido al uso excesivo de agroquímicos (Navarro, 2018), como dato a nivel nacional según el Instituto Ecuatoriano

de Normalización INEN (2016) afirma que la superficie sembrada con cultivos permanentes y transitorios en el 50,03% y el 78,24% respectivamente se aplicó algún tipo de insumo de origen químico y apenas en el 2,66% de la superficie cultivada con transitorios se usó insumos orgánicos; la degradación de hidrocarburos que provoca el deterioro de la estructura del suelo (Ñustez, 2012), el tratamiento de aguas residuales con altos niveles de nitrógeno amoniacal, que en la mayoría de casos son vertidas al cauce de los ríos sin ningún tipo de tratamiento, provocando el deterioro significativo de la calidad del agua (Solano, 2011).

Los resultados aportarán a la generación de información base sobre la composición de la comunidad bacteriana cultivable en suelos andinos y su posible aplicación en procesos de biorremediación.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

- Caracterizar la comunidad bacteriana cultivable del suelo de un bosque nativo y un bosque de pino dentro de la Microcuenca del Machángara, con la finalidad de determinar su composición, variación y su uso potencial en procesos de biorremediación.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Analizar la diversidad funcional de grupos de bacterias que componen la comunidad bacteriana cultivable del suelo del bosque nativo y bosque de pino dentro de la Microcuenca del Machángara.
- Comparar la diversidad y la funcionalidad de la comunidad bacteriana cultivable presente en un bosque nativo y un bosque de pino de la Microcuenca del Machángara.
- Identificar agentes biológicos que sean de interés en procesos de biorremediación, biotecnológicos y agrícolas presentes en la comunidad bacteriana cultivable del suelo del bosque nativo y bosque de pino de la Microcuenca del Machángara.

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Bacterias

Son microorganismos unicelulares procariotas más pequeños y abundantes, se expresan en unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo, se encargan de descomponer y mineralizar residuos orgánicos de los cuales obtienen energía y alimento.

El número de bacterias está relacionado con la textura, estructura, porosidad, aireación y retención de humedad en los suelos, los ecosistemas que tienen suelos con las propiedades físicas antes mencionadas, con poca compactación y sin excesos de agua interactúan directamente con sistemas biológicos, atmosféricos, hidrológicos (Acuña, Wagner, & Pocasangre, 2006).

Las bacterias se pueden clasificar en aerobias, anaerobias y facultativas, por el pH en acidófilas, basófilas o neutrofilias, con respecto a su metabolismo se dividen en heterótrofas y autótrofas, y su clasificación por la temperatura en psicrófilas y mesófilas (Delgado, 2019).

El crecimiento bacteriano es una serie de reacciones necesarias para la división de una bacteria en dos células hijas, a este proceso se lo conoce como fisión binaria y ésta estrechamente relacionado con la temperatura y el pH, factores que influye en el crecimiento microbiano, es así que algunos crecen en pH bajos, no obstante la mayoría se desarrollan en pH entre 6 y 8. Otro factor que determina su crecimiento es la presencia o ausencia de oxígeno (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009).

Las bacterias que habitan el suelo han sido históricamente aprovechadas, así, por ejemplo, la mayoría de los primeros antibióticos fueron aislados a partir de actinobacterias del suelo (Lewis, 2013). Actualmente, aún el 80% de los antibióticos siguen proviniendo de este grupo de bacterias (D'Costa, Griffiths, & Wright, 2007). Las funciones de los organismos del suelo continúan siendo estudiadas para aplicaciones biotecnológicas como biorremediadores, sintetizadores de vitaminas, biocatalizadores (lipasas, amilasas, glucanasas, proteasas, oxidoreductasas), aditivos industriales o medicamentos (Schmeisser, Steele, & Streit, 2007).

2.1.1 Importancia.

Las bacterias fotosintetizadoras se encargan de una parte de la producción del oxígeno para el planeta, lo que muestra la importancia vital de estas. Son de gran eficacia para remediar e impulsar el desarrollo de las plantas, en determinados procesos agrícolas y otros ecosistemas, su presencia permite un mayor y mejor desarrollo, algunas pueden causar enfermedades, otras son imprescindibles para tratar o erradicar las mismas.

Capaces de degradar compuestos tóxicos que contienen cloro, derivados de petróleo, transforman sustancias altamente tóxicas de mercurio y metales pesados, en otras menos tóxicas y volátiles para el suelo (Corrales, Antolinez, Bohorquez, & Vargas, 2015).

Fijan nitrógeno que está presente de forma natural en el suelo, representando un biofertilizante ecológico, capaz de acelerar y promover el crecimiento de las plantas, contribuyendo al enriquecimiento del nitrógeno y a su regeneración de forma ecológica y sucesiva. Crean barreras protectoras contra hongos y bacterias patógenas para las plantas, creando mayor resistencia a climas áridos y condiciones de sequía (Guzmán, 2018).

La cantidad de bacterias que se encuentran presentes en el suelo depende de muchos factores como la temperatura, el tipo de suelo, contenido de humedad, prácticas de manejo agrícola, vegetación, fertilización, cantidad de oxígeno, y el pH del suelo (Ramos & Doris, 2008).

La mayor concentración de bacterias se puede encontrar en la rizosfera, aquí se da la interacción entre las bacterias y las raíces de las plantas, la microbiota juega un papel fundamental en la protección de la planta contra patógenos, también influye en la salud de los ecosistemas. Los procesos agrícolas afectan a la diversidad y densidad de comunidades microbianas, que a largo plazo provoca la baja fertilidad de los suelos (Calvo, Meneses, & Zuñiga, 2008), es importante destacar la relación que existe entre las micorrizas y las bacterias, ya que al aumentar el porcentaje de las raíces con estos hongos influyen en la efectividad para llevar a cabo funciones como la remoción de toxinas, la solubilización de fosfatos orgánicos e inorgánicos y la resistencia a patógenos (Garzón, 2016).

2.1.2 Crecimiento microbiano.

La multiplicación celular es consecuencia del crecimiento, por lo tanto, se origina una población en el ecosistema o en un medio de cultivo (Perez, 2001).

Los microorganismos varían ampliamente en cuanto a sus demandas nutricionales y sus fuentes de energía metabólica. Los tres modos principales de generar energía metabólica son fermentación, respiración y fotosíntesis, para que los organismos puedan crecer deben seguir uno de estos métodos (Varela & Grotiuz, 2002).

Los medios de cultivo deben tener todos los nutrientes y elementos que los microorganismos necesitan para la síntesis biológica, entre estos se debe encontrar el carbono, vitaminas, azufre, entre otros (Dublán, 2016). La mayor parte de bacterias utilizan carbono para generar energía, existen organismos fotosintéticos que reducen el dióxido de carbono a glucosa (Varela & Grotiuz, 2002).

Por otro lado, los organismos necesitan nitrógeno para sintetizar enzimas, proteínas y ácidos nucleicos, algunos microorganismos obtienen el nitrógeno a partir de sustancias inorgánicas. Estos dependen de factores nutricionales y factores físicos como el pH el cual determina si los suelos son ácidos o alcalinos.

Las bacterias se desarrollan a temperaturas por encima de los 30°C, pero varían considerablemente dependiendo de la adaptación de estas. En cuanto a la concentración de oxígeno y la humedad, todas requieren de agua ya que están expuestas directamente al ambiente y algunas solo viven unas horas sin la presencia de humedad (Perez, 2001).

2.2 Suelo

“El suelo es un recurso viviente, dinámico, no renovable, cuya condición y funcionamiento es vital para la producción de alimentos, y para el mantenimiento de la calidad ambiental” (Jiménez, 2017). Formado por una fracción orgánica y una fracción mineral o inorgánica, soporte necesario para la vida existente en el planeta, sistema que presenta intercambio de materia y energía.

Alberga plantas, animales y microorganismos que interactúan en comunidad, clave para el funcionamiento de los ecosistemas naturales y productivos. La importancia de los organismos se debe a su intervención en los ciclos del carbono y nitrógeno, que proporcionan muchos beneficios tales como la producción de fibras, combustibles, entre otras (Alvarez, Cardozo, Mujtar, & Tittonell, 2018). Además, los procariotas pueden causar cambios muy importantes en los parámetros físico-químicos de un ecosistema en tiempos cortos (Moreno, Garcia, Pascual, & Bernal, 2013).

El componente esencial del sistema edáfico es la materia orgánica del suelo, responsable de la mayor parte de procesos biológicos y físico-químicos del suelo. Está constituido por microorganismo que representan el 1% de la materia orgánica total, esta porción es la más importante y responsable de toda la bioactividad y las relaciones que dan lugar a la disponibilidad de nutrientes, la génesis del suelo y todo el proceso activo entre los componentes del suelo (Aguilera, 2000). Uno de los ecosistemas más complejos de la naturaleza, comprende una variedad de microhábitats lo que hace posible la vida de los microorganismos.

Los suelos colonizados con mayor diversidad de microorganismos van a ser suelos más sanos y compatibles con los cultivos, la actividad de descomposición de la materia orgánica y la solubilización de nutrientes disponibles para las plantas se concentra en la rizosfera (Toro, 2004).

2.2.1 Microbiología del Suelo.

El suelo, hábitat propicio para la proliferación de microorganismos es donde se encuentran la mayor parte de éstos, se categorizan en cinco grupos que son, bacterias, protozoos, hongos, algas. Los grupos bacterianos son sensibles al cambio de condiciones ambientales, con pequeños cambios climáticos estas dejan de producir metabolismos y enzimas fundamentales para su subsistencia (Ramos & Doris, 2008).

“La variabilidad de comunidades microbianas en el suelo depende de la capacidad para metabolizar carbono, disponibilidad de macro y micro elementos, contenido de agua, (pH) y tamaño de las partículas, cuando estas características se alteran se producen ambientes aerobios, saturados” (Benavides & Hermida, 2008).

Para un hábitat ideal que propicie el desarrollo de los microorganismos es necesario que el agua y el aire circulen por el suelo con facilidad y se hallen en un equilibrio, que permita el desarrollo de las colonias de microorganismos. La comunidad bacteriana edáfica depende de los nutrientes presentes en el ecosistema, considerados como fuente productora de compuestos para las plantas (Suquilanda, 2017).

2.2.2 Materia Orgánica.

La materia orgánica son los residuos de plantas y animales, los microorganismos degradan la materia orgánica en dióxido de carbono y humus. La cantidad de materia orgánica presente en el suelo depende de algunos factores como: clima, vegetación, textura del suelo, entre otros. Los suelos de los bosques tienen menor cantidad de materia orgánica (Izquierdo & Venegas, 2013), ésta almacena muchos nutrientes, mejora la

estructura, previenen la erosión, mejoran la capacidad de retención de nutrientes y agua en los suelos.

La mayoría de microorganismos se especializan en descomponer la materia orgánica de las plantas y animales en sustancias simples, que pueden ser devueltas a la atmósfera, arrastradas por el agua o ser incorporada al stock de reserva mineral, otros establecen relaciones simbióticas con algunos organismos vivos (Silva, 2019).

2.2.3 Efectos reportados de la comunidad bacteriana en el suelo.

Las bacterias, proporcionan servicios fundamentales a los ecosistemas terrestres por ejemplo su capacidad para producir alimento, la fertilidad del suelo y actúan como un sumidero del CO₂, descomponedores de materia orgánica. “El aumento en la diversidad de estas comunidades puede mejorar la capacidad de los ecosistemas para proveer estos servicios, la diversidad de las bacterias se relaciona con las funciones y servicios ecosistémicos clave” (Maestre & Soliveres, 2019) por ejemplo: la captación de CO₂ y nitrógeno, mantenimiento de la fertilidad del suelo y el control biológico.

Las bacterias del suelo asociadas a las raíces de las plantas son primordiales para el funcionamiento de los ecosistemas, debido a que trabajan en la descomposición de residuos, proporcionan el crecimiento y nutrición de las plantas, están involucradas en los ciclos biogeoquímicos, son de gran importancia en el ciclo del nitrógeno y el ciclo del fósforo (Rodríguez, Rorig, & Grasso, 2013). La correlación entre variables ambientales como precipitación, temperatura y diversidad bacteriana varían en función del tipo de ecosistema, existiendo una relación positiva entre la diversidad microbiana y la provisión de funciones y servicios ecosistémicos (Ramos & Doris, 2008).

El proceso microbiano se localiza en suelos con altos contenidos de materia orgánica, la presencia de microorganismos es un indicador para evaluar beneficios de los sistemas de laboreo, y fertilidad del suelo (Hernández, Munive, Sandoval, Martínez, & Villegas, 2013).

2.3 Bosque y Vegetación Protectora Machángara Tomebamba.

Las Áreas de Bosque y Vegetación Protectora son “aquellas formaciones vegetales, naturales, cultivadas, arbóreas, arbustivas o herbáceas, de dominio público o privado, se hallan localizadas en áreas de topografía accidentada, cabeceras de cuencas hidrográficas o en zonas que por sus condiciones climáticas, edáficas e hídricas requieren de protección” (Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, 2004).

