



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD CIENCIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE SUELO DE  
PÁRAMO ALTO ANDINO POTENCIALMENTE ELECTROGÉNICOS  
PARA PRODUCIR BIOELECTRICIDAD**

**Trabajo de titulación**

Tipo: Proyecto de investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTORA: ANA ISABEL ARGOTI VACAS**

**DIRECTORA: Dra. MAGDY MILENI ECHEVERRÍA GUADALUPE**

Riobamba-Ecuador

2019

© 2019, Ana Isabel Argoti Vacas

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Ana Isabel Argoti Vacas, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

---

Ana Isabel Argoti Vacas

093148044-6

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: “IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE SUELO DE PÁRAMO ALTO ANDINO POTENCIALMENTE ELECTROGÉNICOS PARA PRODUCIR BIOELECTRICIDAD”, de responsabilidad de la señorita egresada Ana Isabel Argoti Vacas, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Dra. Magdy Mileni Echeverría Guadalupe

**DIRECTOR DE TESIS**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTO**

Mis más sinceros agradecimientos a los docentes de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por compartir sus conocimientos a lo largo de mi preparación, profesional y vida universitaria, de manera especial le agradezco a la Doctora Magdy Echeverría, Ingeniera Cristina Calderón y al GIDAC por brindar su guía y colaboración en el desarrollo de esta investigación. A los técnicos docentes; Dra. Yolanda Buenaño, Ing. Ana Belén Mejía e Ing. Josué Vélez por su colaboración y asesoramiento en la parte práctica de la investigación.

**Ana**

## **DEDICATORIA**

Dedico esta investigación a mis abuelitos Julio y Laura por su sabiduría, amor, entrega, apoyo y confianza y a mis queridos padres Juan y Laura que han sabido inquebrantablemente darme su ejemplo, paciencia que me ha permitido llegar a cumplir uno más de mis sueños y gracias por sembrar en mí la semilla de la responsabilidad y perseverancia, una enorme gratitud por el esfuerzo que han hecho por mí, ha sido ejemplo de esfuerzo y valentía para no temer a las adversidades en el desarrollo de esta etapa de mi vida, a lo largo de toda mi formación académica y personal. A toda mi familia y amigos por el cariño, el consejo y los ánimos de seguir adelante.

**Ana**

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	<b>¡Error!</b>
<b>r! Marcador no definido.</b>	
<b>SUMMARY</b> .....	
<b>.....¡Error! Marcador no definido.i</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>JUSTIFICACION</b> .....	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1. Antecedentes de la investigación</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2. Marco Conceptual</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.1 Identificación de Microorganismos</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.2. Pruebas fenotípicas</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.2.1 Pruebas macroscópicas</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.2.2 Tinción Gram</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2.3. Pruebas Bioquímicas</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2.4. Aislamiento</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2.5. Pruebas moleculares</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3. Microorganismos de suelo</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3.1. Suelo de Páramo</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3.2. Conductividad del Suelo</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4.</b> .....	<b>Bioelectricidad 17</b>
<b>1.5.</b> .....	<b>Celdas de Combustible Microbiano (CCMs) 17</b>
<b>1.6.</b> .....	<b>Consortios microbianos y sinergismo 18</b>
<b>1.7.</b> .....	<b>Bacterias Generadoras de Electricidad 19</b>
<b>1.8.</b> .....	<b>Biofilms 20</b>
<b>1.8.1. Formación de Biofilms.</b> .....	<b>20</b>
<b>1.8.2. Fases de Crecimiento microbiano en biofilms</b> .....	<b>21</b>
<b>1.8.2.1 Fase de Latencia</b> .....	<b>22</b>
<b>1.8.2.2 Fase exponencial o fase logarítmica</b> .....	<b>22</b>

1.8.2.3	<i>Fase estacionaria</i> .....	22
1.8.2.4	<i>Fase de muerte</i> .....	23

## CAPITULO II

2.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	24
2.1.	..... <b>Sitio de muestreo de suelo</b>	<b>24</b>
2.1.1	<i>Parte experimental</i> .....	25
2.2.	..... <b>Preparación de la muestra</b>	<b>25</b>
2.2.1	..... <i>Caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo</i>	26
2.2.2.	<i>Determinación de conductividad eléctrica</i> .....	27
2.2.3.	<i>Determinación de porcentaje de humedad.</i> .....	27
2.3.	..... <b>Metodología de Identificación de ADN total</b>	<b>28</b>
2.3.1.	<i>Extracción y purificación de DNA</i> .....	28
2.3.2.	<i>Replicación del DNA (librerías genéticas)</i> .....	29
2.3.3.	<i>Utilización de Marcadores</i> .....	30
2.3.4.	<i>Secuenciación masiva</i> .....	30
2.4.	..... <b>Configuración de las CCM</b>	<b>31</b>
2.4.1.	<i>Esterilización de material usado en configuración de CCM</i> .....	32
2.4.2.	<i>Pretratamiento de membrana</i> .....	32
2.4.3.	<i>Determinación de sustratos y minerales</i> .....	33
2.4.4.	<i>Incorporación de inóculos</i> .....	33
2.4.5.	<i>Identificación del sistema de adquisición de datos</i> .....	34
2.5.	..... <b>Análisis Macroscópico</b>	<b>35</b>
2.5.1.	<i>Formación del Biofilm</i> .....	35
2.5.2.	<i>Preparación de la muestra para análisis genéticos</i> .....	35
2.5.2.1.	<i>Secuenciación Masiva del Biofilm por perfiles taxonómicos</i> .....	36
2.5.2.2.	<i>Pruebas bioquímicas de identificación</i> .....	36
2.5.2.3.	<i>Agar Urea de Christensen</i> .....	39
2.5.2.4.	<i>Agar Manitol</i> .....	39
2.5.2.5.	<i>Citrato de Simmons</i> .....	39
2.5.2.6.	<i>Agar SIM-Nahrboden</i> .....	40
2.5.2.7.	<i>TSI(Triple Sugar Iron Agar)</i> .....	40
2.6.	<b>Materiales experimentales</b> .....	40

2.7.....	<b>Planteamiento de Hipótesis</b>	<b>43</b>
2.7.1. <i>Hipótesis Estadística</i> .....		43

### **CAPITULO III**

<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
3.1.....	<b>Análisis para determinar el punto de muestreo</b>	<b>44</b>
3.2.....	<b>Parámetros climatológicos del sitio de muestreo</b>	<b>45</b>
3.3	<b>Caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo</b> .....	<b>46</b>
3.3.1.	<i>Resultados de Parámetros fisicoquímicos y mineralógicos</i> .....	46
3.3.2.	<i>Resultado de Conductividad</i> .....	48
3.3.3.	<i>Resultados de porcentaje de humedad</i> .....	49
3.4.....	<b>Profundidad en el punto de muestreo</b>	<b>50</b>
3.5.	<b>Resultados de Secuenciación masiva paralela de suelo de páramo</b> .....	<b>51</b>
3.6.....	<b>Resultados de Pruebas Bioquímicas para Bacilos Gram (-)</b>	<b>53</b>
3.7.....	<b>Resultados de Voltaje mediante Sistema de Adquisición de datos</b>	<b>56</b>
3.8.	<b>Resultados de Análisis Macroscópico</b> .....	<b>60</b>
3.9.	<b>Resultados de análisis genéticos</b> .....	<b>61</b>
3.10.	<b>Análisis Estadístico</b> .....	<b>62</b>
3.11	<b>Especies encontradas en el suelo muestreado</b> .....	<b>63</b>

**CONCLUSIONES**.....66

**RECOMENDACIONES**.....68

**BIBLIOGRAFÍA**

**ANEXOS**

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b>	Tipos de identificación microbiana según su morfología colonial.....	7
<b>Tabla 2-1:</b>	Tipos de identificación microbiana según Tinción de Gram.....	8
<b>Tabla 3-1:</b>	Identificación de Microorganismos según pruebas bioquímicas .....	9
<b>Tabla 4-1:</b>	Tipos de Medios de Cultivo.....	12
<b>Tabla 5-1:</b>	Métodos Moleculares de identificación bacteriana .....	13
<b>Tabla 1-2:</b>	Protocolo de análisis físico químicos de la muestra de suelo.....	26
<b>Tabla 2-2:</b>	Pruebas Bioquímicas, fundamento, preparación e identificación potencial de microorganismos.....	36
<b>Tabla 3-2:</b>	Equipos y Materiales utilizados en varias etapas de investigación .....	40
<b>Tabla 4-2:</b>	Lista de reactivos, sustancias y equipos utilizados.....	42
<b>Tabla 1-3:</b>	Parámetros climáticos del sitio de muestreo.....	46
<b>Tabla 2-3:</b>	Resultados de análisis físico-químicos de la muestra de suelo inicial .....	47
<b>Tabla 3-3:</b>	Resultados de Análisis de conductividad.....	48
<b>Tabla 4-3:</b>	Tabla de cálculos de Porcentaje de Humedad .....	50
<b>Tabla 5-3:</b>	Descripción de la especie <i>Bradyrhizobium canariense</i> .....	51
<b>Tabla 6-3:</b>	Descripción de la especie <i>Geobacter psychrophilus</i> .....	52
<b>Tabla 7-3:</b>	Especies más abundantes encontradas por secuenciación de suelo de páramo.....	53
<b>Tabla 8-3:</b>	Resultados de Pruebas Bioquímicas para Bacilos Gram (-).....	53
<b>Tabla 9-3:</b>	Resultados de voltajes.....	57
<b>Tabla 10-3:</b>	Especies más abundantes encontradas en membranas de CCM.....	61

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b>	Formación de una biopelícula multiespecie.....	21
<b>Figura 2-1:</b>	Fases de crecimiento microbiano.....	23
<b>Figura 1-2:</b>	Mapa del Lugar de toma de muestras.....	25
<b>Figura 2-2:</b>	Proceso para la identificación de DNA.....	28
<b>Figura 3-2:</b>	Proceso de extracción y purificación de DNA.....	29
<b>Figura 4-2:</b>	Sucesión de procesos a llevar a cabo en secuenciación masiva de DNA.....	30
<b>Figura 5-2:</b>	Pretratamiento de la membrana.....	32
<b>Figura 6-2:</b>	Incorporación de sustratos minerales.....	33
<b>Figura 7-2:</b>	Inoculación en la celda.....	34
<b>Figura 8-2:</b>	Recolección de datos.....	34
<b>Figura 9-2:</b>	Extracción de membrana para analizar biofilm .....	35
<b>Figura 10-2:</b>	Prueba Ureasa.....	39
<b>Figura 11-2:</b>	Prueba de Manitol.....	39
<b>Figura 12-2:</b>	Prueba Simmons.....	39
<b>Figura 13-2:</b>	.....	<b>Prueba</b>
<b>Sim.</b>	.....	<b>40</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Resultados de conductividad media a diferentes coberturas vegetales y a altura de 4000 m.s.n.m .....	44
<b>Gráfico 2-3:</b> Generación de voltaje.....	58
<b>Gráfico 3-3</b> Comparación de especies microbianas encontradas en CCM con suelo de profundidad de 20cm.....	63
<b>Gráfico 4-3</b> Comparación de especies microbianas encontradas en CCM con suelo de profundidad de 40cm.....	63
<b>Gráfico 5-3</b> Comparación de especies microbianas encontradas en membrana con suelo de profundidad de 20cm.....	64
<b>Gráfico 6-3</b> Comparación de especies microbianas encontradas en membrana con suelo de profundidad de 40cm.....	64

## **INDICE DE ANEXOS**

**Anexo A** Resultados genéticos mostrados con Krona

**Anexo B** Configuración de CCM

## RESUMEN

La presente investigación identificó potenciales microorganismos generadores de bioelectricidad en celdas de combustible microbiano (CCM), se monitoreo por 16 días en un sistema de adquisición de datos (DAQ), utilizando sustratos de residuos orgánicos, de frutas más verduras (relación 50:50) y como inóculo suelo de páramo alto andino, a dos profundidades (20 y 40cm) con 3 réplicas de cada tratamiento. La presencia del biofilm en tejido de fibra de carbono fue comprobada mediante microscopio electrónico de barrido. Se comprobó la hipótesis alternativa es aceptada y se concluye que a mayor profundidad se producen voltajes más elevados: 0,3384 V, 0,2839 V, 0,2112 V; y a 20cm: 0,2539V, 0,2088V, 0,1625V. Análisis genéticos mediante secuenciación masiva por perfiles taxonómicos concluyeron que la cepa bacteriana más abundante del suelo es *Bradyrhizobium canariense*, la misma que aparece en menor proporción en el biofilm y *Geobacter psychrophilus*, identificadas como potencialmente electrogénicas, por lo que suponemos que son generadoras de bioelectricidad. En el perfil taxonómico de la membrana predominan las especies; *Pseudomonas azotoformans* *Gluconobacter cerinus*, *Leuconostoc citreum*, *Acetobacter okinawensis*. Las pruebas bioquímicas de Agar Urea, Agar Manitol, Citrato, pruebas TSI, y Agar SIM para movilidad e Indol se usaron para identificación microbiana, en las que figura *Pseudomonas aureginosa*, concordando en género con *Pseudomonas flavescens* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*; indicando la concordancia entre especies en las distintas pruebas moleculares. Se concluye que a mayor profundidad del suelo de páramo alto andino a 4000 m.s.n.m y en cobertura vegetal pajonal existe mayor cantidad de microorganismos electrogénicos. Por lo que se podría recomendar investigar otros factores como tipos de sustrato para la alimentación, como aguas residuales o residuos sintéticos, además de implementar otro tipo de pruebas de identificación microbiana.

**Palabras clave:** <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANO (CCM) >, <BIOELECTRICIDAD>, <SECUENCIACION MASIVA>, <MICROORGANISMOS ELECTROGENICOS>, <PARAMO ALTO ANDINO>, <CHIMBORAZO (PROVINCIA)>.

## ABSTRACT

The present investigation identified potential microorganisms, bioelectricity generators in microbial fuel cells (MFC), was monitored for 16 days in a data acquisition system (DAQ), using organic waste substrates, fruits and vegetables (ratio 50:50 ) and as an inoculum high Andean moor soil, at two depths (20 and 40cm) with 3 replications of each treatment. The presence of biofilm in carbon fiber tissue was checked by scanning electron microscope. The alternative hypothesis was proven to be accepted and it is concluded that at higher depths higher voltages occur: 0.3384 V, 0.2839 V, 0.2112 V; and at 20cm: 0.2539V, 0.2088V, 0.1625V. Genetic analysis by means of massive sequencing by taxonomic profiles concluded that the most abundant bacterial strain of the soil is *Bradyrhizobium canariense*, which appears to a lesser extent in the biofilm and *Geobacter psychrophilus*, identified as potentially electrogenic, so it is assumed that they are generators of bioelectricity. In the taxonomic profile of the membrane species predominate; *Pseudomonas azotoformans* *Gluconobacter cerinus*, *Leuconostoc citreum*, *Acetobacter okinawensis*. Biochemical tests of Urea Agar, Mannitol Agar, Citrate, TSI tests, and SIM Agar for mobility and Indol were used for microbial identification, which includes *Pseudomonas aureginosa*, agreeing in gender with *Pseudomonas flavescens* and *Pseudomonas pseudoalcaligenes*; indicating the correlation between species in the different molecular tests. It is concluded that at a greater depth of the soil of the high Andean moorland at 4000 m.a.s.l. and in pajonal vegetation cover there is a greater amount of electrogenic microorganisms. So it would be recommended to investigate other factors such as types of substrate for food, such as sewage, or synthetic residues, in addition to implementing other types of microbial identification tests.

**Keywords:** <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <MICROBIAL FUEL CELLS (MFC)>, <BIOELECTRICITY>, < MASS SEQUENCING >, <ELECTRO GENIC MICROORGANISMS >, < HIGH ANDEAN MOORLAND, <CHIMBORAZO> (PROVINCE).

## INTRODUCCIÓN

El aumento demográfico principalmente ha incrementado la necesidad de recursos energéticos y ha provocado su sobreexplotación. Por esto se cataloga los recursos energéticos como no renovables. Fuentes energéticas tradicionales como combustibles fósiles son ampliamente demandados por la industria del transporte siendo estos recursos fundamentales para el desarrollo humano y una buena calidad de vida. (Delgado, 2016) . Con el aumento demográfico ha desencadenado una gran generación de residuos por ello nace la necesidad de buscar fuentes de energía alternativa que suplan estas nuevas necesidades energéticas y que simultáneamente se dediquen al tratamiento de residuos sólidos como de aguas residuales.

La búsqueda de reemplazar el uso de combustibles fósiles o a su vez aligerar la carga sobre su demanda, son la solución al crecimiento demográfico humano acelerado; tecnologías novedosas que remuevan metales pesados y traten subproductos como H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> considerando que este último es el que provoca calentamiento global y su consecuencia, el cambio climático, debido a esto se estima que en 100 años todas las reservas de combustible fósil se abran agotado. (Honty, G, 2006)

Se puede contribuir al uso de fuentes de energía alternativa con la investigación de identificar los microorganismos adecuados para el uso en Celdas de Combustible microbiano, puesto que, en la actualidad, esta tecnología permite purificar aguas con cargas contaminantes y simultáneamente generar energía eléctrica, esto puede representar una solución para minimizar la utilización de combustibles fósiles. Actualmente no se han encontrado trabajos que estudien los procesos electrogénicos con diversidad microbiológica del suelo alto andino del Ecuador. No se han identificado bacterias que produzcan electricidad, es preciso determinar las especies electrogénicas para perfeccionar el funcionamiento de las celdas de combustible microbiano, y establecer una cantidad de voltaje más precisa y estable, para así potenciar la producción de bioelectricidad. (Logroño, 2015)

Los cultivos mixtos son competentes para la generación de bioelectricidad (Jiang, Ulrich, & Liu, 2013). En estudios previos en CCMs mediante análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), se registran las especies electrogénicas más representativas, 50.4% Proteobacteria, 25.1% Firmicutes, y 24.5% Actinobacteria. (Mocali et al., 2013)

## JUSTIFICACIÓN

Al tener la necesidad de buscar fuentes de generación de energía eléctrica se implementan celdas de combustible microbiano (CCM), cuya base primordial es la identificación de microorganismos, que a su vez pueden facilitar la generación de energía eléctrica. En la actualidad, no se han encontrado procesos electrogénicos con diversidad microbiológica del suelo alto andino o amazónico del Ecuador (Logroño W. E., 2014). Es necesario conocer las especies de microorganismos con potencial electrogénico para optimizar el funcionamiento de las celdas de combustible microbiano, una identificación microbiana establece una cantidad de voltaje más alta y estable, un consorcio microbiano ya con microorganismos identificados potencializa la producción de bioelectricidad.