La flora característica del Bosque y Vegetación protectora Machángara es: Pumamaqui (*Oreopanax avicenniifolius*); *Baccharis caespinosa*, *B. oblongifolia* y *B.spp*; Aliso (*Alnus acuminata*); *Cleome longifolia*; Helecho (*Elaphoglossum spp*), Valeriana (*Valeriana rigida*), Nogal (*Juglans neotropica*); *Ocotea rotundata*, *Persea ferrugínea*; *Brachyotum cofertum*, *Tibouchina laxa*; *Cedrela lilloi*; *Odontoglossum gracile*; *Paspalum humboldtianum*; Gañal (*Oreocallis gradiflora*), *O. mucronata*, *Panopsis feruginea*; Guando (*Brugmansia arbórea*), Sauco (*Cestrum tomentosum*), *Solanum spp*; *Symplocos spp*. Helechos (*Polypodium spp*). *Aphelandra acanthifolia*, *A. Chrysantha*; *Sauria lehmannii*; *Bomarea comuta*, *B. betacea* y *B.spp*; *Muria simplicifolia*; Anturio (*Anthurium lennarti*), *A. marginatum*, *spp*, *O. sessiliflorum* y *O.spp*. *Shefflera spp* (Aguirre & Cáseres, 2010).

La fauna característica del Bosque y Vegetación protectora Machángara son: maníferos: Zarigueya de orejas blancas (*Didelphis pernigra*), Comadreja Andina (*Mustella frenata*) Puerco espín andino (Erethizontidae rodentia). Anfibios: Ranas (*Colostethus vertebrales*, *Gastrotheca pseustes* y *Gastrotheca litonedis*), Rana punta de flecha andina (*Hyloxalus anthracinus*). Aves: Mosquero Bermellón o Brujillo (*Pyrocephalus rubinus*), Gorrión Americano (*Zonotrichia capensis*), Jilguero Encapuchado (*Carduelis magellanica*), Pato o Cercata Andina (*Anas andium*), el Pato Rojizo Andino (*Oxyura ferrugínea*) y la focha o Gallareta Andina (*Fulica ardesiaca*), Colibrí Frentiestrella Arcoiris (*Coeligena iris*), Cinclodes Piquigruoso (*Cinclodes excelsior*), Buhito Frentienteado (*Aegolius harrisii*), Quillillicos (*Falco sparverius*), Mirlos (*Turdus chiguanco*) (Aguirre & Cáseres, 2010).

El Bosque y Vegetación Protectora Machángara-Tomebamba, se encuentra administrado por el Consejo de la Cuenca del Río Machángara, las instituciones que pertenecen a este consejo son ETAPA, Universidad de Cuenca, Ministerio del Ambiente, ELECAUSTRO S.A.

2.4 Microcuenca del Machángara.

La Microcuenca del Machángara se encuentra ubicada al Nor-Oriente de la ciudad de Cuenca, entre la provincia de Azuay y una pequeña parte en la provincia del Cañar. El área de estudio se encuentra en la Microcuenca está cercana a la represa Labrados, topográficamente toda la superficie es muy irregular, típica de la sierra ecuatoriana (Villavicencio & Chávez, 2011). Cubre un área aproximada de 324.900 hectáreas, ubicado a un rango altitudinal que va desde 2500 m.s.n.m. a 4400 m.s.n.m. (Padrón & Vázquez, 2019).

La Microcuenca cuenta con importantes áreas de vegetación nativa, que apoyan a la regularización del régimen hídrico, se encuentran dentro del área de Bosque y Vegetación Protectora Machángara-Tomebamba, debido a las características especiales de vegetación de la Microcuenca y la importancia que tiene la conservación de ésta (Borrero, 2015).

La Microcuenca del río Machángara tiene pendientes suaves y regulares a lo largo del cauce y pendientes extremas en sus laderas transversales que son zona de erosión. La vegetación está constituida por bosques de poca altura, capa de musgos densa, en la zona más alta manchas de bosques de *Polylepis* alternado con pajonal arbustivo y herbáceo (Cherrez, 2004).

Factores como la presencia de la cordillera de los Andes y la ubicación geográfica del país, origina diversos pisos-altitudinales cada uno de estos con características ecosistémicas diferentes: La influencia de las corrientes marinas hace que el Ecuador esté entre uno de los países con mayor biodiversidad del mundo, parte de esta riqueza constituyen sus bosques (Bravo, 2014). El Ecuador tiene 12 horas de luz al día, durante todo el año, esto favorece al crecimiento de especies forestales, nativas y exóticas. Estas ventajas permiten que los bosques crezcan hasta 26 mt³ por hectárea al año (Espinoza, 2014).

La mayoría de las especies arbóreas introducidas en Ecuador son los géneros *Cupressus*, *Eucaliptus* y *Pinus*, los impactos negativos que presentan estas plantaciones están relacionados con la hidrografía de los páramos y el suelo ya que alteran las condiciones edáficas y micro climáticas provocando alteración de la diversidad de la vegetación natural y su estructura (Ruizm, 2014).

2.4.1 Clima

La temperatura oscila entre los 8°C y 16°C, tiene dos periodos de precipitaciones húmedo que va de febrero a abril y uno seco que va junio a agosto, no obstante, en la parte alta de la Microcuenca hay lluvias frecuentes que provocan un clima lluvioso húmedo en esta parte (Padrón & Vázquez, 2019).

2.4.2 Uso de Suelo

En la Microcuenca del Machángara se dan dos factores que son: el uso del suelo y las condiciones ecológicas como pueden ser precipitación, temperatura y altitud. Por ello podemos encontrar parches de eucalipto, pastizal, plantaciones de *Pinus patula*, bosque andino, bosque de páramo y bosque de *Polylepis reticulata* (Padron & Vazquez, 2019).

Podemos destacar que existen 6 usos de suelo dentro de la Microcuenca del Machángara entre las cuales están: bosques, cuerpos de agua, otras tierras, tierras agropecuarias, vegetación arbustiva y herbácea y la zona antrópica, mismas que podemos ver en la ilustración 1.

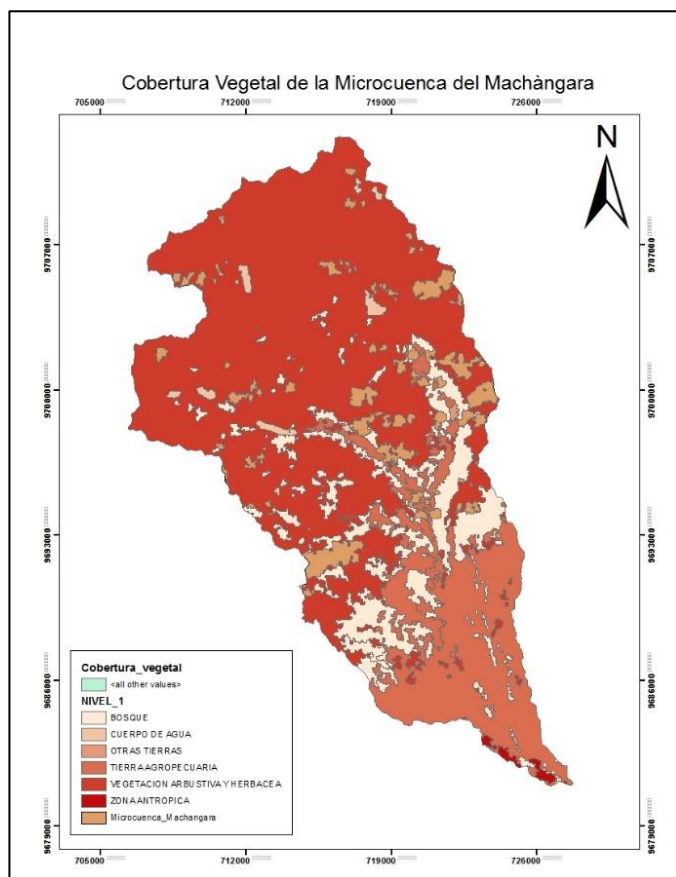


Ilustración 1 Cobertura Vegetal

Fuente. Jessica Calle.

a. Problemas ambientales de uso y cobertura de suelo dentro de la Microcuenca del Machángara.

El avance de la frontera agrícola ha reducido el área de pastos por lo que el ganado ovino y bovino actualmente se encuentre en zonas de páramo ubicadas en la cuenca alta del Machángara, las cuales soportan una creciente presión por la presencia de estos, áreas de bosques y chaparro se han incrementado lo que genera aumento en la cobertura vegetal a lo largo de la cuenca alta media y baja, no obstante, estas áreas están amenazadas por presencia de bosques de eucalipto y pino los mismos que tienen diferentes usos en actividades antrópicas. El área de centros poblados es dominante en la parte baja de la cuenca donde hay muy poca cobertura vegetal, localizada en los márgenes de los ríos y utilizada como parques lineales (Villavicencio & Chávez, 2011).

2.4.3 Hidrología

Las condiciones de biodiversidad de la vegetación nativa aportan, a la regulación del régimen hídrico, protección de las fuentes de agua, a la belleza escénica de la zona y a la estabilidad del sistema ecológico, la Microcuenca del Machángara aporta alrededor de 304,29 hectómetros cúbicos por año de agua lluvia (ETAPA EP, 2015).

El aprovechamiento del Microcuenca del Machángara es el subministro de agua para consumo humano, aporta alrededor de 1000l/s para el abastecimiento de agua potable de la ciudad de Cuenca y comunidades aledañas. La generación de energía eléctrica, se encuentran los embalses el Labrado con una reserva de agua de 6 Hm³ y el embalse de Chanlud con 17 Hm³ gracias a esto cuenta con dos centrales hidroeléctricas Saymirín y Saucay, suman una potencia instalada de 38,4 Mw el cual es integrado al sistema nacional interconectado de energía eléctrica. Es por esto que se ha considerado a la Microcuenca alta del Machángara como un ecosistema estratégico, que debe ser conservado, protegido y manejado (Ortega Guaricela, 2012).

La Microcuenca del río Machángara se encuentra en el austro ecuatoriano, dentro del sistema hidrográfico del Santiago, tiene su trayectoria oeste-este en la parte alta de la cuenca, luego cambia su trayectoria noreste-sureste en la cuenca media y baja hasta que forma parte del río Tomebamba, formando luego parte de la cuenca hidrográfica del Paute (Villavicencio & Chávez, 2011), en la Microcuenca del Machángara se encuentran 17 ríos que conforman la red hídrica de este entre los cuales encontramos los ríos Blanco, Cebadas, Chacayacu, Chamana, Checa, Chulo, Curiquinga, Gahuiña, Huagrauma, Jatunhuaycu, Machángara, Paluncay, Patamarca, Piñacocha, Quintul, Saymirín, Sinincay, mismas que se pueden observar en la Ilustración 2.

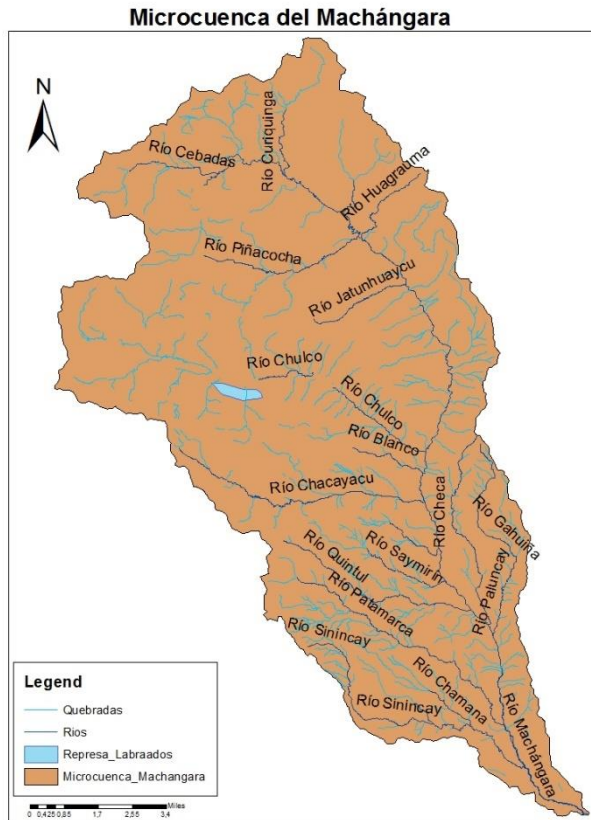


Ilustración 2 Afluentes de la Microcuenca del Machángara.
Fuente: Jessica Calle.

2.5 Bosque nativo.

El bosque nativo, es aquel que mantiene su estructura original, donde existe gran cantidad de especies endémicas locales difíciles de encontrar en otros ecosistemas, regulan el micro-clima e índices de humedad. Han sido intervenidos por el hombre para la producción de materia prima para sus actividades cotidianas.

“Ecosistema arbóreo, caracterizado por la presencia de árboles y arbustos de múltiples especies nativas, edades y alturas, regenerado por sucesión natural, con gran biodiversidad de vegetales, animales y microorganismos” (Ecuador Forestal, 2020). No obstante, gran parte del bosque primario ha sido sustituido por cultivos agropecuarios debido a la ampliación de la frontera agrícola para abastecer y satisfacer las necesidades básicas de la población.