Actualmente no se cuenta con un banco de microorganismos correctamente identificados para optimizar el uso de CCMs, por esto la presente investigación pretende aislar, caracterizar e identificar microorganismos con potencial bioenergético. Estos tratamientos tienen ventaja sobre los tradicionales, usan la bioconversión de sustrato directa, no son muy susceptibles a variaciones de temperatura, puede aprovechar el biogás generado, no consumidoras de energía eléctrica y debido a esto pueden operar en lugares inhóspitos convirtiéndose en energía renovable para los requerimientos a nivel mundial. (Alzate, 2008)

En base al trabajo realizado en el Grupo de Investigación y Desarrollo para el Ambiente y Cambio Climático (GIDAC-CEAA-ESPOCH) referente a fuentes energéticas alternativas, a partir de muestras de suelo Amazónico y de Andes usados como inóculos electrogénicos en CCMs, se desarrolla la presente investigación idónea a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental, se encuentra dentro de las líneas de investigación de Ingeniería de procesos y protección ambiental, debido que consta de un desarrollo de una fuente alternativa de energía limpia que contribuye con el cuidado ambiental, además se encuentra dentro de la sublínea de investigación, Biotecnología, ya que se arraiga al concepto esencial de biotecnología, “El uso de procesos biológicos u organismos vivos, para la producción de materiales y servicios en beneficio de la humanidad incluye el uso de técnicas que incrementan el valor económico de plantas y animales y desarrollan microorganismos para actuar en el medio ambiente” (CAR/PL), 2003)

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Identificar microorganismos de suelo de páramo alto andino potencialmente electrogénicos utilizando Celdas de Combustible Microbianas para producir bioelectricidad.

### **Objetivos Específicos**

Identificar el ADN total de suelo de páramo alto andino a una altura de 4000 msnm., y según la cobertura vegetal de pajonal.

Construir celdas de combustible microbianas usando sustratos e inóculos con antecedentes de producción de voltaje relevantes.

Caracterizar los microorganismos potencialmente electrogénicos mediante pruebas macroscópicas, bioquímicas y moleculares.

# CAPITULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes de la investigación

Las Celdas de Combustible Microbianas (CCMs) fueron exploradas desde los años 70 y 80, esta conlleva el uso de microorganismos, especialmente bacterias las cuales, dentro de este dispositivo mediante sus reacciones metabólicas, producen electricidad y simultáneamente degradan materia orgánica biorremediando ambientes contaminados, principalmente aguas contaminadas, sin embargo, recientemente se han desarrollado como dispositivos atractivos para generar electricidad desarrollando así aplicaciones prácticas de las celdas. Una CCM convierte un sustrato biodegradable directamente a electricidad, esto se consigue cuando las bacterias, a través de su metabolismo, transfieren electrones desde un donador, como puede ser la glucosa, a un receptor de electrones (Du, Li, & Gu, 2007)

Típicamente una CCM consta de dos compartimentos divididos por un separador semipermeable y cada uno contiene un electrodo (ánodo y cátodo), sobre los cuáles actúan los microorganismos donando o recibiendo electrones respectivamente. En los últimos años los esfuerzos de investigación se están concentrando en CCB (Celdas de configuración de biocátodos), que son electrodos inoculados con microorganismos capaces de aceptar electrones y reducir compuestos que en su forma oxidada suelen ser contaminantes para los ambientes, tales como: Cr(VI), nitrato, sulfato, Mn(IV), Fe(III), selenato, arsenato, fumarato, perclorato, cloroetenos, 2-clorofenol,  $\text{ClO}^4$ , U(VI),  $\text{H}^+$ ,  $\text{CO}_2$ , entre otros (Revelo, Hurtado, Ruiz, & López, 2015).

El interés por las CCMs ha crecido, buscando reducir los costos como medio sostenible para la producción de energía (Logroño, Echeverría, Recalde, & Graziani, 2015). Las CCMs reutilizan componentes orgánicos como proteínas y carbohidratos, además emplean lodos activados y biomasa de ahí que este pequeño dispositivo se traslada a la actualidad como una nueva tecnología alternativa con el afán de darle una opción a la crisis energética actual. En estudios previos lo que se ha investigado es la generación de energía limpia a partir de fuentes de carbono orgánico e inorgánico como la biomasa lignocelulósica como residuos orgánicos y aguas residuales. Estas Celdas de combustible microbiano operan bajo diversas condiciones, de sustrato, de inóculos de

microorganismos electrogénicos, de estructura de composición de la celda obteniendo buenos resultados, produciendo menor cantidad de CO<sub>2</sub> en comparación a tecnologías convencionales en obtención de energía (Chugcho, 2014).

En trabajos anteriores realizados en la ESPOCH acerca de Celdas de Combustibles Microbianas se determina que se han trabajado con suelos de páramo provenientes de la región amazónica y alto andina, en el 2013 se obtuvieron muestras de suelo no intervenido, entre 20 a 40 cm de profundidad, localizada en la comunidad alto andina Pichan Central-Guano-Chimborazo, dentro de sus características físico químicas se encuentra que temperatura ambiental promedio de 8,2 °C y humedad del 100%, 4000 msnm, una zona de mejor producción de voltaje de páramo de pajonal (Logroño et al., 2015).

Conjuntamente se investiga las posibles especies microbianas aptas para la producción de bioelectricidad; influencia de microorganismos encontrados en estiércol, que acelera el crecimiento microbiano en las CCMs, debido a que el estiércol al parecer es potencialmente viable para producir bioelectricidad (Ríos Lara & Echeverría, 2016). Otro estudio menciona cepas puras y poblaciones microbianas en términos de eficiencia coulombica, de las especies; *Geobacter sulfurreducens* y *Rhodospirillum rubrum* que generan porcentajes de eficiencia mayores que generar bioelectricidad a partir de poblaciones microbianas en general (Armas, 2014).

Con respecto al sinergismo microbiano, se enfatiza que los consorcios microbianos producen comparativamente mejor voltaje que los cultivos puros. Mientras las bacterias sean de diferentes géneros, estas se adaptan bien en la cámara anódica y ayudan en la transferencia de electrones, existiendo mutualismo entre la población bacteriana y las especies *Bacillus tequilensis* y *Pseudomonas aeruginosa* produciendo más voltaje cuando están en consorcio que cuando están en cultivo puro, ya que en consorcio de (110×10<sup>5</sup> UFC/mL) produjeron 450 mV y en cultivo puro, 250 mV y 310 mV respectivamente, confirmando la teoría. (Deepika, et.al, 2013)

## **1.2. Marco Conceptual**

### ***1.2.1 Identificación de Microorganismos***

“Se entiende por identificación microbiana al conjunto de técnicas y procedimientos que se aplican para establecer la identidad de un microorganismo.” (Prescott, L.; Harley, J.; Klein, 1999).

Para la adecuada identificación de microorganismos se utilizan técnicas de análisis microbiológico y sobre todo reconocimiento bacteriano, donde el principal objetivo es identificar y contabilizar los microorganismos presentes en una muestra, es decir se utilizan para diferenciar tu taxonomía, la cual es una herramienta de clasificación, dentro de las categorías se detalla familia, género y especie, refiriéndose a cepa como una especie aislada. (López, Castillo, & Salavert, 2007, p. 27).

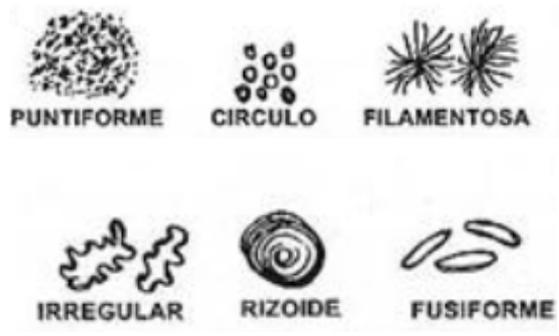
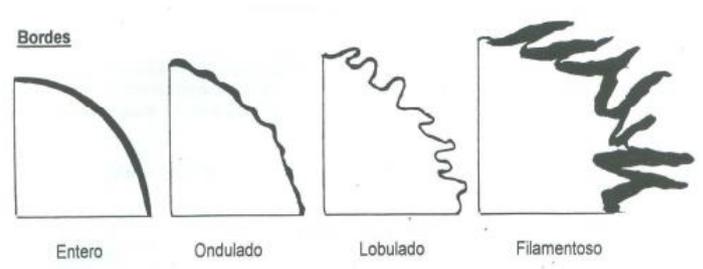
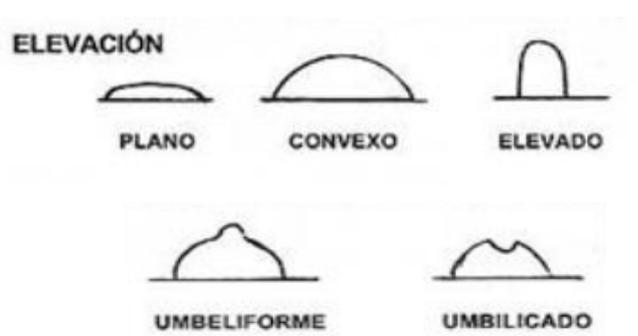
### ***1.2.2 Pruebas fenotípicas***

El análisis fenotípico bacteriano se refiere a las características morfológicas detectables de las bacterias como su forma, textura, color desarrollo y propiedades bioquímicas y de metabolismo. Este método permite el aislamiento de los microorganismos implicados para comparar sus características con especies ya clasificadas previamente, mientras más características similares más fiabilidad y porcentaje de certeza se tendrá a la hora de la identificación. (Fernández-Olmos, et.al. 2011, p.4)

#### ***1.2.2.1 Pruebas macroscópicas***

Son pruebas observables, apreciando la morfología de las colonias formadas según su; tamaño, forma y disposición, de las mismas colonias tanto en la superficie de ellas como dentro de ellas, la ausencia o presencia de algunas texturas y colores son herramientas para un sistema de clasificación. Estos métodos de identificación microbiológica permiten caracterizar una colonia bacteriana para conocer su taxonomía según su morfología. (Rojas, 2011, p.28).

**Tabla 1-1:** Tipos de identificación microbiana según su morfología colonial.

	<b>Clasificación</b>	<b>Detalle de la Colonia.</b>
Morfología de Colonias	<p>Forma de la Colonia</p>  <p>PUNTIFORME      CIRCULO      FILAMENTOSA</p> <p>IRREGULAR      RIZOIDE      FUSIFORME</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Circular</li> <li>○ Puntiforme</li> <li>○ Irregular</li> <li>○ Rizoide</li> <li>○ Fusiforme</li> <li>○ Filamentos a</li> </ul>
	<p>Bordes de Colonia</p>  <p>Bordes</p> <p>Entero      Ondulado      Lobulado      Filamentoso</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Redondead o o Entero</li> <li>○ Ondulado</li> <li>○ Filamentos o</li> <li>○ Rizoide</li> <li>○ Lobulado</li> </ul>
	<p>Elevación de la colonia</p>  <p>ELEVACIÓN</p> <p>PLANO      CONVEXO      ELEVADO</p> <p>UMBELIFORME      UMBILICADO</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Plano</li> <li>○ Convexo</li> <li>○ Elevada</li> <li>○ Acuminad a</li> <li>○ Papilada</li> <li>○ Umbilicad a</li> </ul>
	<p>Superficie</p> <p>Lisa: presentan una superficie homogénea</p> <p>Rugosa: presentan una superficie heterogénea</p> <p>Plegada: su superficie esta dispuesta por capas</p> <p>Mate: su coloración muestra tonalidades opacas</p> <p>Brillante: su coloración muestra tonalidades brillantes</p> <p>Consistencia seca o cremosa se comprueba con el asa</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Lisa/Rugosa</li> <li>○ Plegada</li> <li>○ Mate/Brillante</li> <li>○ Seca/Cremosa</li> </ul>

	Invasiva: cuando la colonia alcanza más profundidad en el medio de cultivo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Invasiva/Superficial</li> </ul>
	<b>Clasificación</b>	<b>Detalle de la Colonia.</b>
Morfología de Colonias	Se comprueba su consistencia mediante un asa.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cremosa</li> <li>○ Membranosa</li> </ul>
	Características ópticas (de luz transmitida a través de la colonia): Opaca: no permite el paso de luz Traslúcida: Deja pasar la luz sin permitir la completa visibilidad de los objetos observados a través de la colonia. Transparente: Deja pasar la luz permitiendo ver claramente los objetos observados a través de la colonia.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Opaca</li> <li>○ Traslúcida</li> <li>○ Transparente</li> </ul>
	Luz Reflejada (observar la superficie de la colonia)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Opaca</li> <li>○ Brillante</li> </ul>

Fuente: Alvarado, et.al., 2002)

Realizado por: Ana Argoti, 2019

### 1.2.2.2 Tinción Gram

La tinción de Gram se encuentra dentro de las pruebas microscópicas, esta es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas, en el siguiente esquema se especifica el color de las bacterias según la solución colorante aplicada, durante un tiempo determinado de aplicación, para cada paso del proceso de coloración Gram.

**Tabla 2-1:** Tipos de identificación microbiana según Tinción de Gram.

Solución	Tiempo de Aplicación	Bacterias grampositivas	Bacterias gramnegativas
Colorante cristal violeta	30 s	Violeta	Violeta
Lugol	1 min	Violeta	Violeta
Decolorante alcohol acetona	10-15 min	Violeta	Incolora

Colorante contraste, safranina	1 min	Violeta	Rosada
-----------------------------------	-------	---------	--------

**Fuente:** (Pérez & Mota, 2010), (L. López et al., 2014)

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

### 1.2.3 Pruebas Bioquímicas

Estas pruebas se enfocan a resultados de reacciones bioquímicas por cambios de coloración visibles, presencia de efervescencia, degradación de compuestos, reacción con azúcares como resultado de una reacción de los microorganismos al detectar la presencia de enzimas en su medio. (Román, 2003)

Por esto el primer paso para la identificación fenotípica consiste en observar las características morfológicas de las bacterias, para agruparlas, y con esto analizar sus capacidades bioquímicas y metabólicas. Las llamadas pruebas bioquímicas permiten observar el comportamiento de agrupaciones de bacterias objeto de identificación en su ruta metabólica, estas logran analizar la reacción de un microorganismo a una sustancia colocada en cultivos de crecimiento, por esto se les llama medios de identificación microbiana, ya que están predeterminados con sustratos elegidos para observar el comportamiento y nivel metabólico de la bacteria hacia los mismos. (Cercenado & Cantón, 2010)

De acuerdo al metabolismo de las bacterias, las pruebas bioquímicas son utilizadas para la identificación de microorganismos. Dentro de las más esenciales encontramos las citadas en la tabla 3-1.

**Tabla 3-1:** Identificación de Microorganismos según pruebas bioquímicas

Prueba Bioquímica	Sustrato	Reacción metabólica
Hidrolisis del almidón	Almidón	Cuando el almidón se degrada desaparece la coloración café purpura dada por el complejo Lugol y almidón
Degradación de Caseína	Caseína	La caseína es hidrolizada y desaparece este color blanco alrededor de la colonia microbiana.
Hidrólisis de la lecitina y reducción del telurito	Lecitina	Se emplea medio Parker para aislar <i>S. aureus</i> colonias oscuras por reducción de telurito, y presentan un halo por hidrólisis de lecitina.

<b>Prueba Bioquímica</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Reacción metabólica</b>
Licuefacción de gelatina	Gelatina proteína	Cuando esta se hidroliza por la acción de gelatinasas pierde la capacidad de gelificar.
Fermentación de carbohidratos	Carbohidrato	La degradación del carbohidrato se pone a prueba con la variación de acidez en el medio de cultivo y formación de gases.
Rojo de Metilo o Voges Proskauer	Glucosa	Por vía fermentación ácida o neutra los productos son ácidos que provocan cambios de pH > 5,1 es amarillo y pH < 4,4 es de coloración roja.
Citrato de Simmons	Citrato de sodio	Al usar citrato como única fuente de carbono, también sales de amonio como única fuente de nitrógeno, produciendo amoníaco y haciendo alcalino el medio cambia de color verde a azul.
Agar de Hierro Kligler	Glucosa, lactosa y Tiosulfato.	En reacción se forma H <sub>2</sub> S gaseoso, este gas reacciona y produce un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso metálico.
Medio SIM (Sulfhídrico Indol Movilidad)	Tiosulfato o grupos SH de la cisteína y triptófano.	Con tiosulfato presente se libera H <sub>2</sub> S gaseoso que reacciona con citrato de amonio férrico y produce un precipitado negro de sulfuro ferroso. O se forman tres metabolitos; indol, metil indol y ácido indolacético. Reactivos de Erlich o Kovacs reaccionan con indol cambiando a color violeta un anillo en la superficie. La movilidad también se observa por la dispersión del microorganismo en todo el tubo de medio de cultivo semisólido.
Ureasa	Urea	Hidrolisis de urea libera amoníaco alcalinizando el medio cambiándolo de color amarillo a rosa
Reducción de Nitratos	Nitrato de Sodio	Nitrato y nitrato reductasa, el nitrito reacciona con ácido sulfanílico y dimetil-a-naftilamina dando una reacción clorada.
Descarboxilasa	lisina, ornitina o arginina	Los aminoácidos se convierten en diaminas incrementa el pH y el medio se torna violeta. Son útiles para enterobacterias.

<b>Prueba Bioquímica</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Reacción metabólica</b>
Prueba de Coagulasas	Coagulasa	<i>S. aureus</i> produce la enzima que actúa sobre factores de coagulación formando coágulos visibles.
Oxidasa	Compuesto reducido.	La prueba positiva se observa por la oxidación del reactivo incoloro (citocromo reducido) en pocos segundos formándose un producto colorido.
Prueba TSI (Triple sugar iron)	Glucosa, sacarosa y lactosa.	La fermentación de estos azúcares hace que se produzcan cambios de pH , mostrándose como cambios de coloración en el fondo del medio de cultivo sembrado en tubo, también se observan cambios de coloración en la superficie del medio de cultivo, cuando es ácido es de color amarillo, cuando es alcalino es rojo.

**Fuente:** (Mac Faddin, 2003), (Román, 2003)

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

### ***1.2.4 Aislamiento***

Es la separación de una especie de un cultivo de poblaciones mixtas, donde crecen varias especies, para aislar se necesita un cultivo puro el cual es una población de células que se derivan de una única célula madre de esa especie bacteriana. (Puruncajas, 2013, p.30-33)

El aislamiento bacteriano es la separación de una especie de microorganismo del resto de microorganismos que se encuentran en conjunto, así permite separar distintos tipos de colonias, basados en la inmovilización de células de estos microorganismos en medios de cultivo sólidos especializados. (Alvarez, Boquet, & De Fez, n.d.)

Un medio de cultivo es una técnica de laboratorio en la que mediante un gel o medio líquido se desarrolla, transporta y almacena consigo especies de microorganismos. El desarrollo de una bacteria en medio de cultivo requiere de diversos factores como, los nutrientes para multiplicarse y también como pH, presión osmótica, potencial redox, hidratación, temperatura y la atmósfera adecuada.

Ya que no existen medios de cultivo universales, la elección los requerimientos nutricionales se consideran de acuerdo con la especie bacteriana, para que cubra todas sus necesidades, los medios de cultivo se clasifican según la tabla 4-1.

**Tabla 4-1:** Tipos de Medios de Cultivo.

<b>Medios de Cultivo</b>	<b>Descripción</b>
M. Selectivos	Antibióticos se colocan para hacer medios selectivos, se usan para inhibir le crecimiento de bacterias distintas a las deseadas.
M. de enriquecimiento	Favorecen el crecimiento de algún tipo de bacterias que se encuentran en minoría en un mix bacteriano.
M. de diferenciación	Diferenciar las bacterias que dan positiva en la reacción química, de las que se comportan de forma inerte.
M. de identificación	Estudian la acción de un solo tipo de bacterias, frente a un determinado sustrato.
M. de multiplicación	Permiten un máximo de aumento celular bacteriano en un mínimo tiempo.
M. de Conservación	Mantiene los microorganismos en el medio en que se siembran y mantienen a $+2 \pm 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$

**Fuente:** Alvarez et al., n.d.

**Realizado por:** Ana Argoti, 2018

### ***1.2.5 Pruebas Moleculares***

Como alternativas más precisas de identificación se utilizan análisis moleculares, en la que los genes son el método de caracterización en estudios taxonómicos, en el que el análisis del ARNr 16S el marcador inicial es el más utilizado para taxonomía bacteriana.