El beneficio brindado por la conservación del bosque nativo permite regenerar o mantener activo el ciclo del agua a nivel local, la biodiversidad, y purificación del aire. (Granda, 2015).

Los parches de bosques nativos presentes dentro de la Microcuenca del Machángara, forman un dosel cerrado de entre 2 a 4 m de altura, localizados entre los 3000 y 3400m, son ecosistemas muy frágiles por ser vulnerables a la erosión que se da por estar presentes en zonas con intensas lluvias y cambios climáticos.

2.6 Bosque de Pino.

El pino (*Pinus*) fue plantado en el Ecuador en la década de 1960 por su potencial de rápido crecimiento, los réditos económicos que genera, y algunos bienes y servicios (Caranqui & Suarez, 2016). Conocido por consumir demasiada agua, lo que provoca la disminución del rendimiento hídrico, por otra parte se considera la cantidad de ligninas que tienen sus acículas, “la disminución de entrada de luz y calor provocan un efecto perjudicial sobre la actividad microbiana; por esto las tasas de descomposición son bajas, la acumulación de hojarasca vuelve a los suelos poco productivos y no se dan los procesos óptimos para el reciclaje de nutrientes del ecosistema” (Delgado & Zarate, 2002), ocasionando que la vegetación natural del área esté casi ausente (Hofstede, 2001).

Pertenece a la familia de la pináceas, normalmente alcanzan los 25m, se han adaptado a la poca disponibilidad de agua, al frío y corta duración de lluvias, a los incendios naturales ya que han desarrollado una corteza externa gruesa como defensa, son la base de soporte de los bosques del país (Chacon, Gagnon, Paré, & Proulx, 2003).

Las plantaciones de pino (*Pinus patula*) a lo largo de la Microcuenca del Machángara no reciben cuidado forestal o podas, están sobre los 3000 m.s.n.m. hay más experiencia forestal con este tipo de plantaciones que con plantaciones de bosques nativos. No obstante, está sujeto a críticas debido a su impacto negativo en el equilibrio hídrico, fertilidad de los suelos y la diversidad nativa (Padron & Vazquez, 2019).

2.7 Técnicas Tradicionales de cultivo de microorganismos.

2.7.1 Técnicas dependientes de cultivo.

De gran utilidad a la hora, de disponer de cultivos puros a partir del aislamiento de los microorganismos en cultivos selectivos, que permiten obtener mayor información morfológica, fisiológica y metabólica.

Se consideran microorganismos que “son cultivables bajo condiciones de laboratorio, aceptándose de modo general que las técnicas dependientes de cultivo tan sólo permiten recuperar aproximadamente un 1% del total de los microorganismos presentes en una muestra” (López, 2011).

2.7.2 Técnicas independientes de cultivo.

Esta técnica es utilizada para el análisis de comunidades microbianas complejas, basada en métodos moleculares de extracción de ADN y codificación de ARNr de bacterias (Valdez, 2014), es una herramienta útil a la hora de analizar la estructura de la comunidad microbiana presente en muestras ambientales sin la necesidad de antes cultivar los microorganismos en laboratorio.

Al aplicar este tipo de técnicas se ha logrado ampliar la lista de microorganismos debido a que se logra identificar especies que se hallan en concentraciones bajas dentro de la comunidad como para ser cultivadas y algunas que no crecen en condiciones de laboratorio (López, 2011).

2.7.3 Tinción de Gram.

Es una tinción diferencial, cataloga a las bacterias en dos grupos gram positivas que tienen una pared celular gruesa, las podemos identificar porque se tiñen de color azul violeta, estas no se decoloran. Las bacterias gram negativas se caracterizan por tener una pared celular delgada, se tiñen de rosado ya que ésta tiende a decolorarse (Lopez, 2014).

2.7.4 Técnica MALDITOF.

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry, es una técnica con gran potencial en microbiología ambiental, permite la identificación caracterización y comparación de microorganismos basado en el estudio de sus huellas digitales espectrales (Prince, 2014) es una técnica segura de identificación de bacterias, otra especie. Aunque la reproducibilidad de los espectros depende de las condiciones de cultivo de los microorganismos” (Maldonado, Robledo, & Robledo, 2017).

La identificación de microorganismos mediante la técnica de MALDI-TOF MS “consta de cuatro pasos: la recuperación de una colonia aislada, la realización de un espectro de masas, la comparación con la base de datos y la entrega de resultados” (García, Allende, Legarraga, Huilcaman, & Solari, 2012).

Para la identificación de bacterias mediante esta técnica se utilizan medios de cultivos sólidos con tiempo adelantado de siembra de 24 horas (Oviaño, Rodríguez, Caballero, & Muñoz, 2019).

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se aplicó metodología mixta (cuantitativa, cualitativa) orientada a caracterizar la comunidad bacteriana cultivable en los suelos de bosque nativo y bosque de pino e identificar agentes biológicos de interés en biorremediación, biotecnológicos y agrícolas.

Población: Bacterias cultivables.

Muestra: 10 kilogramos de suelo del bosque nativo y 10 kilogramos de suelo del bosque de pino.

3.1 Área de Estudio

El área de muestreo correspondió a la Microcuenca del río Machángara dentro del Bosque Protector Machángara Tomebamba, en el austro ecuatoriano. Sistema hidrográfico del Santiago, que ocupa un territorio de 32.500 hectáreas localizadas en las parroquias de Chiquintad, Checa, Sayausí, Sinincay, Ricaurte, Octavio Cordero Palacios, Sidcay, Nazón, Jerusalén, Cojitambo, Turupamba, Javier Loyola, Deleg, Solano. Específicamente en el sector Labrados donde se realizaron muestreos dentro de las parcelas (10 m²) definidas por el Proyecto CEPRA-XIII-2019-06, Cambio Climático ubicadas en el bosque Nativo y bosque de Pino.

Tabla 1 Coordenadas Geográficas del Área de Estudio.

| Coordenadas del Bosque de Pino | | Coordenadas del Bosque Nativo | |
|--------------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| X | Y | X | Y |
| 714107 | 9698250 | 714246 | 9697773 |
| 714116,4 | 9698253,36 | 714237,26 | 9697768,14 |
| 714116,4 | 9698263,36 | 714229,36 | 9697774,28 |
| 714107 | 9698260 | 714238,11 | 9697779,14 |

Fuente. Jessica Calle.

Ubicación de la Microcuenca del Machángara.

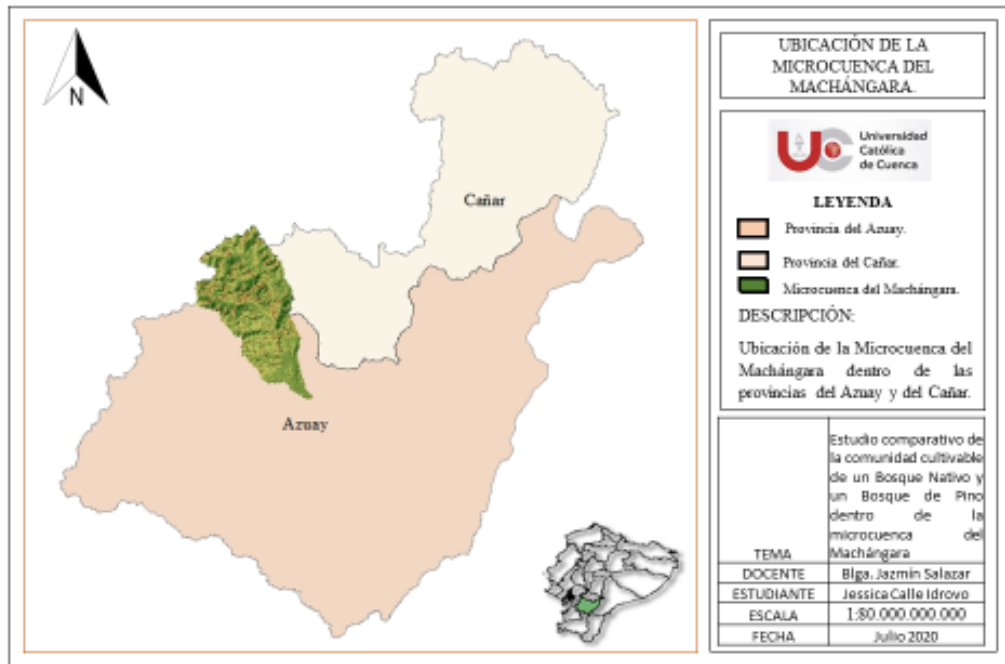


Ilustración 3. Ubicación de la Zona de la Microcuenca del Machángara.

Fuente. Jessica Calle.

Ubicación de las parcelas dentro de la Microcuenca del Machángara específicamente en el sector labrados.

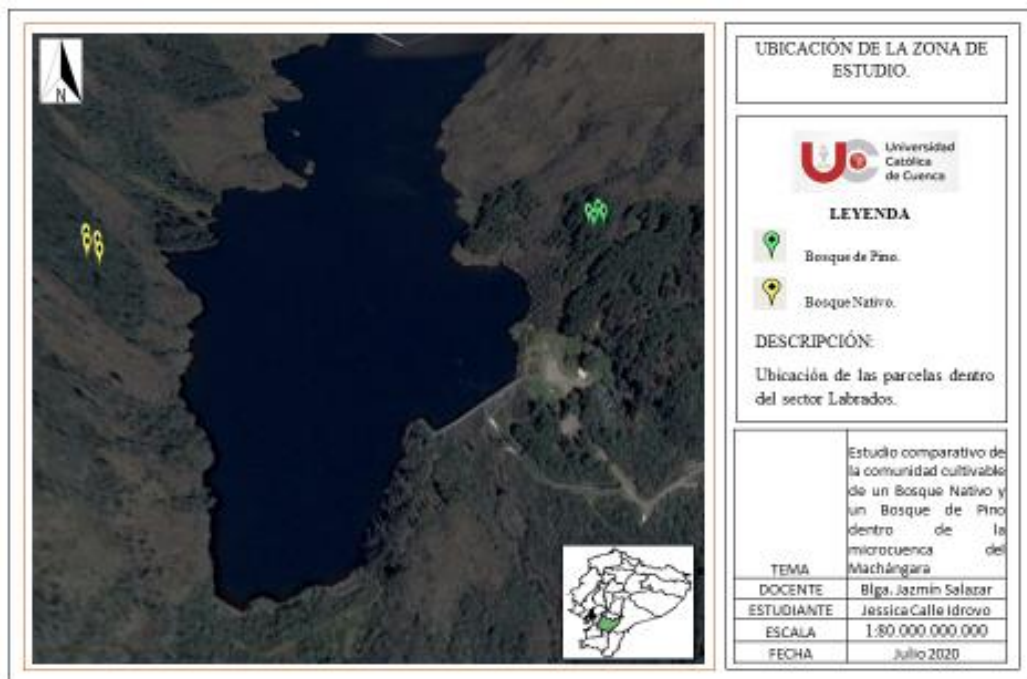


Ilustración 4. Ubicación de las parcelas en el sector Labrados.

Fuente. Jessica Calle.

3.1.1 Levantamiento planimétrico y de la cuadrícula.

En el sitio de muestro se elaboró un bosquejo para establecer la orientación cardinal, puntos GPS, dimensiones y distancias de cada una de las parcelas. Posteriormente se realizó la planimetría y ubicación de la zona de estudio, con ayuda de los softwares (Vector y ArcGIS) se diseñó la cuadrícula. Para el levantamiento de la cuadrícula o grilla en el campo, se delimitaron cada uno de los cuadrantes ver en el anexo A y B, por las características del terreno se escogió un muestreo sistemático al azar, siendo este el método adecuado para obtener una muestra compuesta y poder aislar bacterias (Schweizer, 2011).

3.1.2 Recolección y preparación de las muestras.

En cada parcela se escogió al azar 10 cuadrantes, de cada uno de ellos se removió la hojarasca y se procedió a coleccionar 1kg de suelo, a 20 cm de profundidad, debido a que esta zona tiene mayor abundancia y actividad microbiana. Con las 10 submuestras se obtuvo un total de 10kg de muestra compuesta. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT) de la Universidad Católica de Cuenca donde se realizó su procesamiento. Adicionalmente, se registraron datos de temperatura y pH (Benavides & Hermida, 2008).

Temperatura y pH.

En tabla 2 podemos observar que el suelo del bosque de pino tiene pH de 3,57 y temperatura de 12,99°C mientras que en el bosque nativo encontramos un pH de 5,63 y temperatura de 15,36°C estos bosques tienden a tener suelos con un pH ácido.

Tabla 2 pH y Temperatura.

| Nativo | | Pino | |
|--------|-------------|------|-------------|
| pH | Temperatura | pH | Temperatura |
| 4,18 | 16,3 | 3,43 | 13,15 |
| 5,97 | 15,2 | 3,78 | 12,6 |
| 6,15 | 15,2 | 3,42 | 13,4 |
| 5,82 | 14,7 | 3,57 | 13,1 |
| 6,05 | 15,4 | 3,42 | 12,7 |
| 5,63 | 15,36 | 3,57 | 12,99 |

Fuente Jessica Calle.