Sin embargo, en otras circunstancias, la alta homología genética, similitud entre el genoma de las especies, presente en determinados géneros bacterianos o cambios evolutivos hacen más difícil la identificación de especies. Pero se puede utilizar otros genes dianas para realizar asignación de especie. La Tabla 6-1 muestra técnicas de identificación moleculares (Bou, et.al., 2011).

Una secuencia específica de ácidos nucleicos y proteínas determina la filogenia de una especie, pero estas evolucionan por ello son consideradas relojes moleculares. Asumiendo que los cambios se producen linealmente en las secuencias de monómeros determinando la distancia evolutiva entre dos especies. (Rodicio & Mendoza, 2016).

**Tabla 5-1:** Métodos Moleculares de identificación bacteriana

<b>Herramientas Moleculares</b>	<b>Detalle</b>
ARNr 16S (rrs)	Polirribonucleótido codificado por el gen rrs o ADN ribosomal ARNr 16S (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. La secuencia del gen ARNr 16S presenta de forma aproximada 1500 pb.
16S-23S ARNr	Espacio entre genes ITS se presentan en un número variable en función del número de operones ARNr o alelos rrs, su alta diversidad observado en las ITS en diferentes géneros, especies y cepas, y en una misma cepa producido por variaciones en el número, tamaño y composición de las ITS.
ARNr 23S	Alternativa en los casos en los que la fracción 16 s no proporciona resultados aceptables.
rpoB (subunidad de la ARN polimerasa)	<p>Es una secuencia que codifica la ARN polimerasa, en bacterias es responsable de la síntesis del ARNm, ARNr y ARNt .Esta secuencia es apta para identificación debido a que solo hay una copia de esta secuencia genética en las bacterias, este sitio además contiene sensibilidad a rifampicina y otros inhibidores.</p> <p>Las secuencias del rpoB tienen mayor calidad y existen bases de datos actuales para identificación, su movilización de secuencias de aminoácidos, permite agrupación de especies y hace detectable errores de secuenciación producidos por codones finales erróneos.</p> <p>Consecuencia de que las sustituciones nucleotídicas que se producen son silentes (tercera posición del codón), y que por su función housekeeping probablemente no esté sometido a transferencia horizontal genética.</p>
gyrB (subunidad $\beta$ de la ADN girasa)	gen codificante, implicado en la replicación del ADN bacteriano.Su presencia en monocopia de gyrB permite la discriminación e identificación de especies fuertemente relacionadas pertenecientes a los géneros <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Vibrio</i> , y también enterobacterias, micobacterias y bacterias ácido lácticas.

Fuente: Bou et al., 2011

Realizado por: Ana Argoti, 2019

### **1.3. Microorganismos del Suelo**

La amplia diversidad de microorganismos que se encuentran en la fracción del suelo cumple una función elemental la cual es transformar componentes orgánicos e inorgánicos como minerales. Se conoce como micorizosfera a la interacción entre microorganismos encontrados en el suelo, puesto que es evidente que no se encuentran aislados unos de otros.

Estas funciones dan estructura y funcionamiento al suelo, facilitan la formación de la fracción arcillosa y húmica del suelo, degradando moléculas complejas de materia orgánica. Los microorganismos también se involucran en la aireación del suelo, la disponibilidad de agua y sales minerales.

El humus aprovechable es mineralizado, se le conoce como humificación de la materia orgánica y libera nitrógeno y otros nutrientes necesarios para las plantas. Los minerales solubilizados por microorganismos edáficos son K, Ca, Mn, Mg, etc.; así se vuelven disponibles y asimilables por las plantas. Además, varios grupos de bacterias simbiotes cumplen la función de fijar nitrógeno atmosférico en el suelo.

Existe una mayor concentración de microorganismos en la zona de las raíces, a esta se le llama rizosfera. Las raíces producen actividad bioquímica a través de exudados radiculares, esta se refiere del 10-50% de energía fijada por fotosíntesis. Compuestos carbonatados provenientes de exudados radiculares son nutrientes para microbios a cambio de proporcionar minerales a las plantas.

Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPR) son controlados por el nicho ecológico, sustrato, nutrientes disponibles, compuestos químicos inhibitorios en el suelo. Conjuntamente las bacterias fijadoras de nitrógeno realizan una función importante, estas bacterias las podemos encontrar libres o en simbiosis; en estado libre fijan nitrógeno en aerobiosis se llaman nitrobacterias, o en anaerobiosis como las bacterias de los géneros *Clostridium* y *Klebsiella*. (DE SALAMONE, 2011)

#### **1.3.1 Suelo de Páramo**

El páramo alto andino es un ecosistema de alta montaña, la vegetación que predomina son pastizales combinado con bosque nativo, así como también en los últimos años se hacen visibles especies introducidas en la zona, la altitud de los Paramos Andinos va desde 3000 hasta más de 4800 metros sobre nivel del mar, tienen una gran capacidad de retener agua por sus características fisicoquímicas que se ubican en tipología de suelos de andosoles los cuales son de origen volcánico, presenta densa vegetación herbácea, bajas temperaturas, el clima es frío y húmedo, existe presencia de neblina y lluvia así como también cambios bruscos de temperatura que

dependen mucho de la hora del día, especialmente de noche decae drásticamente la temperatura, lo mismo cuando existen condiciones de lluvia (Hedberg, 1992).

Por su cercanía a la línea del Ecuador la radiación solar es fuerte y casi permanente durante todo el año; durante el día, las variaciones de temperatura son mayores a 20°C, por estas características el Páramo Alto Andino es rico en variada diversidad de microorganismos, plantas y animales.

En Ecuador, el páramo se encuentra en las tierras altas de los Andes ocupando un área de aproximadamente 12,650 km<sup>2</sup>, alrededor del 5% del territorio. Ecuador es el país con la mayor cantidad de páramo con respecto a su extensión de tierra, aún se sabe poco sobre su fauna edáfica y riqueza. (Calderón, Jaramillo, Ríos, & Brito, 2016)

El suelo de páramo alto andino por su origen volcánico tiene la propiedad de acidez ya que su pH se encuentra entre 3.9 y 5.4, además presentan gran contenido de humedad por encontrarse en una zona con alto índice pluviométrico. Los suelos se caracterizan por su porosidad, lo que desencadena un elevado porcentaje de infiltración, y altos valores de conductividad hidráulica, por una elevada retención de agua, donde los primeros 30 cm de profundidad tienen una composición del 61% en volumen de agua. (Díaz-Granados, Navarrete, & Suárez, 2005)

Estos andosoles se caracterizan por presentar tonalidades variadas y mayor diferenciación en sus horizontes, en la mayoría de casos son suelos muy espesos, negros y rojos, los cuales son colores típicos de la hidromorfía con exceso de agua y con capacidades oxido reductoras de Hierro (Pascal Podwojewski & Poulénard, 2000).

El potencial redox del suelo depende del movimiento de elementos en el suelo, la oxidación hace perder electrones y en la reducción se adquieren. La oxido reducción es un proceso que ocurre simultáneamente y no existen electrones libres, este proceso permite la generación de energía por el transporte y flujo de electrones. Oxígeno (O), carbono (C), nitrógeno (N), azufre (S), hierro (Fe) y manganeso (Mn) son los elementos involucrados en la capacidad redox y determinan en gran parte del origen de suelos sulfatados ácidos (Gómez, Castro, & Malagón, 2005).

La capacidad (CIC), grado de saturación de bases (G.S.B%), carbono orgánico (%), y la relación C/N, materia orgánica y su velocidad de mineralización son factores diferenciadores de cobertura vegetal en páramos. (Quinteros, Tripaldi, & Ansaloni, 2012)

### ***1.3.2 Conductividad del Suelo***

La conductividad eléctrica del suelo se refiere a la capacidad que tiene el contenido acuoso del suelo para conducir corriente eléctrica, o cargas eléctricas a través de las sales disueltas que se encuentran en la fracción líquida del suelo, la presencia de iones, cationes (positivos), aniones (negativos) determina la conductividad eléctrica de los suelos. Existen varios factores de caracterización del suelo que influyen sobre esta propiedad; el tipo de sales en solución, la porosidad, textura, capacidad de infiltración, humedad del suelo y temperatura, estas usualmente dependen del contenido de arcilla que tenga el suelo.

Los suelos áridos con alto contenido de sales solubles y sodio intercambiable son los que presentan altos niveles de conductividad eléctrica. (Schaefer, Cosh, & Jackson, 2007).

El contenido elevado de Sodio en la composición del suelo puede afectar el índice de infiltración afectando al drenaje y estructura del suelo, llevándolos a ser inestables y con un mayor índice de toxicidad para la vegetación (Schaefer et al., 2007).

Además, Rietz & Haynes, (2003) denotan la importancia de la conductividad eléctrica, CE, en relación con el sodio ya que también expone una relación indirecta entre su concentración y el desarrollo de biomasa microbiana, es decir que mientras incrementa la salinidad, el metabolismo de las comunidades microbianas y su producción se ralentizan, lo cual reduce la función del sistema microbiano.