En el laboratorio se procedió a:

- Eliminar materiales gruesos; se separaron todos los materiales gruesos del suelo que en el campo no se separó, por ejemplo: hojas, palos pequeños e insectos.
- Reducir el tamaño de partículas; las partículas grandes del suelo fueron reducidas hasta homogenizar el tamaño de la muestra. (Félix, 2015).
- Homogenización; debe realizarse sobre una cubierta plástica para evitar posible contaminación, después de la primera mezcla al pasar el suelo por la eliminación de materiales gruesos y la pulverización es necesario rehomogenizar la muestra, ya que puede producirse segregación de partículas de diferentes tamaños.

3.1 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas

3.1.1 Cultivo y aislamiento de cepas bacterianas.

Las muestras fueron refrigeradas a 5°C durante 12 horas, temperatura recomendada para la evaluación de parámetros biológicos, si la muestra es almacenada por largo periodo de tiempo pueden ocurrir cambios en las comunidades microbianas y desarrollar condiciones anaerobias (Benavides & Hermida, 2008).

Posteriormente, se procedió al cultivo y aislamiento de bacterias bajo condiciones de laboratorio, empleando la metodología de diluciones seriadas hasta 10^{-7} y siembra en placa en superficie para el conteo. Pesando 10 g de las muestras compuestas de suelo colectadas en el campo, diluidas en 90 ml de agua destilada estéril. De estas diluciones se realizaron aislamientos por estriado sobre placas Petri que contenían medio de cultivo (agar nutritivo) y fueron incubadas a temperatura ambiente por 48 horas. Los aislamientos obtenidos se purificaron mediante siembras sucesivas, posteriormente las cepas aisladas fueron conservadas en glicerol al 15% y almacenados a 4°C (Sernaque, Cornejo, Pierre, & Mialhe, 2019).

3.1.2 Conteo de unidades formadoras de colonias.

Para el conteo de unidades formadoras de colonias se incubaron durante 48 horas las cajas Petri, luego se utilizó el método de conteo por placa empleando un contador de colonias, se elige únicamente las cajas que contengan entre 30 y 300 colonias ya que estas son las representativas para el cálculo de UFC/ml de solución (Cruz, Zamudio, Corona, González, & Rojas, 2015).

3.1.3 Caracterización morfológica y prueba GRAM de bacterias.

Las cepas bacterianas obtenidas de los aislamientos previos fueron sembradas en medio agar nutritivo para establecer morfotipos mediante una descripción morfológica.

Posteriormente, se realizó la tinción de GRAM para identificar bacterias gram negativas y gram positivas (Marín & Jaramillo, 2015).

Para confirmar la prueba de GRAM, las cepas bacterianas fueron sembradas en los siguientes medios:

- Agar Sangre, medio rico en nutrientes con un 5% de sangría, inhiben el crecimiento de bacterias gramnegativas, esto permite el crecimiento de cocos grampositivos.
- Agar Mackonkey, medio muy selectivo utilizado para el aislamiento e identificación de enterobacterias (bacilos gramnegativos) (Teomitz, 2014).

3.2 Metodología de MALDI-TOF

Para la identificación de las bacterias hasta género y especies, se seleccionaron inicialmente los morfotipos diferentes, las cepas fueron enviadas de acuerdo a las especificaciones técnicas del laboratorio para la identificación a través de la metodología MALDI-TOF, que es una técnica de espectrometría de masas basadas en ionización suave tales como la Desorción/ionización por láser asistida en matriz (Shah, Keys, Schmid, & Gharbia, 2002).

3.3 Identificación de agentes biológicos de interés ambiental

Los resultados de la identificación taxonómica de las cepas bacterianas cultivables del suelo del bosque nativo y bosque de pino fueron comparados para establecer las diferencias en cuanto a la riqueza. Además, en base a revisión bibliográfica se caracterizó la funcionalidad y posibles aplicaciones en biorremediación y biotecnología de las cepas bacterianas.

3.4 Índices de diversidad

Los índices de diversidad son un análisis de riqueza, abundancia y distribución de especies detectadas en un muestreo. Para el análisis de las bacterias aisladas del suelo de los bosques se escogió un método al azar. Los datos fueron analizados, según los siguientes índices.

3.4.1 Índice de Shannon.

“Se utiliza para cuantificar la diversidad específica, el índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores el número de especies presentes y su abundancia relativa” (Pla, 2006).

$$H = -1 \sum p_i * \ln(p_i).$$

p_i . Representa la porción de la abundancia.

i en relación a la abundancia de todas las especies detectadas en un muestreo.

El valor mínimo puede aproximarse a cero y el valor máximo en teoría no tiene límites (Carmona, 2013).

3.4.2 Índice de diversidad de Pielou.

Determina la equitatividad de la distribución de la abundancia de las especies en un ecosistema, es decir si entre las especies hay igualdad de abundancia (Sonco, 2013).

$$J = \frac{H'}{\log 2S}$$

S= Número de especies.

H'= Índice de Shannon.

3.4.3 Índice de diversidad y uniformidad de Simpson.

El índice de Simpson (D) mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar en un hábitat sean de la misma especie, es una medida de dominancia, depende de la riqueza de especies, como de la comunidad con que los individuos están distribuidos entre las especies (Ferriol & Merle, 2012).

$$D = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

Equidad.

$$\frac{D}{D_{max}} = \frac{1}{\sum p_i^2} * \frac{1}{s}$$

n= número total de organismos de una especie.

N= número total de organismos de todas las especies.

3.4.4 Índice de Sorenson Cuantitativo.

El índice de Sorenson indica si existe o no similitud entre las especies en común de los ecosistemas que se estén estudiando en este caso el bosque nativo y el bosque de pino.

$$\frac{2C}{SA + SB}$$

C= Número de especies comunes en ambas comunidades.

SA= Número de especies de la comunidad A.

SB= Número de especies de la comunidad B.

3.4.1 Índice de Sorenson Cualitativo.

Ausencia y presencia de especies en cada comunidad (Saquicela, 2010).

$$IS = \frac{2C}{A + B} * 100$$

IS: Índice de Sorenson.

A: Número de especies encontradas en la comunidad A.

B: Número de especies encontradas en la comunidad B.

C: Número de especies comunes en ambas comunidades C.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS DISCUSIÓN.

4.1 Recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

En la tabla 3 se indica el número de unidades formadoras de colonias que existe por mililitro, como se puede observar en el suelo del bosque nativo existen un 14×10^3 número de bacterias viables, en el bosque de pino 174×10^2 .

Tabla 3 UFC/ML.

| Número de Colonias | Dilución | Volumen de la simbra (ml) | UFC/ML |
|-----------------------|-----------|---------------------------|-------------------|
| Bosque Nativo | | | |
| 140 | 10^{-2} | 1 | 14×10^3 |
| Bosque de Pino | | | |
| 174 | 10^{-2} | 1 | 174×10^2 |

Fuente. Jessica Calle.


Los resultados obtenidos indican que existe mayor densidad bacteriana en el bosque nativo que en el bosque de pino, esto se puede deber a que en el bosque nativo existe mayor riqueza tanto de especies animales como vegetales, lo que concuerda con Chang et al. (2002) quien menciona que un ecosistema rico en vegetación ayuda aumentar la densidad microbiana que se encuentra en el suelo. Este estudio es soportado por Matsumoto et al. (2005) quien concluye que el crecimiento vegetal está relacionado directamente con la composición de la comunidad bacteriana y la funcionalidad de las bacterias en el suelo.

4.2 Identificación de las cepas bacterianas cultivables

4.2.1 Descripción morfológica de las bacterias


En las tablas de la 4 a la 15 se describe morfológicamente las cepas bacterianas cultivables ver anexos C y D, aisladas e identificadas mediante la técnica MALDI-TOF ver anexo E.

Tabla 4 *Aeromonas encheleia*.

| Cepa Bacteriana Bosque Nativo y Bosque de Pino. | |
|--|--|
| Nombre Científico: <i>Aeromonas encheleia</i> . |  |
| Familia: Aeromonadaceae. | |
| Genero. <i>Aeromonas</i> . | |
| Especie: <i>encheleia</i> . | |
| Morfología. Bacterias gram negativas, forman colonias grandes, con superficie convexa, forma circular, bordes redondeados, aparenta un color crema brillante. | |


Fuente Jessica Calle.

Tabla 5 *Buttiauxella ferruguliae*.

| Cepa Bacteriana Bosque Nativo. | |
|--|---|
| Nombre Científico: <i>Buttiauxella ferruguliae</i> . |  |
| Familia. Enterobacteriaceae. | |
| Genero. <i>Buttiauxella</i> . | |
| Especie. <i>ferruguliae</i> . | |
| Morfología. Bacterias gram negativas, forman colonias pequeñas, con superficie plana, forma irregular, bordes redondeados, aparenta un color crema opaco. | |


Fuente Jessica Calle.

Tabla 6 *Buttiauxella gaviniae*.

| Cepa Bacteriana Bosque Nativo. | |
|--|--|
| Nombre Científico: <i>Buttiauxella gaviniae</i> . |  |
| Familia: Enterobacteriaceae. | |
| Género: <i>Buttiauxella</i> . | |
| Especie: <i>gaviniae</i> . | |
| Morfología. Bacterias gram negativas, forman colonias grandes, con superficie plana, forma circular, bordes ondulados, aparenta un color crema opaco. | |


Fuente Jessica Calle.

Tabla 7 *Yersinia enterocolitica*.

| Cepa Bacteriana Bosque Nativo. | |
|--|--|
| Nombre Científico: <i>Yersinia enterocolitica</i> . |  |
| Familia: Yersiniaceae. | |
| Género: <i>Yersinia</i> . | |
| Especie: <i>enterocolitica</i> . | |
| Morfología. Bacterias gram negativo, forman colonias grandes, con superficie plana convexa, forma fusiforme, bordes ondulados, aparenta un color crema brillante. | |

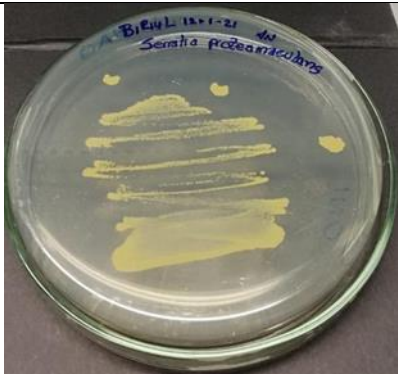
Fuente Jessica Calle.

Tabla 8 *Paenibacillus stellifer*.

| Cepa Bacteriana Bosque Nativo. | |
|--|---|
| Nombre Científico: <i>Paenibacillus stellifer</i> |  |
| Familia. Paenibacillaceae. | |
| Genero. <i>Paenibacillus</i> . | |
| Especie. <i>stellifer</i> . | |
| Morfología. Bacterias gram negativo, forman colonias grandes, con superficie plana convexa, forma fusiforme, bordes ondulados, aparenta un color crema brillante. | |

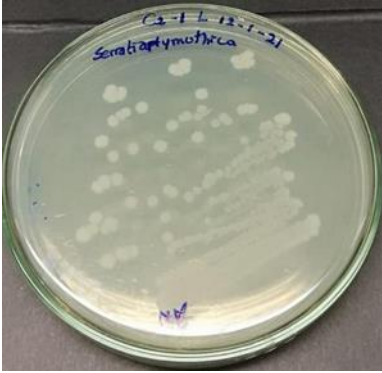
Fuente Jessica Calle.

Tabla 9 *Serratia proteamaculans*.

| Cepa Bacteriana Bosque Nativo. | |
|--|--|
| Nombre Científico: <i>Serratia proteamaculans</i> . |  |
| Familia. Yersiniaceae. | |
| Genero. <i>Serratia</i> . | |
| Especie. <i>proteamaculans</i> . | |
| Morfología. Bacterias gram negativas, forman colonias grandes, con superficie plana, forma irregular, bordes onduladas, aparenta un color marrón brillante. | |


Fuente Jessica Calle.

Tabla 10 *Serratia plymuthica*.

| Cepa Bacteriana Bosque Nativo. | |
|--|--|
| Nombre Científico: <i>Serratia plymuthica</i> . |  |
| Familia. Yersiniaceae | |
| Genero. <i>Serratia</i> | |
| Especie. <i>plymuthica</i> | |
| Morfología. Bacterias gram negativas, forman colonias medianas, con superficie plana convexa, forma irregular, bordes ondulados, aparenta un color crema brillante. | |


Fuente Jessica Calle.

Tabla 11 *Bacillus muralis*.

| Cepa Bacteriana Bosque Pino. | |
|--|---|
| Nombre Científico: <i>Bacillus muralis</i> . |  |
| Familia. Bacillaceae | |
| Genero. <i>Bacillus</i> | |
| Especie. <i>muralis</i> | |
| Morfología. Bacterias gram positivo, forman colonias grandes, con superficie plana, forma fusiforme, bordes ondulados, aparenta un color crema opaco. | |


Fuente Jessica Calle.