De modo similar un análisis de las propiedades físico químicas del suelo puede ayudar a determinar la CE dentro de una porción de suelo, según su composición en fracción líquida del mismo tales como; pH, materia orgánica, iones de fósforo, calcio, hierro, potasio, magnesio, manganeso entre otros, su composición C/N, estos parámetros tanto como la conductividad eléctrica ejercen una relación con la emisión del mayor voltaje eléctrico. (Parkash, 2015)

El intercambio catiónico puede ser explicado como la capacidad de sustituir o cambiar partículas de materia orgánica por cationes retenidos en las arcillas, es por esto que se dice que son intercambiables, como lo que sucede en suelos ácidos el Al y Fe intercambiables pueden reaccionar con fosfatos presentes en los suelos, es así como la fijación de Hierro en el suelo incrementa a causa de esto el intercambio catiónico y la fijación en el suelo está determinado por el contenido y mineralogía de las arcillas, los iones intercambiables y materia orgánica, suelos como los de páramo que son formados de ceniza volcánica tienen la capacidad de fijar más fósforo (Llambí, et.al., 2012).

#### **1.4. Bioelectricidad**

Se entiende como bioelectricidad a los potenciales eléctricos y corrientes eléctricas producidas por reacciones de organismos vivos, estos son generados por una variedad de procesos biológicos, tales como los biopotenciales alcanzados a través de la actividad metabólica bacteriana, reacciones de oxidorreducción que generan un flujo de electrones y protones, y que conducen a generar bioelectricidad en CCMs. (Rahimnejad, et.al., 2015)

Según Castillo & Vargas, (2017) todas las bacterias con sus reacciones metabólicas obtienen energía, degradando sustratos orgánicos e inorgánicos, estos se desplazan por una membrana y con la implementación de conductores externos se pueden captar este flujo de electrones generando energía eléctrica.

#### **1.5. Celdas de Combustible Microbiano (CCMs)**

Una Celda de Combustible Microbiano es un artefacto que utiliza las capacidades eléctricas que se generan de las reacciones biológicas de microorganismos, que convierten la energía disponible de un sustrato determinado. Cuando las bacterias cambian del aceptador de electrones natural, como lo es el oxígeno o el nitrato, a un aceptor insoluble, como el ánodo de la CCM donde se da la transferencia. (Rabaey & Verstraete, 2005)

Esta transferencia puede ocurrir en la membrana de tejido de fibra de carbono ya que los componentes asociados a esta permiten la captación del flujo de electrones, los mismos luego fluyen a través de una resistencia a un cátodo, en el que se reduce el aceptor de electrones y como resultado de esta digestión anaeróbica, una CCM crea electricidad.

Las ventajas de utilizar este tipo de tecnología es que se ven direccionada a la conversión directa e inmediata de la energía del sustrato a electricidad utilizable, lo cual se ve identificado como una conversión de energía de considerable eficiencia. Además, las CCMs funcionan eficientemente a temperatura ambiente sin necesidad de aclimatación, inclusive las mismas funcionan a bajas temperaturas lo que las distingue de otros procesos bioenergéticos.

Los CCMs no requieren de gasto energético para su funcionamiento, estas lo producen, tampoco lo requieren para aireación puesto que el proceso aeróbico se realiza pasivamente en el cátodo que se mantiene en contacto con el aire, tienen potencial para expandir la diversidad de combustibles que utilizamos para satisfacer nuestra energía. (Rabaey & Verstraete, 2005)

Una CCM típica consta de dos tipos de electrodos (ánodo y cátodo), en los cuales, dependiendo del diseño y de las condiciones operativas, se forman biopelículas microbianas, en uno u otro o en ambos electrodos. Collazos & Montaña, (2017) describen que los microorganismos presentes en la biopelícula anódica oxidan catalíticamente los sustratos presentes, en el caso de que sean compuestos orgánicos, generan protones, CO<sub>2</sub>, y electrones, que son transferidos directa o indirectamente al ánodo; éstos son llevados hasta el cátodo a través de un circuito externo donde participan en la reducción del oxígeno junto a los protones que fueron liberados en el ánodo, formando agua.

Por otro lado CCMs alimentadas con material inorgánico no son tan efectivos como la utilización de residuos orgánicos, sin embargo en el proceso de CCM si se hace uso de algunos diseños con ácido sulfhídrico como combustible de la celda, o iones metálicos para mejorar la cinética de la reacción catódica, al actuar como mediadores de la reducción del oxígeno disuelto. (Zhang & Tremblay, 2016)

#### **1.6. Consorcios microbianos y sinergismo**

El sinergismo es la relación que existe en un consorcio microbiano cuando varios microorganismos de la misma o diferentes especies actúan benéficamente en la actividad de las unas a otras, es decir donde microorganismos a menudo de diferentes géneros, cooperan entre sí por un bien en común, el de mantener el consorcio en un estado de supervivencia.

Esta relación indica que ambas poblaciones se benefician de la unión, pero esta sinergia no es obligatoria, estas poblaciones microbianas pueden vivir independientemente de la presencia de otras, el sintropismo es un tipo de sinergismo que involucra alimentación cruzada, cuando dos poblaciones suplen su necesidad nutricional unas a otras.

Se ha establecido que las bacterias del suelo no actúan de manera aislada, es de esperar que dentro del mecanismo de funcionamiento de la CCM rija el mismo principio, es decir actúan aisladamente con reacciones simultaneas de sinergismo y antagonismo, que contribuyen al buen funcionamiento y equilibrio del sistema edáfico. (Avellaneda-Torres et al., 2012)

## 1.7. Bacterias Generadoras de Electricidad

“Una característica de los seres vivos es la capacidad para sintetizar sus propios constituyentes a partir de nutrientes que toman del medio externo”. Varela, (2004) Reacciones de óxido-reducción se rigen bajo fenómenos de generación energética en casi todas las formas de vida, aunque muchos organismos se valen de oxidantes y reductores solubles, algunos microorganismos pueden tener acceso a la fase sólida como aceptores de electrones o donadores mediante transferencia de electrones extracelular. (Bose, et al., 2014)

Se sabe muy poco acerca del mecanismo asociado a la captación de electrones a través de Transferencia Extracelular de Electrones (TEE) microbiana, la especie descubierta *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 oxida el hierro, siendo fotoautótrofa, acepta electrones de un electrodo cargado, y su única fuente de carbono es el CO<sub>2</sub>, esta cuenta con un sistema de codificación de proteínas especialmente de crecimiento fotoautótrofo por oxidación del hierro ferroso. (Bose et al., 2014)

Estudios muestran que las comunidades microbianas mixtas, es decir especies microbianas en consorcio proveen las reacciones catódicas en los sistemas bioelectroquímicos (BESs), lo que involucra microbios en la captación de electrones. Se han identificado como especies que pueden tomar corriente de un electrodo a: *Sporomusa ovata*, *Mariprofundus ferrooxydans*, *Shewanella oneidensis*, estudios genéticos en varias especies del Género *Shewanella* muestran que sus genes están involucrados en la captación de electrones. (Bose et al., 2014)

Los microorganismos con sus desarrolladas y evolucionadas capacidades metabólicas pueden usar cualquier sustrato asimilable por ellas para la generación energética, con ello se llega al análisis de que las actividades metabólicas que suceden en un microorganismo influyen en el flujo de materia y energía a través de la biosfera, y forma parte fundamental de los ciclos biogeoquímicos. (Bose et al., 2014)

## 1.8. Biofilms

La noción de un biofilm se basa en individuos unicelulares (bacterias, hongos o levaduras) formando una comunidad de estructura compleja y laminar desarrollando sinergismo y heterogeneidad funcional. (Bordi & de Bentzmann, 2011)

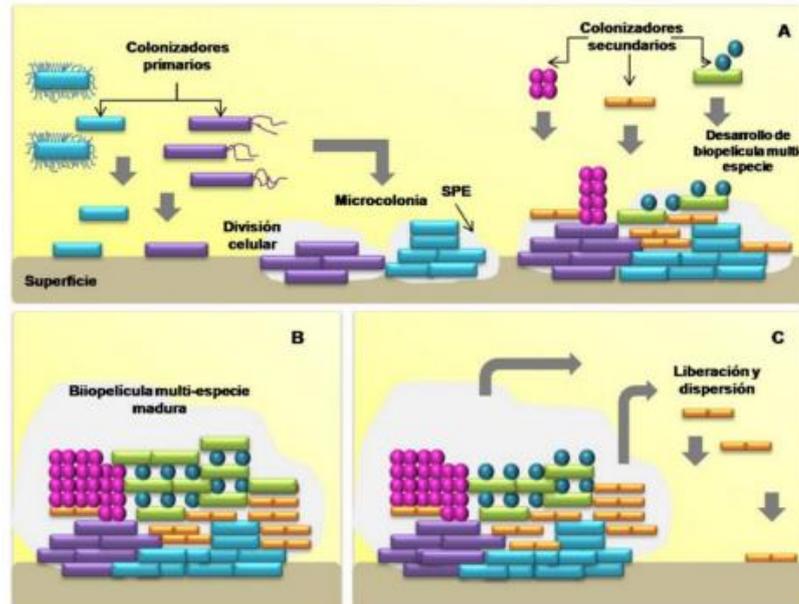
Se conoce como biofilm o "biopelícula" al conglomerado de microorganismos de diversas especies dispuestos en forma de lámina siendo comunidades tridimensionales que se encuentran impregnados en una matriz extracelular, microorganismos usan estas formaciones como estrategia para sobrevivir en ambientes hostiles, la formación de estas está condicionada por un conjunto de respuestas atribuidas a señales ambientales, el estudio de estas láminas permite comprender la forma de colonización de varias especies, resistencia a antibióticos y otros mecanismos compartidos. (Loera, et al., 2012), (Ganguly & Mitchell, 2011)

"Las especies que conforman una biopelícula multi-especie viven en un tipo particular de simbiosis, que ha sido denominado socio microbiología" (Loera et al., 2012). Esto indica que en funcionamiento como comunidad activa, existen relaciones de sinergismo y antagonismo ocurriendo al mismo tiempo, con criterios de funcionamiento que aseguran la supervivencia del consorcio (Bordi & de Bentzmann, 2011).