Tabla 12 *Mycobacterium sp.*

| Cepa Bacteriana Bosque de Pino. | |
|---|---|
| Nombre Científico: <i>Mycobacterium</i> |  |
| Familia: Mycobacteriaceae. | |
| Genero. <i>Mycobacterium</i> | |
| Especie. <i>mycobacterium</i> | |
| Morfología. Bacterias gram positivas, forman colonias medianas, con superficie plana, forma fusiforme, bordes redondeados, aparenta un color amarillo opaco. | |


Fuente Jessica Calle.

Tabla 13 *Yersinia kristensenii*.

| Cepa Bacteriana Bosque de Pino. | |
|---|--|
| Nombre Científico: <i>Yersinia kristensenii</i> . |  |
| Familia. Yersiniaceae. | |
| Genero. <i>Yersinia</i> . | |
| Especie. <i>kristensenii</i> . | |
| Morfología. Bacterias gram negativo, forman colonias medianas, con superficie plana convexa, forma irregular, bordes ondulados, aparenta color blanco opaco. | |


Fuente Jessica Calle.

Tabla 14 *Bacillus pumillus*.

| Cepa Bacteriana Bosque Pino. | |
|--|---|
| Nombre Científico: <i>Bacillus pumillus</i> . |  |
| Familia. Bacillaceae. | |
| Genero. <i>Bacillus</i> . | |
| Especie. <i>pumilus</i> . | |
| Morfología. Bacterias gram positivo, forman colonias pequeñas, con superficie plana convexa, forma fusiforme, bordes ondulado, aparenta un color blanco semitransparente. | |

Fuente Jessica Calle.

Tabla 15 *Aeromonas molluscorum*.

| Cepa Bacteriana Bosque Pino. | |
|---|---|
| Nombre Científico: <i>Aeromonas molluscorum</i> . |  |
| Familia. Aeromonadaceae. | |
| Genero. <i>Aeromonas</i> . | |
| Especie. <i>molluscorum</i> . | |
| Morfología. Bacterias gram negativas, forman colonias grandes, con superficie convexa, forma irregular, bordes lobulados, aparenta color palo de rosa brillante. | |

Fuente Jessica Calle.

En el bosque nativo las bacterias aisladas son 100% gram negativas mientras que en el bosque de pino encontramos el 50% de bacterias gram negativas y el 50% de bacterias gram positivas, un estudio realizado en bosque de pino revela la presencia de bacterias gram negativas a cuyos géneros se les atribuye la capacidad de fijar nitrógeno y solubilizar fosforo (Teomitz, 2014).

4.2.1 Identificación d las cepas bacterianas cultivables mediante la técnica MALDI-TOF.

Se aislaron un total de 40 cepas bacterianas de las cuales 25 pertenecen al bosque nativo y 15 al bosque de pino, mediante la técnica MALDI-TOF se agruparon en 12 especies descritas en la tabla 16.

Tabla 16 Especies de bacterias cultivables del suelo de un bosque nativo y bosque nativo en la Microcuenca del Machángara.

| Nombre Científico | Número de cepas | Bosque Nativo | Bosque de Pino |
|---------------------------------|-----------------|---------------|----------------|
| <i>Aeromonas encheleia</i> | 21 | 16 | 5 |
| <i>Buttiauxella ferraguliae</i> | 1 | 1 | 0 |
| <i>Buttiauxella gaviniae</i> | 2 | 2 | 0 |
| <i>Yersinia enterocolítica</i> | 3 | 3 | 0 |
| <i>Paenibacillus stellifer</i> | 1 | 1 | 0 |
| <i>Bacillus pumillus</i> | 3 | 0 | 3 |
| <i>Aeromonas molluscorum</i> | 2 | 0 | 2 |
| <i>Bacillus muralis</i> | 3 | 0 | 3 |
| <i>Micobacterium sp.</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Yersinia kristensenii</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Serratia proteamaculans</i> | 1 | 1 | 0 |
| <i>Serratia plymuthica</i> | 1 | 1 | 0 |
| Total. | 40 | 25 | 15 |

Fuente. Jessica Calle.

En la tabla 16 podemos observar que la especie más abundante y la única que se encuentra presente en los dos bosques es la *Aeromonas encheleia* con 16 y 5 cepas respectivamente. En el bosque nativo la segunda especie más abundante fue *Yersinia enterocolítica*, seguida de *Buttiauxella gaviniae*, *Buttiauxella ferraguliae*, *Paenibacillus stellifer*, *Serratia proteamaculans*, *Serratia plymuthica* obteniendo un total de 7 especies registradas. En el bosque de pino se registraron 5 especies exclusivas entre las cuales

podemos encontrar, *Bacillus pumillus*, *Aeromonas molluscorum*, *Bacillus muralis*, *Micobacterium sp*, *Yersinia kristensenii*.

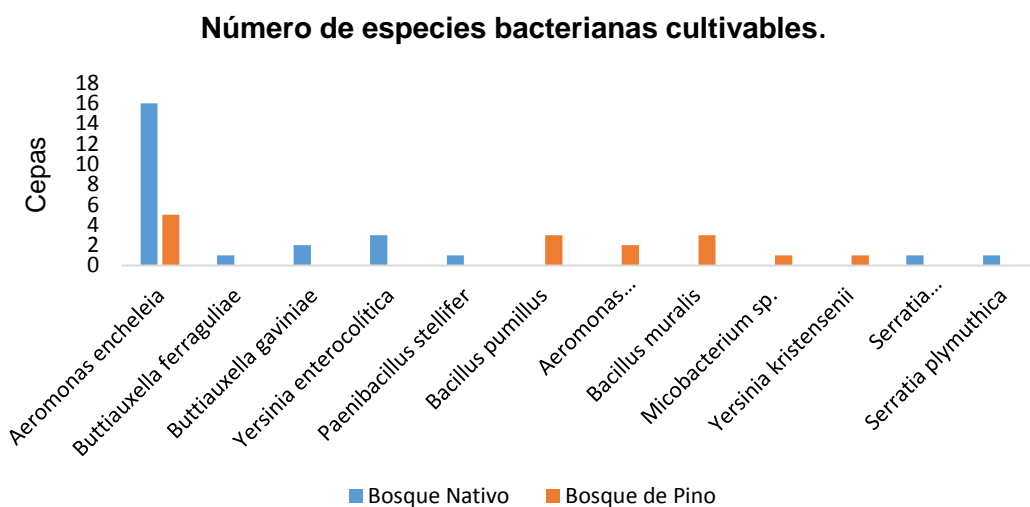


Ilustración 5 Abundancia de las especies en el bosque nativo y bosque de pino.

Fuente Jessica Calle.

Las bacterias identificadas se pudieron agrupar en 6 familias en el bosque de pino y nativo (tabla 17), en el caso de la familia Yersiniaceae se registrarón cuatro especies, de las familias Aeromonadaceae, Bacillaceae, Enterobacteriaceae se registraron dos especies de cada una respectivamente y una sola especie de las familias Mycobacterium, y Paenibacillaceae.

17 Familias de Bacterias.

| Familia | Especies |
|--------------------|----------------------------------|
| Aeromonadaceae | <i>Aeromonas encheleia.</i> |
| | <i>Aeromonas molluscorum.</i> |
| Enterobacteriaceae | <i>Buttiauxella ferraguliae.</i> |
| | <i>Buttiauxella gaviniae.</i> |
| Paenibacillaceae | <i>Paenibacillus stellifer.</i> |
| Bacillaceae | <i>Bacillus pumillus.</i> |
| | <i>Bacillus pumillus.</i> |
| Mycobacterium | <i>Mycobacterium sp.</i> |
| Yersiniaceae | <i>Yersinia kristensenii.</i> |
| | <i>Serratia proteamaculans.</i> |
| | <i>Serratia plymuthica.</i> |
| | <i>Yersinia enterocolitica.</i> |

Fuente Jessica Calle.

En función de lo planteado, mediante técnicas dependientes de cultivo, se lograron aislar y purificar 12 especies bacterianas, que se agruparon en 6 familias (Tabla 16). La familia Aeromonadaceae representada por dos especies la *A. encheilia* y *A. molluscorum*, la última especie es importante en procesos de remediación ambiental de áreas contaminadas por TBT (Tribulytin)¹, usado por estas bacterias como fuente de carbono. Además, se evidenció que, al inocular cepas de este género en suelos contaminados, no se afecta la comunidad bacteriana existente (Cruz, Henriquez, Correia, Suzuki, & Mendo, 2010) . En cuanto a la *A. encheilia*, se caracteriza por la capacidad de degradar nitratos a nitritos. Sin embargo, estos géneros de Aeromonas son citados como patógenos y se pueden encontrar en restos de alimentos, en excrementos de animales, en el suelo, cuerpos de agua, entre otros. Estudios sugieren que puede encontrarse en el tracto digestivo de los animales (Latif, 2015, Jada, et al. 1996 y Cazares, 2019). Lo que sustenta el registro de *A. encheilia*, en ambos bosques, que al encontrarse en la misma zona y tener conectividad pueden ser visitados por la fauna habitual de estos ecosistemas.

La familia Bacilleceae en su mayoría tienen la capacidad de desintegrar proteínas, enzimas proteasas y juegan un papel importante en el ciclo del nitrógeno que contribuye a la fertilidad del suelo (Aslim et al. 2002), dentro de esta familia bacteriana se encontraron dos especies: *B. pumilus*, que ha sido reportada por varios autores por ser potencialmente biodegradadora de HAP (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) importantes contaminantes ambientales que afectan a la salud humana y vegetal (Khanna et al. 2014, Hernández et al. 2017 y Toledo et al. 2005) , estos autores consideran que la actividad microbiana es importante para la degradación de los HAP ya que usan estos contaminantes como principal fuente de carbono, por tanto, representan una solución potencial a los problemas medioambientales que estos contaminantes producen. Por otra parte, *B. muralis* es una cepa bacteriana caracterizada por crecer en suelos con alto contenido de mercurio, sin embargo, también ha sido reportada por el beneficio que aporta en el crecimiento vegetal, no obstante, ha sido poco estudiada (Yadav et al. 2016 y Calzada, 2016).

Dentro de la familia Mycobacterium se registró una sola especie *Mycobacterium.sp.*, de interés en biorremediación por su capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (Boldrin, Tiehm, & Fritzsche, 1993).

Dentro de la familia de las Paenibacillaceae se identificó la bacteria *P. stellifer* es una bacteria patógena de origen ambiental que causa infecciones humanas (Heggendorrn et al. 2019). Sin embargo, en la investigación realizada por Jin et al. (2011) mostraron la

¹ Hidrocarburo policíclico.

capacidad de fijación de nitrógeno de esta especie que fue aislada de la rizosfera de diferentes plantas.

Se identificaron cuatro especies dentro de la familia Yersiniaceae, las bacterias *S. plymutica* y *S. proteamaculans*, capaces de promover el crecimiento y la salud de la planta, demuestra actividades antifúngicas, tienen un papel potencial en biotecnología ya que son utilizadas como agente de control biológico, juegan un papel clave en entornos agrícolas. (Vleeschauwer & Monica, 2007, Berg, 2000 y Benhamou et al. 1999) *Y. enterocolitica* y *Y. kristensenii* se caracterizan por ser patógenos que afectan a la salud humana y animal aisladas de eses de ovinos (Zamora et al. 1997 y Borie et al. 1996)

Dentro de la familia Enterobacteriaceae se identificaron dos especies *B.gaviniae*, *B.ferruguliae* que al igual que algunas especies mencionadas anteriormente se caracterizan por ser patógenos, probablemente son transportadas por animales, estas dos especies son muy poco estudiadas (Ferragup et al. 1981 y Lauková et al. 2018). También se les atribuye ser fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato según el estudio de quien aisló géneros de esta familia en un bosque de pino.

En el caso de las especies de bacterias que se han identificado como degradadoras de hidrocarburos, no se las puede relacionar directamente con su funcionalidad en el suelo del bosque de pino del que fueron aisladas, sin embargo, se las puede asociar al requerimiento de un pH ácido, bacterias acidófilas, que encuentran en este suelo las condiciones propicias para su desarrollo (pH 3). Sin descartar que pudieran estar cumpliendo otros roles en la dinámica del suelo de este ecosistema.

Por otra parte, las especies que se les atribuye un rol en el ciclo del nitrógeno, y aportes en el crecimiento vegetal, fueron registradas en el bosque nativo, cuyo suelo presenta un pH cercano a 6, que según (Prosser, 1989) estaría dentro del rango óptimo para el desarrollo de bacterias nitrificantes. Sumado a esto la diversidad de flora dentro de este ecosistema que amplía la posibilidad de la asociación planta-bacteria.

Algunas de las especies registradas en este estudio, perteneces a los géneros bacterianos más estudiados para procesos de biorremediación (*Bacillus*, *Serratia*) (Castillo, More, Cornejo, Ponce, & Mialhe, 2020).

4.3 Diversidad de bacterias presentes en el bosque nativo y bosque de pino de la Microcuenca del Machángara

Los valores que se presentan en la tabla 18, indican la relación o diferencia entre los bosques, riqueza, abundancia y los índices de diversidad, equidad y dominancia de las bacterias ver anexo F.

Los mayores valores de abundancia se presentaron en el bosque nativo con 25 cepas bacterianas, en el bosque de pino se registraron 15 cepas. En cuanto a la riqueza existió diferencia debido a que en el bosque nativo se encontraron 7 especies y en el de pino 6, lo que representa que el 15,38% de especies se comparten según el valor del índice de Sorenson cualitativo.

El índice de Shannon (H) presentó valores entre 1,2571 en el bosque nativo y 1,6397 en el bosque de pino revelando que estos bosques son poco diversos con respecto a las bacterias cultivables. Los valores del índice de Simpson 0,32 y 0,65 respectivamente, indican que en el bosque pino existe dominancia de especies bacterianas cultivables en las muestras analizadas.

El índice de Pielou (J) presentó valores entre 0,646 y 0,9151 respectivamente, esto indica que hay una distribución uniforme ver anexo F.

Tabla 18 Índices de Diversidad específica.

| Bosque | Riqueza | Abundancia | Shannon (H) | Pielou (J) | Simpson (D) | Sorenson cualitativo |
|--------|---------|------------|-------------|------------|-------------|----------------------|
| Nativo | 7 | 25 | 1,2571 | 0,646 | 0,32 | |
| Pino | 6 | 15 | 1,6397 | 0,915 | 0,65 | |
| — | — | — | — | — | — | 15,38% |

Fuente Jessica Calle.

Estos resultados permiten determinar la composición de la comunidad bacteriana en ambos bosques, misma que difiere en cuanto a la abundancia de especies que la conforman, presentado un mayor número de bacterias en el bosque nativo, lo que concuerda con el estudio realizado por (Melgarejo, 2003) donde los resultados indican que la mayor población de bacterias se desarrolló bajo la cubierta de un bosque nativo que en el bosque de *Pinus patula* y *Eucalyptus globulus*. Según se registró mayor cantidad de bacterias en un bosque seco que en un (Meriles, y otros, 2009) sistema silvopastoril y pastizal, hallazgos que reflejan que el cambio del uso del suelo disminuye la diversidad bacteriana o juega un rol importante en la composición de la comunidad bacteriana y para la abundancia.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

El presente estudio pone en evidencia la falta de información sobre el rol de las bacterias en la dinámica ecosistémica, sin embargo, existen investigaciones que nos permiten concluir sobre el uso potencial de las bacterias en procesos de biorremediación.

Se aislaron un total de 40 cepas puras de las cuales 25 pertenecen al bosque nativo y 15 al bosque de pino lo que determina diferencia en la abundancia de cepas bacterianas cultivables entre los bosques. Mediante la técnica MALDITOF se logró identificar 12 especies bacterianas de las cuales 7 se encuentran en el bosque nativo y 6 en el bosque de pino haciendo énfasis en que una sola especie (*A.enchelia*) se identificó en los dos bosques.

La revisión bibliográfica permitió determinar el uso potencial de las bacterias aisladas, estableciendo que en el suelo del bosque de pino existe mayor presencia de bacterias de interés ambiental que podrían ser de utilidad en procesos de biorremediación de suelos con presencia de hidrocarburos o excesivo uso de agroquímicos. Así como, en el tratamiento de aguas residuales.

En el bosque nativo se identificaron especies capaces de promover el crecimiento y salud de la planta, ya que se las atribuye la capacidad de fijar nitrógeno y solubilizar fosfato por lo que su uso potencial será como bioestimulante en la agricultura. No obstante, se identificó la presencia de especies bacterianas patógenas, esto responde a que en el bosque nativo podría existir mayor presencia de fauna que podrían ser portadores.

CAPÍTULO VI

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios de las cepas bacterianas identificadas con el objetivo de valorar la efectividad y eficiencia de estas bacterias orientadas a biorremediación y agricultura.
- Realizar nuevos muestreos en diferentes zonas para ampliar el cerapio de bacterias que tiene el laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT) de la Universidad Católica de Cuenca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, O., Wagner, P., & Pocasangre, L. (2006). *La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de los suelos*. San Jose_ Costa Rica.
- Aguilera, S. M. (2000). *Importancia de la proteccion de la materia orgánica en Suelos*. Santiago de Chile.
- Aguirre, M. C., & Cáseres, M. M. (2010). *Inventario de atractivos turisticos en cinco áreas de bosques y vegetación protectores en la Provincia del Azuay*. Cuenca-Ecuador.
- Alvarez, V., Cardozo, A., Mujtar, V., & Tiftonell, P. (2018). *El universo escondido bajo nuestros pies: la importancia de conocer y preservar los organismos del suelo*.
- Aslim, B., Saglam, N., & Beyatli, Y. (2002). Determination of some properties of Bacillus isolated from soil. *Turkish Journal of Biology*, 26(1), 41-48.
- Benavides, G., & Hermida, A. M. (2008). *Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz Verde y Guasca*. Bogotá.
- Benhamou, N., Gagné, S., Quéré, D., & Dehbi, L. (1999). Bacterial-Mediated Induced Resistance in Cucumber: Beneficial Effect of the Endophytic Bacterium *Serratia plymuthica* on the Protection Against Infection by *Pythium ultimum*. *Biochemistry and Cell Biology*, 12.
- Berg, G. (2000). Diversity of antifungal and plant-associated *Serratia plymuthica* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 9.
- Boldrin, B., Tiehm, A., & Fritzsche, C. (1993). Degradation of Phenanthrene, Fluorene, Fluoranthene, and Pyrene by a Mycobacterium sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 4.
- Borie, C., Jara, M., Sanchez, M., San Martin, B., Arellano, J., Martinez, J., & Prado, V. (1996). *Aislamiento y Caracterización de Yersinia enterocolitica de cerdos y bovinos en Chile. Isolation and characterization of Yersinia enterocolitica from Swine and Cattle in Chile*. Santiago, Chile.
- Borrero, A. (Abril de 2015). *elecaustro.com.ec*. Obtenido de http://www.elecaustro.com.ec/jdownloads/HISTRICO%20CONSEJO%20DE%20L A%20CUENCA%20DEL%20MACHNGARA/historico_cuenca_del_ro_machngara_a bril_2015.pdf
- Bravo, V. E. (2014). *La biodiversidad en el Ecuador*. Cuenca.
- Calvo, P., Meneses, L., & Zuñiga, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *SciELO*, 8.

- Cando, R. M. (Septiembre de 2011). UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE-CUENCACARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniero Ambiental TÍTULO: "DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE UN PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS". Cuenca, Azuay, Ecuador.
- Caranqui, J., & Suarez, D. (2016). *Análisis de la regeneración natural después de la explotación de pino en el páramo de Tamboloma*. Tungurahua-Ecuador.
- Carmona, G. V. (2013). *La diversidad de los análisis de diversidad*. Los Angeles.: Carmona-Galindo, Víctor D. and Carmona, Tizziana V., "La Diversidad de los Análisis de Diversidad La Diversidad de los Analisis de.
- Castillo, R. R., More, C. F., Cornejo, L. T., Ponce, F., & Mialhe, M. E. (2020). Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en Condorcanqui-Amazonas-Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 215-225.
- Chacon, G., Gagnon, D., Paré, D., & Proulx, D. (2003). Impacto de la deforestación, pastizales, plantaciones de eucalipto y pino en suelos de bosque montano alto, en la sierra sur del Ecuador. *Revista de investigaciones de la Universidad del Azuay*, 11.
- Chang, S. X., Amatya, G., Beare, M. H., & Mead, D. J. (2002). *Agroforestry systems*, 54(2), 137-147.
- Cherrez, J. J. (2004). *Evaluación del proyecto: desvío del río Machángara en el sector de Sucay*. Cuenca.
- Corrales, L., Antolinez, D., Bohorquez, J., & Vargas, A. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *SIELO*, 27.
- Cruz, A., Henriquez, I., Correia, A., Suzuki, S., & Mendo, S. (2010). *Aeromonas molluscorum* Av27: A Potential Natural Tool for TBT Decontamination. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants*, 10.
- Cruz, L. M., Zamudio, M. M., Corona, C. A., González, d. I., & Rojas, H. R. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 99-115.
- D'Costa, V., Griffiths, E., & Wright, G. (2007). Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *ELSEVIER*, 9.
- Delgado, M. (2019). *Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal*. Colombia. Obtenido de https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Los_microorganismos_del_suelo_en_la_nutrici%C3%B3n_vegetal.
- Delgado, O., & Zarate, E. (2002). Páramos del Azuay y del Cañar. *Revista de la Universidad del Azuay*, 28.

- Dublán, O. (2016). *Guía pedagógica de microbiología general*. Mexico.
- Ecuador Forestal. (05 de Mayo de 2020). [ecuadorforestal.org](https://ecuadorforestal.org/informacion-s-f-e/bosque-forestal/bosque-nativo/). Obtenido de <https://ecuadorforestal.org/informacion-s-f-e/bosque-forestal/bosque-nativo/>
- Effron, D. N., Sarti, G. C., Quinteros, M. C., & Catán, S. I. (2012). Influencia de especies arbóreas implantadas sobre parámetros biológicos y bioquímicos en un suelo forestal de Chubut, Argentina. *Información tecnológica*, 87-92.
- Empresa de Telecomunicaciones, Agua Potable, Alcantarillado y saneamiento de Cuenca . (2015).
- Espinoza, O. R. (2014). *El fomento de plantaciones forestales comerciales en el Ecuador en el período 2006-2012*. Quito.
- Félix, H. J. (2015). *Técnicas de Caracterización de suelos y abonos orgánicos*,. Mexico.
- Ferragup, C., Iazard, D., Gavinp, F., Lefebvre, B., & Leclerc, H. (1981). *Buttiauxella*, a New Genus of the Family Enterobacteraceae. *Fancia: Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 2*, 33-44 (1981).
- Ferriol, M. M., & Merle, F. H. (2012). *Los componentes alfa, beta y gamma de la diversidad. Aplicación al estudio de comunidades vegetales*. Valencia.
- García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., & Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *scielo*, 10.
- Garzón, L. P. (09 de Noviembre de 2016). Importancia de las Micorrizas Arbusculares (Ma) para un uso sostenible del suelo en la amazonia. *Luna azul*, (42), 217-234.
- Granda, M. J. (2015). *Análisis socio-ambiental en doce parroquias amazónicas de Ecuador y su relación con actividades de conservación de bosques nativos*. Quito-Ecuador: <https://repositorio.uide.edu.ec/handle/37000/738>.
- Guzmán, G. (2018). *Fertilizante ecológico G-DM: Una alternativa para tu cultivo*. Oaxaca.
- Hernández, L., Munive, J., Sandoval, E., Martínez, D., & Villegas, M. (2013). Efecto de las prácticas agrícolas sobre las poblaciones bacterianas del suelo en sistemas de cultivo en Chihuahua, Mexico. 3.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN. (2016).
- Izquierdo, R., & Venegas, S. (2013). *La materia organica del suelo. Papel de los microorganismos*.
- Jiménez, C. A. (2017). *Evaluación de la diversidad y abundancia microbiana en suelos manejados bajo dos sistemas de producción contrastantes, dedicados al cultivo de trigo en el sur del Ecuador, mediante un análisis metagenómico*. Cuenca.
- Jin, H., Tu, R., Xu, F., & Chen, S. (2011). 8.

- Khanna, P., Goyal, D., & Khanna, S. (2014). Polycyclic aromatic compounds. *Taylor & Francis*, 16.
- Latif, F. (2015). *Aeromonas, un microorganismo ambiental de importancia en la salud humana y ambiental*. Tarragona_Cataluña_España.
- Lauková, A., Pogány, M., Kubašová, I., Miltko, R., Belžeck, G., & Stropfová, V. (2018). *Sensitivity to antimicrobials of faecal Buttiauxella spp. from roe and red deer (Capreolus capreolus, Cervus elaphus) detected with MALDI-TOF mass spectrometry*. Eslovaquia: Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 21, No. 3 (2018), 543–547.
- Lewis, K. (12 de Mayo de 2013). *PubMed.gov*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23629505/>
- Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre. (10 de Septiembre de 2004). Registro Oficial Suplemento# 418. Quito, Ecuador: H. CONGRESO NACIONAL.
- López, M. M. (2011). *Identificación y caracterización de comunidades microbianas presentes en pinturas sobre lienzo. Estudio de su capacidad como agentes de biodeterioro*. España.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). *Biología de los microorganismos*. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, S.A., 2009 ISBN: 978-84-7829-136-6 Materia: 579, Microbiología.
- Maestre, F., & Soliveres, S. (2019). *Diversidad microbiana de suelos áridos*. España.
- Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2017). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Scielo*, 11.
- Marín, L. F., & Jaramillo, B. (2015). Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina.
- Matsumoto, L. S., Martines, A. M., Albino, U. B., Brasil, C. B., Saridakis, D. P., & Andrade, G. (2005). Interactions among functional groups in the cycling of, carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. *Applied Soil Ecology*, 57-65.
- Melgarejo, S. M. (2003). Estudio de la población de hongos y bacterias en un suelo granítico de la octava región bajo tres cubiertas vegetales. Concepción.
- Meriles, J. M., Gil, S. V., Conforto, C., Figoni, G., Lovera, E., March, G. J., & Guzman, C. A. (2009). Soil microbial communities under different soybean cropping systems: characterization of microbial population dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acid profiles. *Soil and Tillage Research*, 103(2), 271-281.
- Moreno, J., Garcia, J. L., Pascual, J. A., & Bernal, M. P. (2013). *De residuo a recurso: El camino hacia la sostenibilidad residuos orgánicos, residuos agrícolas*. Madrid-España.