En este tipo de comunidades lo que prima es el crecimiento, la reproducción, estabilidad estructural, reserva energética y transporte de sustancias, según Bowen & Koo, (2011) la formación de este biofilm está condicionado por respuestas a señales ambientales, esta estructura permite resistencia al stress ambiental como cambios bruscos de temperatura y pH, falta de sustrato, desecación, perpetuando la supervivencia microbiana.

### ***1.8.1 Formación de Biofilms.***

Como se menciona en el apartado 1.3. las señales ambientales y también interacciones inter e intraespecíficas guían la conglomeración de comunidades microbianas, en lo que se conoce como biopelícula multi especie, en la etapa inicial es la adherencia sobre una superficie inerte o viva, este proceso inicia con la coagregación, en la cual se juntan bacterias asociadas pero de especímenes distintas, moléculas llamadas adhesinas permiten los agregados sucesivamente, al principio se adhieren colonizadores primarios y se replican en microcolonia que cubren toda la superficie colonizada, posteriormente esto ayuda a colonizadores secundarios, induciendo así la formación de biopelícula multi especie. (Bowen & Koo, 2011)



- (A) Adherencia de colonizadores primarios y secundarios a la biopelícula.
- (B) Maduración de la biopelícula, por la ayuda de sustancias poliméricas extracelulares (SPE).
- (C) Dispersión de células y c.

**Figura 1-1:** Formación de una biopelícula multi especie.

Fuente: Rickard, et all 2003

La matriz extracelular son imprescindibles para la formación de biopelícula, macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y otros productos procedentes de la lisis bacteriana, que en conjunto se denominan sustancias poliméricas extracelulares (SPE). (Trappetti, et. al., 2011)

La conformación estructural de la matriz no es sólida, las bacterias conglomeradas viven en terrones celulares que se expanden de manera tridimensional a lo largo de la superficie del biofilm. (Loera et al., 2012)

### ***1.8.2 Fases de Crecimiento microbiano en biofilms***

El crecimiento bacteriano es el aumento de todos los componentes que constituyen la célula de manera progresiva y ordenada, es un proceso complejo en el que se replican todas las estructuras celulares a partir de la captación de nutrientes del medio externo. A este proceso que se lleva a cabo, se le conoce como biosíntesis, en el cual las bacterias son capaces de obtener componentes de su entorno que aseguren su supervivencia para crecer, desarrollarse y multiplicarse. (Varela, 2004)

El crecimiento de los microorganismos se rige por un patrón, una curva de crecimiento de una población bacteriana. Esta curva se divide en cuatro fases denominadas fase de latencia, fase exponencial o fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte.

#### *1.8.2.1 Fase de Latencia*

La fase de latencia es como el proceso de adaptación de los microorganismos, porque el crecimiento microbiano no comienza inmediatamente una vez inoculada la especie de interés, este tiempo es llamado latencia. En esta fase se presenta una transición de los microorganismos, un acondicionamiento a su nuevo ambiente. En esta fase no hay incremento en el número de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células. (Willenegger, 1990)

También se observa latencia cuando el inóculo está formado por células que han sido dañadas pero no muertas, bien sea por tratamiento con calor, radiaciones o sustancias químicas, puesto que requieren reparar dicho daño. En el caso de que una población se transfiera de un medio de cultivo rico a un medio pobre, se observa latencia debido a que es necesario que se generen una serie de enzimas para el crecimiento y síntesis de metabolitos esenciales que no se encuentran en el medio. (Willenegger, 1990)

#### *1.8.2.2 Fase exponencial o fase logarítmica*

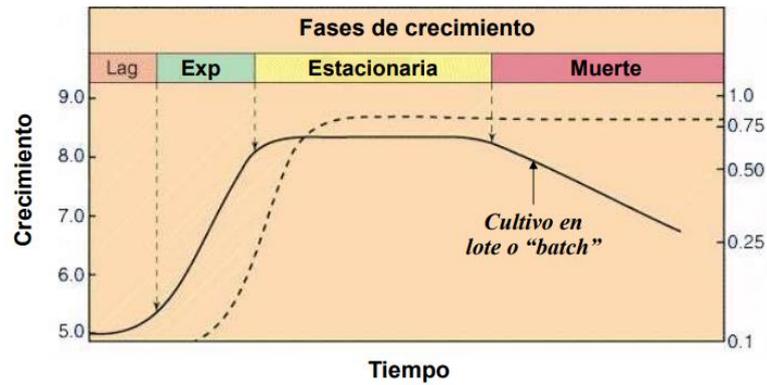
Es el período de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir que cada vez que pasa un tiempo la población se duplica. La velocidad de crecimiento depende de factores como; temperatura, pH, composición del medio de cultivo, entre otros. (Willenegger, 1990)

#### *1.8.2.3 Fase estacionaria*

Es el período en el que se detiene el crecimiento poblacional, por el agotamiento de recursos, acumulación de desechos, o copamiento del espacio físico. En esta fase se encuentra el equilibrio entre la incorporación de sustratos y el desarrollo de microorganismos, y por lo tanto la producción de voltaje. (Willenegger, 1990)

#### 1.8.2.4 Fase de muerte

Comienza una disminución progresiva de células viables, en esta fase las células mueren ya no producen bioelectricidad. (ver figura 4-1) Esta situación es ocasionada por el agotamiento del nutriente debido al sistema Batch que existe dentro de la CCMs, un cultivo crecimiento de microorganismos en un volumen fijo de nutrientes que continuamente es agotado hasta su muerte, se ejecuta sin intercambio de materia con los alrededores (Muñoz, 2013). La producción de voltaje cae drásticamente hasta alcanzar el cero.



**Figura 2-1:** Fases de Crecimiento Microbiano

Fuente: Schlegel, 1997

## CAPITULO II

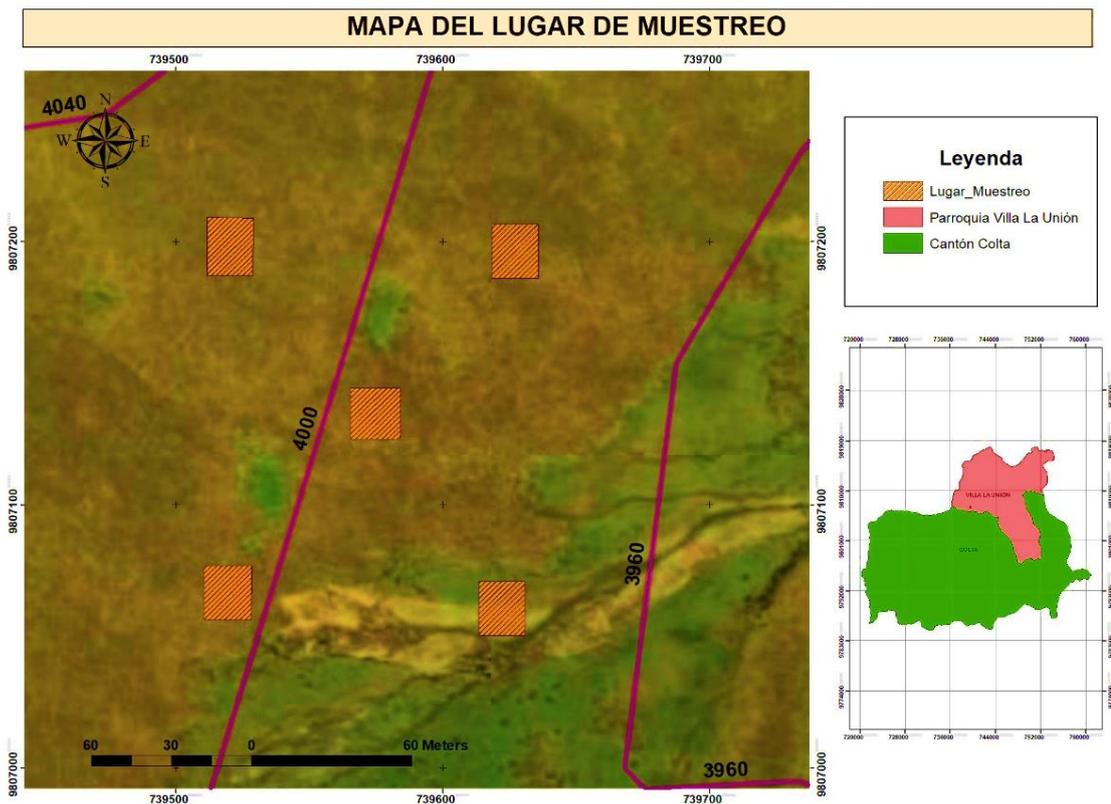
### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Sitio de muestreo del Suelo

El suelo utilizado como inóculo para producir bioelectricidad en CCMs, proviene del punto de muestreo en ecosistema de páramo alto andino, localizado en la zona de la Parroquia Villa la Unión, Cantón Colta, en la región Andina de la Provincia de Chimborazo.

Se consideraron factores como: cobertura vegetal y altitud, debido a que se seleccionó el sitio con un mayor nivel de conductividad por la capacidad que tienen estos suelos al tener mayor concentración de sales solubles presentes en su fracción líquida que por lo tanto tienden a producir un porcentaje más elevado de intercambio iónico aprovechable por una-CCM.

El suelo utilizado en el experimento fue georreferenciado, y se muestran las coordenadas UTM, este: 739522 mE, Norte: 9806929 mS, a una altitud de 4000 m.s.n.m. Mediante una estación meteorológica portátil Krestel se obtuvieron los siguientes parámetros climatológicos del sitio: velocidad y velocidad max.del viento, temperatura ambiental y temperatura del viento frio, índice de estrés térmico, punto de rocío, temperatura en bulbo húmedo y presión barométrica.



**Figura 1-2:** Mapa del Lugar de la toma de muestras en Parroquia Villa la Unión, Cantón Colta, en la región Andina de la Provincia de Chimborazo.