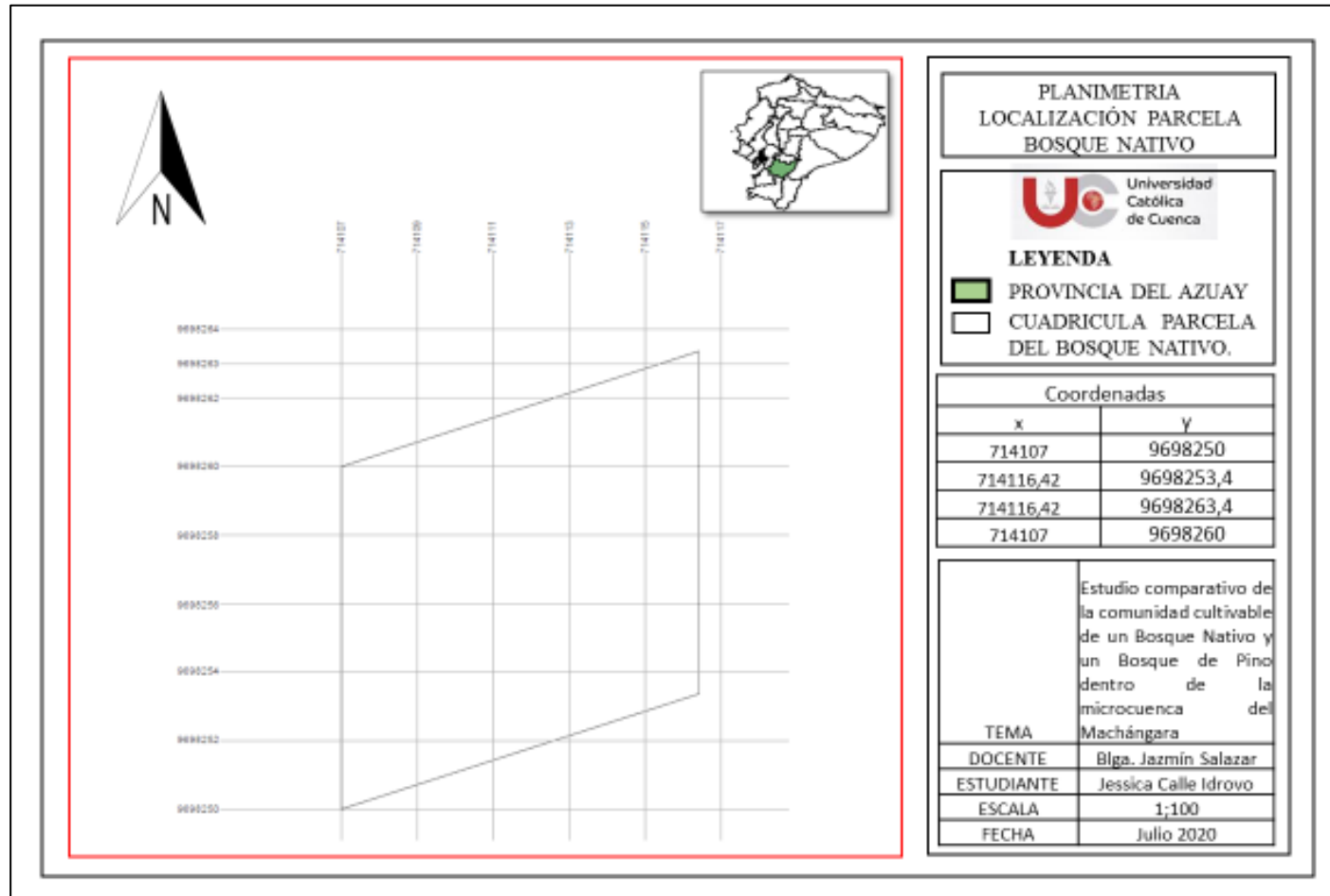
- Navarro, P. D. (25 de Octubre de 2018). Estudio de los procesos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados con pesticidas.
- Normalización, I. E. (s.f.).
- Ñustez, C. D. (Mayo de 2012). Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible.
- Ortega Guaricela, H. E. (2012). Elaboración de mapas tipo atlas para la subcuenca del río machángara. Cuenca.
- Oviaño, M., Rodríguez, B., Caballero, J., & Muñoz, J. (2019). Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en microbiología clínica 2019 .
- Padron, S. D., & Vazquez, S. O. (2019). *Caracterización y zonificación de la microcuenca del río Machángara para estudios de procesos biogeoquímicos e isotopos estables de carbono, nitrógeno, hidrógeno y oxígeno*. Cuenca-Ecuador.
- Padrón, S. D., & Vázquez, S. O. (2019). Caracterización y zonificación de la microcurna del río Machángara para estudios de procesos biogeoquímicos e isótopos estables del carbono, nitrógeno, hidrogeno y oxígeno. Cuenca, Azuay, Ecuador.
- Perez, C. M. (2001). *Cultivo y crecimiento de los microorganismos*.
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *redalyc*, 9.
- Prince, M. C. (2014). Técnicas de cultivo y moleculares para el estudio de las cominidades microbianas en aguas hospitalarias. España.
- Prosser, J. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Microb Physoil*, 125-181.
- Ramos, E., & Doris, Z. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH, del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *SCIELO*, 8.
- Ramos, V. E., & Zúñiga, D. D. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada*, 123-130.
- Recharte, P. D. (2015). *Evaluación de microorganismos eficientes autóctonos en el rendimiento del cultivo de tomate (Lycopersicum esculentum, Mill) en San Gabriel-Abancay*. Abancay-Apurímac-Perú.
- Rodríguez, A., Rorig, M., & Grasso, D. (2013). *Efecto de los cultivos de cobertura sobre la diversidad funcional bacteriana del suelo*. Buenos Aires.
- Ruizm, J. J. (2014). *Impacto de la forestación con pino (Pinus patula schiede ex schltld.& Cham.) sobre la diversidad vegetal y los suelos en el páramo de mucubají, parque nacional sierra nevada*. Mérida.
- Saquicela, C. J. (2010). *Análisis preliminar de riqueza y diversidad de lepidópteros diurnos promisorios andina de la cuenca alta y media de Río Paute*. Cuenca.

- Schmeisser, C., Steele, H., & Streit, W. (2007). *Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes*. Springer.
- Schweizer, S. (2011). *Muestreo y Análisis de suelo para diagnóstico de fertilidad*. San José de Cosata Rica.
- Sepúlveda, V. A., González, E., & Inostroza, C. (18 de Enero de 2012). Remediación de la contaminación por nitratos en el suelo: antecedentes generales y pertinencia en zona sur de Chile. *Gestión Ambiental*, 13-32.
- Sernaque, A. Y., Cornejo, L. T., Pierre, R. J., & Mialhe, M. E. (2019). Caracterización molecular de bacterias cultivables y no cultivables procedentes de pozas de lixiviación con cianuro. *Revista peruna de biología*, 275-282.
- Shah, H., Keys, C., Schmid, O., & Gharbia, S. (2002). *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and Proteomics: A New Era in Anaerobic Microbiology*. Londres-Inglaterra.
- Silva, A. (2019). *Materia Orgánica*.
- Solano, A. M. (Noviembre de 2011). Impacto ambiental por aguas residuales y residuos sólidos en la calidad de agua de la parte media-alta de la cuenca del río Damas y propuesta de manejo . Costa Rica.
- Sonco, S. R. (2013). *Estudio de la diversidad alfa y beta en tres localidades de un bosque montano en la región de madidi*. La Paz-Bolivia.
- Suquilanda, V. M. (2017). *Manejo agroecológico de suelos*. Quito.
- Teomitzi, C. (2014). Aislamiento y caracterización de bacterias gram negativas asociadas al sistema suelo raiz de Pinus cembiontes .
- Toro, R. (2004). *La biodiversidad microbiana del suelo, un mundo por descubrir* . Colombia.
- Valdez, M. E. (2014). *Caracterización e identificación molecular de bacterias aisladas de Kéfir*. Mexico.
- Van Bruggen, A. H., Semenov, A. M., Van Diepeningen, A. D., De Vos, O. J., & Blok, W. J. (2006). Relation between Soil Health, Wave-like Fluctuations in Microbial Populations, and Soil-borne Plant Disease Management. *Springer*, 105-122.
- Varela, G., & Grotiuz, G. (2002). *Fisiología y metabolismo bacteriano*.
- Villavicencio, V., & Chávez, L. (2011). *Estudio arqueológico de las cuencas media y baja del río Machángara*. Cuenca.
- Vleeschauwer, D., & Monica, H. (2007). Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plants. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 12.
- Yadav, A., Ghosh, S., Verma, P., & Kumar, A. (2016). Bioprospecting of plant growth promoting psychrotrophic Bacilli from the cold desert of north western Indian Himalayas. *Indian Journal of Experimental Biology* , 9.

Zamora, J., Reinhardt, G., Pollete, M., & Macias, P. (1997). Aislamiento de *Yersinia enterocolitica* y de *Yersinia kristensenii* en fecas de ovinos. *SCIELO*.

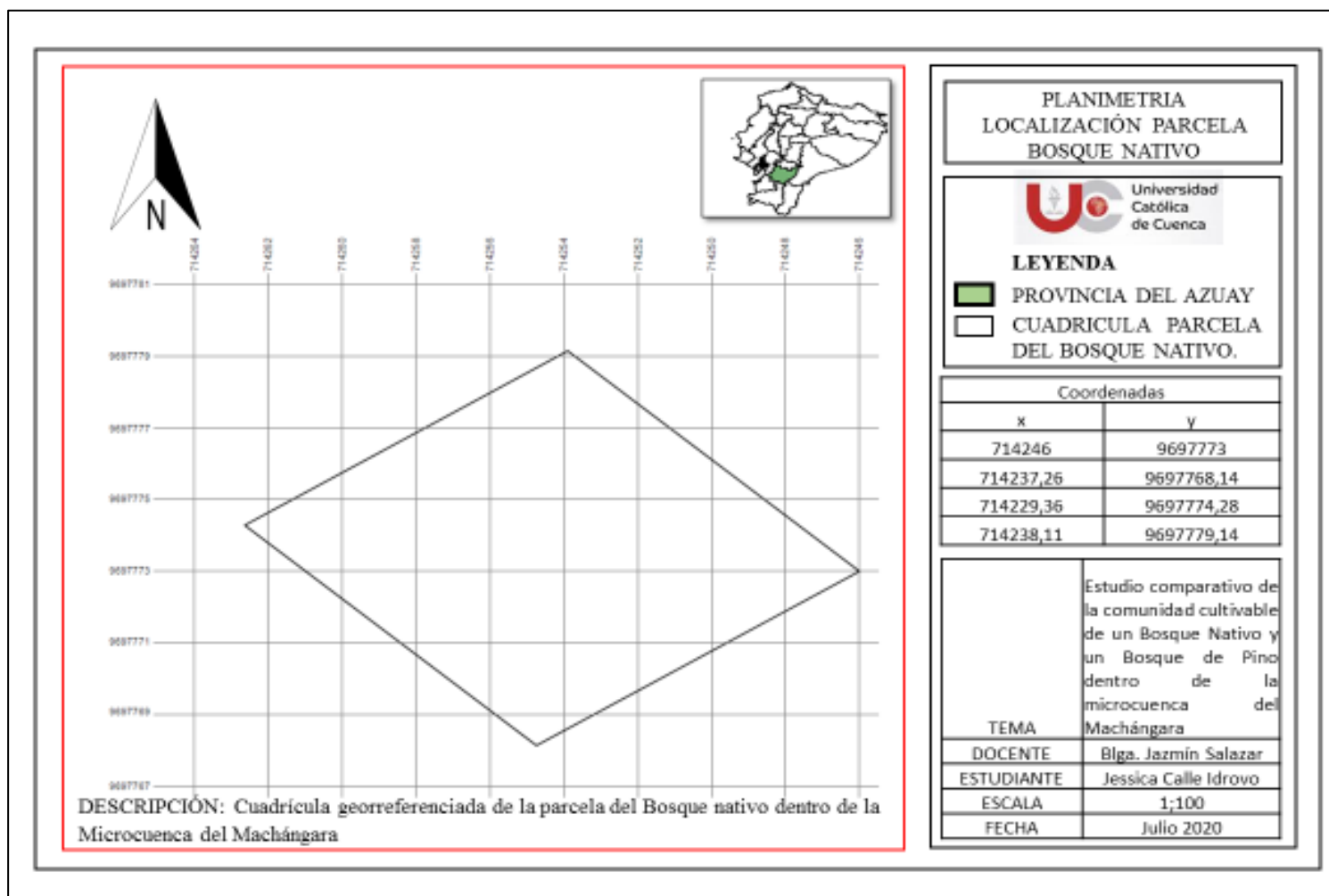
ANEXOS

Anexos A Diseño de cuadrícula en el Bosque Nativo.



Fuente Jessica Calle.

Anexos B Diseño de cuadrícula en el Bosque de Pino.



Fuente Jessica Calle.

Anexos C Morfología de las bacterias presentes en el Bosque Nativo.

| Registro de características fenotípicas de colonias de bacterias Bosque Nativo. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------------------|-----|------|------|-------|------|------|-----|-------|-------|------|-----|-------|------|-------|------|-------|-----|-----|-------|-------|------|-----|------|------|-------|---|
| Característica | A-1 | A-6 | A1-9 | A-10 | B2-3R | B2-5 | B1-8 | B-9 | B1-11 | B2-11 | B-13 | C-1 | C2-2R | C2-2 | C1-4R | C-5R | C2-5R | D-1 | D-5 | D1-5R | D2-5R | E-3R | F-1 | G2-3 | C2-1 | B1R14 | |
| pH | 6 | 7 | 7 | 7 | 6 | 7 | 6 | 7 | 6 | 6 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| Superficie. | Plana | X | X | | | | X | | X | X | X | | | | X | | X | | X | | X | | X | | | X | |
| | Planaconvexa | X | | | X | | X | | | | | X | | X | | | | | | X | | | | X | X | | |
| | Convexa | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | |
| | Acuminada | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Umbilicada | | | | | X | | | | | | | X | | | | X | | | | | | | | | | |
| | Papilada | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Forma | Puntiforme | | | | | | | X | | | | | X | | | X | | | | | | | | | | | |
| | Irregular | | X | | | X | | | | | | X | | X | | | | | | | | | X | | X | X | |
| | Circular | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | X | | X | | | |
| | Rizoide | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Filamentosa | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Fusiforme | X | | X | X | | X | X | | X | X | X | | | | | | X | X | X | X | X | | | | | |
| Borde | Redondeado | X | X | | X | | | | | | | | | | | | X | | X | | | X | X | X | | | |
| | Espiculado | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Ondulado | | | X | | | X | X | | X | X | X | | X | X | | | | X | | X | | | | X | X | |
| | Filamentoso | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Lobulado | | | | | X | | | X | | | | | | | | X | | | | | X | | | | | |
| | Rizoide | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | | | |
| Color | Blanco | X | | X | | | X | X | | X | X | X | | | | | X | | | | X | | X | X | | | |
| | Rosado | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Amarillo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | |
| | Palo de Rosa | | | | X | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Crema | | X | | | | | | | | | X | | X | X | X | | | X | | X | | | | X | | |
| | Marron | | | | | X | | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | X | |
| Tonalidad | Brillosa | X | | | X | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | X | X | X | X | | X | X | |
| | Opaca | | X | | | | | | | | | | | X | | | | X | X | | | | | X | | | |
| | Semitransparente | | | X | | | X | | | | X | | | | | | | | X | X | | | | X | | | |
| Tamaño | Grandes | X | | | X | X | X | | X | X | | | | | X | | X | X | | X | | X | | | | X | |
| | Medianas | | | X | | | | | X | | | X | X | X | | | | | X | | | | | X | X | | |
| | Pequeñas | | X | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | X | | | | | |

Fuente Jessica Calle.

Anexos D Morfología de las bacterias presentes en el Bosque de Pino.

| Registro de características fenotípicas de colonias de bacterias Bosque de Pino. | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------------------|-----|-------|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-----|-----|
| | Característica | a-4 | b1-2R | b2-2R | b-3R | b-5R | b-6R | b-7R | b1-7R | b1-8R | b2-8R | b1-9R | b2-9R | b2-14R | c2-R3 | e-2 | f-2 |
| | pH | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| Superficie. | Plana | | X | X | X | | X | X | | X | | | | X | X | X | X |
| | Planaconvexa | | | | | | | | | | X | X | X | | | | |
| | Convexa | X | | | | X | | | X | | | | | | | | |
| | Acuminada | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Umbilicada | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Papilada | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Forma | Puntiforme | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Irregular | X | | | | X | | | X | X | X | | X | | | | |
| | Circular | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Rizoide | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Filamentosa | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Fusiforme | | X | X | X | | X | X | | | | X | | X | X | X | X |
| Borde | Redondeado | | | | | | | | | | | | | | | | X |
| | Espiculado | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Ondulado | x | X | X | | | X | X | | X | X | X | X | X | X | X | |
| | Filamentoso | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Lobulado | | | | | X | | | X | | | | | | | | |
| | Rizoide | | | | X | | | | | | | | | | | | |
| Color | Blanco | | X | X | | | | | | X | | X | X | X | X | X | |
| | Rosado | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Amarillo | | | | | | | | | | | | | | | | X |
| | Crema | | | | X | | X | X | | | X | | | | | | |
| | Marron | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Palo de Rosa | X | | | | X | | | X | | | | | | | | |
| Tonalidad | Brillosa | X | | X | | X | | | X | | | | | X | X | | |
| | Opaca | | X | | X | | | X | | | X | | X | | | | X |
| | Semitransparente | | | | | | X | | X | | X | | X | | | | |
| Tamaño | Grandes | X | X | | | X | | X | X | | | | X | | | | |
| | Medianas | | | X | X | | | | | | X | | | X | X | X | X |
| | Pequeñas | | | | | | X | | | X | | X | | | | | |

Fuente Jessica Calle.

Anexos E Análisis técnica de MALDITOFF.

Quien suscribe el presente certifica que las siguientes muestras fueron analizadas bajo la técnica de MALDI-TOF (Espectrometría de masas)

| Muestra | Microrganismo Encontrado | Fecha de Análisis |
|----------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 1 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 2 | <i>Buttiauxella ferraguliae</i> | 08/10/2020 |
| 3 | <i>Buttiauxella gaviniae</i> | 08/10/2020 |
| 4 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 5 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 6 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 7 | <i>Yersinia enterocolítica</i> | 08/10/2020 |
| 8 | <i>Bacillus muralis</i> | 08/10/2020 |
| 9 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 10 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 11 | <i>Buttiauxella gaviniae</i> | 08/10/2020 |
| 12 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 08/10/2020 |
| 13 | <i>Paenibacillus stellifer</i> | 08/10/2020 |
| 14 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 15 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 16 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 17 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 18 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 19 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 20 | <i>Yersinia enterocolítica</i> | 08/10/2020 |
| 21 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 22 | <i>Yersinia enterocolítica</i> | 08/10/2020 |
| 23 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 24 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 25 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 26 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 27 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 28 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 29 | <i>Bacillus pumillus</i> | 08/10/2020 |
| 30 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 31 | <i>Bacillus pumillus</i> | 08/10/2020 |
| 32 | <i>Bacillus pumillus</i> | 08/10/2020 |
| 33 | <i>Aeromonas molluscorum</i> | 08/10/2020 |
| 34 | <i>Bacillus muralis</i> | 08/10/2020 |
| 35 | <i>Bacillus muralis</i> | 08/10/2020 |
| 36 | <i>Yersinia kristensenii</i> | 08/10/2020 |
| 37 | <i>Aeromonas encheleia</i> | 08/10/2020 |
| 38 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 08/10/2020 |
| 39 | <i>Micobacterium sp.</i> | 08/10/2020 |
| 40 | <i>Aeromonas molluscorum</i> | 08/10/2020 |
| 44 | <i>Paenibacillus stellifer</i> | 08/10/2020 |
| 45 | <i>Serratia proteamaculans</i> | 08/10/2020 |

| | | |
|----|----------------------------|------------|
| 49 | <i>Serratia plymuthica</i> | 08/10/2020 |
|----|----------------------------|------------|

El analista se responsabiliza exclusivamente de los análisis realizados, el resultado es válido solo para la muestra recibida por el laboratorio.



Lcda. Nadia Villavicencio Apolo, Esp.

Analista Técnica

Anexos F Cálculos de diversidad del bosque nativo y bosque de pino.

| Bosque Nativo | | | | | |
|---------------------------------|---|-----------|----------------|-------------|--|
| Especies | Número de individuos de cada especie | Pi | Pi*lnPi | Pi^2 | |
| <i>Aeromonas encheleia</i> | 16 | 0,64 | -0,2856 | 0,4096 | |
| <i>Buttiauxella ferruguliae</i> | 1 | 0,04 | -0,1288 | 0,0016 | |
| <i>Buttiauxella gaviniae</i> | 2 | 0,08 | -0,2021 | 0,0064 | |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 3 | 0,12 | -0,2544 | 0,0144 | |
| <i>Paenibacillus stellifer</i> | 1 | 0,04 | -0,1288 | 0,0016 | |
| <i>Serratia proteamaculans</i> | 1 | 0,04 | -0,1288 | 0,0016 | |
| <i>Serratia plymuthica</i> | 1 | 0,04 | -0,1288 | 0,0016 | |
| Total | 25 | 1 | -1,2571 | 0,4368 | |
| Número de especies (s) | 7 | | | | |

Fuente Jessica Calle.

Índice de Shannon (H).

$$H = -1 \sum pi * \ln(pi) = -1 * -1.2571 = 1.2571$$

Índice de Simpson (D).

$$D = \frac{1}{\sum pi^2} = \frac{1}{0.4368} = 2.2893$$

$$E = \frac{D}{D_{max}} = \frac{1}{\sum p_i^2} * \frac{1}{s} = \frac{1}{0.4368} * \frac{1}{7} = 0.32$$

Índice de Pielou (J).

$$J = \frac{H}{\log^2(s)} = \frac{1.2571}{\ln(7)} = 0.6460$$

| Bosque de Pino. | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------|-------|---------|--------|
| Especies | Número de individuos de cada especie | Pi | Pi*lnPi | Pi^2 |
| <i>Aeromonas encheleia</i> | 5 | 0,333 | -0,3662 | 0,1111 |
| <i>Bacillus pumillus</i> | 3 | 0,2 | -0,3219 | 0,0400 |
| <i>Aeromonas molluscorum</i> | 2 | 0,133 | -0,2687 | 0,0178 |
| <i>Bacillus muralis</i> | 3 | 0,2 | -0,3219 | 0,0400 |
| <i>Micobacterium sp.</i> | 1 | 0,067 | -0,1805 | 0,0044 |
| <i>Yersinia kristensenii</i> | 1 | 0,067 | -0,1805 | 0,0044 |
| Total | 15 | 1 | -1,6397 | 0,2178 |
| s | 6 | | | |

Índice de Shannon (H).

$$H = -1 \sum p_i * \ln(p_i) = -1 * -1.6397 = 1.6397$$

Índice de Simpson (D).

$$D = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{0.2178} = 4.8571$$

$$E = \frac{D}{D_{max}} = \frac{1}{\sum p_i^2} * \frac{1}{s} = \frac{1}{0.2178} * \frac{1}{6} = 0.6559$$

Índice de Pielou (J).

$$J = \frac{H}{\log^2(s)} = \frac{1.6397}{\ln(6)} = 0.9151$$

| Nombre Científico | Numero de cepas | Bosque Nativo | Bosque de Pino |
|---------------------------------|-----------------|---------------|----------------|
| <i>Aeromonas encheleia</i> | 21 | 16 | 5 |
| <i>Buttiauxella ferraguliae</i> | 1 | 1 | 0 |
| <i>Buttiauxella gaviniae</i> | 2 | 2 | 0 |
| <i>Yersinia enterocolítica</i> | 3 | 3 | 0 |
| <i>Paenibacillus stellifer</i> | 1 | 1 | 0 |
| <i>Bacillus pumillus</i> | 3 | 0 | 3 |
| <i>Aeromonas molluscorum</i> | 2 | 0 | 2 |
| <i>Bacillus muralis</i> | 3 | 0 | 3 |
| <i>Micobacterium sp.</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Yersinia kristensenii</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Serratia proteamaculans</i> | 1 | 1 | 0 |
| <i>Serratia plymuthica</i> | 1 | 1 | 0 |
| | 40 | 25 | 15 |

Índice de Sorenson cualitativo.

$$ISC_{cuali} = \frac{2C}{SA + SB} * 100 = \frac{2(1)}{7 + 6} = 0.1538 * 100 = 15.38\%$$



UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CUENCA
COMUNIDAD EDUCATIVA AL SERVICIO DEL PUEBLO

PERMISO DEL AUTOR DE TESIS PARA SUBIR AL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Jessica Johanna Calle Idrovo portador(a) de la cédula de ciudadanía N° 0302880836. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Estudio comparativo de la comunidad bacteriana cultivable del bosque nativo y bosque de pino dentro de la Microcuenca del Machángara”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, Así mismo; autorizo a la Universidad para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de marzo de 2021

Jessica Johanna Calle Idrovo

0302880836