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

### **2.1.1 Parte Experimental**

La parte experimental del trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias- ESPOCH -Riobamba.

### **2.2. Preparación de la muestra**

Con el propósito de obtener una muestra representativa de la zona, se realizó una muestra compuesta de los puntos de muestreo determinados en el lugar de estudio, con un muestreo aleatorio simple considerando una muestra compuesta de 1 kg por variación de profundidad (20 cm y 40 cm), quitando la vegetación superficial, y evitando la presencia de raíces.

Se tomó cinco submuestras a las diferentes profundidades por cada parcela seleccionada, un total de 5 parcelas es decir un total de 25 submuestras de cada profundidad; las mismas que fueron colocadas en fundas ziploc estériles previamente etiquetadas y transportadas en cadena de frío

(cooler), para luego ser trasladadas al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias para su respectivo análisis.

La muestra tomada se homogenizó y tamizo en un tamiz de (2 mm), de esto se tomo 1Kg por cada suelo de distinta profundidad (20 cm- 40 cm) y se envió la muestra bajo cadena de frío en un cooler, para evitar pérdida de humedad y modificaciones de temperatura, esta muestra fue enviada al laboratorio de identificación molecular y análisis genéticos IDgen. Otro kg de muestra se envió a Agrocalidad, laboratorio de suelos, foliares y aguas, donde se analizaron parámetros fisicoquímicos. La muestra restante se quedó en el laboratorio para la incorporación en CCMs como parte de su inóculo microbiano y para pruebas fisicoquímicas y bioquímicas posteriores.

### **2.2.1 Caracterización fisicoquímica de la muestra del suelo.**

Los parámetros fisicoquímicos que se analizaron en los laboratorios de Agrocalidad, laboratorio de suelos foliares y aguas para determinar la caracterización del suelo fueron: conductividad eléctrica (CE) y porcentaje de humedad, todas las medidas se realizaron por triplicado. Otros parámetros analizados como pH, materia orgánica, Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio, Cobre, Zinc, siguiendo los respectivos protocolos de análisis como se muestra en la tabla 1-2.

**Tabla 1-2:** Protocolo de análisis físico-químicos de la muestra de suelo

Parámetro	Método de Ensayo	Referencia		
		Bajo	Medio	Alto
pH	Electrométrico PEE/SFA/06 EPA 90450			
Materia Orgánica	Volumétrico PEE/SFA/09	<1.0	1.0-2.0	>2.0
Nitrógeno	Volumétrico PEE/SFA/09	0-0.15	0.16-0.3	>0.31
Fósforo	Colorimétrico PEE/SFA/11	0-0.10	11.00- 20.0	>21.0
Potasio	Absorción Atómica PEE/SFA/12	<0.2	0.2-0.38	>0.4
Calcio	Absorción Atómica PEE/SFA/12	<1.0	1.0-3.0	>3.0
Magnesio	Absorción Atómica PEE/SFA/12	<0.33	0.34- 0.66	>0.66
Hierro	Absorción Atómica PEE/SFA/13	0-20.0	21.0- 40.0	>41.0

Manganeso	Absorción Atómica PEE/SFA/13	0-5.0	6.0-15.0	>16.0
Cobre	Absorción Atómica PEE/SFA/13	0-1.0	1.1-4.0	>4.1
Zinc	Absorción Atómica PEE/SFA/13	0-3.0	3.1-6.0	>6.1

Fuente: AGROCALIDAD

Realizado por: Ana Argoti, 2019

### ***2.2.2 Determinación de conductividad eléctrica***

Para llevar a cabo el ensayo de conductividad eléctrica de la muestra de suelo de páramo se realizó el siguiente procedimiento; se pesaron 20,00 g de suelo previamente tamizado (utilizando una fracción de partículas inferiores a 2mm de las muestras pretratadas según la norma UNE77303). Después se transfirió la muestra pesada a un recipiente de agitación, añadiendo 100 ml de agua a una temperatura de 20°C ± 1°C, cerrando el recipiente y colocándolo en posición horizontal en el agitador magnético, se agitó durante 30 minutos. Se filtró directamente a través de papel filtro, y se midió la conductividad con un conductímetro Thermo Fisher Scientific.

### ***2.2.3 Determinación de porcentaje de humedad.***

Para determinar el porcentaje de humedad se usó el método gravimétrico indirecto por desecación. El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa con o sin utilización complementaria de vacío, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra.

Para determinar el porcentaje de humedad a partir de la pérdida de peso en la muestra, se empleó la ecuación 1.1

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(M_1 - M_2) \times 100}{M}$$

**(Ec: 1.1)**

Donde:

M<sub>1</sub>= peso del papel más la muestra húmeda

M<sub>2</sub>= peso del papel más la muestra seca

M= peso de la muestra

## 2.3 Metodología de Identificación de ADN total



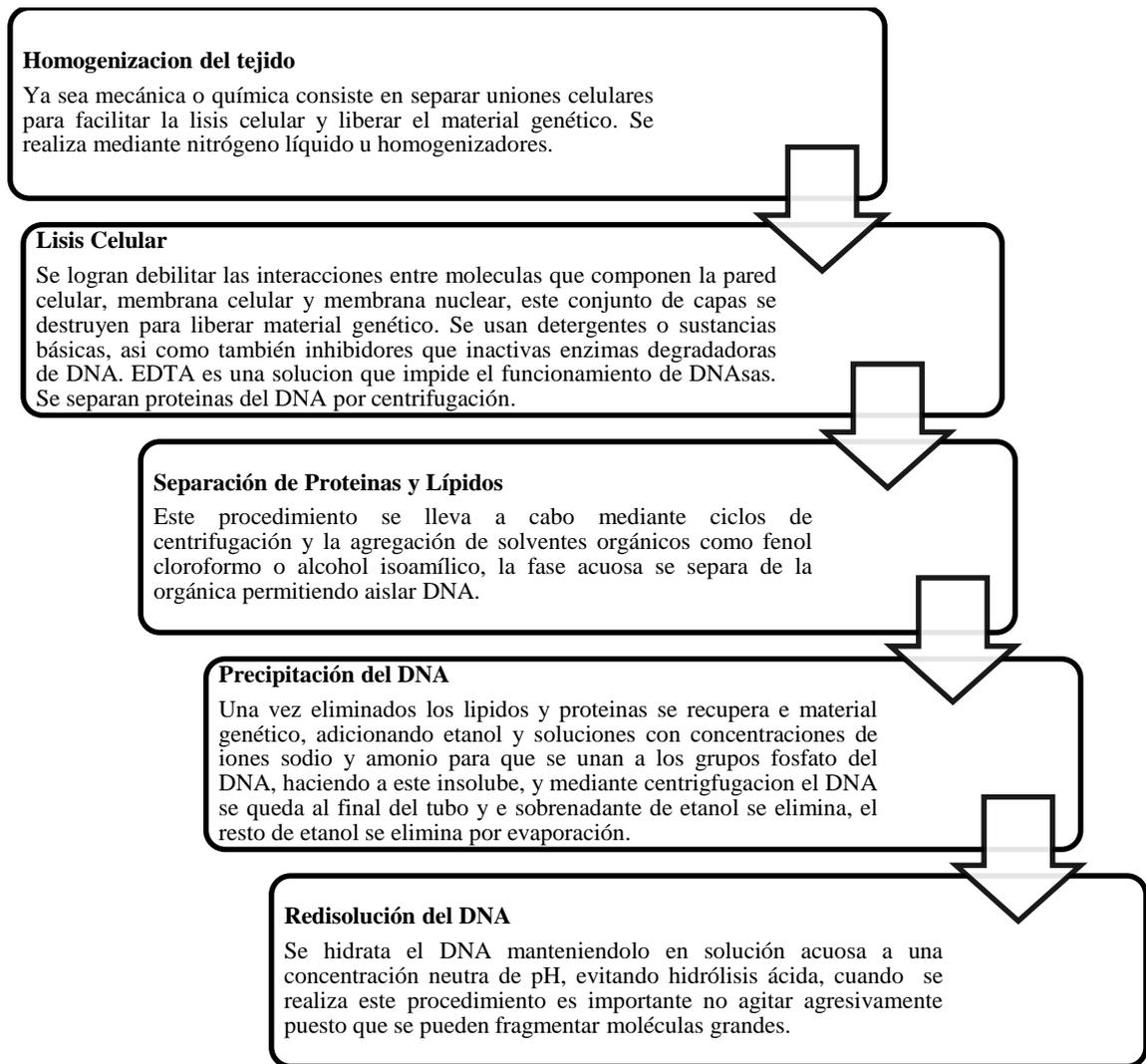
**Figura 2-2:** Proceso para la identificación de DNA

Realizado por: Ana Argoti, 2019

### 2.3.1 *Extracción y purificación de DNA*

Se siguió las instrucciones del Kit SurePre Soil DNA Isolation (especificación Fisher Bioreagents), que es un método conveniente para aislar y purificar DNA total del microbiota de suelos y sedimentos. La extracción y purificación de DNA consiste en obtener material genético y purificarlo para su posterior identificación, en este sentido se utilizó 200 gramos de la muestra de suelo previamente homogenizada.

Para la caracterización de DNA se aíslan y purifican sus moléculas basándose en sus características fisicoquímicas a nivel molecular. En general los tratamientos tradicionales para obtener una adecuada cantidad y calidad de DNA consisten de cinco etapas primordiales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución o suspensión del DNA. A continuación, en la figura 3-2 se muestra un esquema de las etapas de tratamiento del DNA.



**Figura 3-2:** Proceso de extracción y purificación de DNA

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

**Fuente:** (Alejos, L. Aragón, M. Cornejo, A.1995)

### 2.3.2 *Replicación del DNA (librerías genéticas)*

El análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados.

Por ello con el producto de DNA purificado se construyeron librerías genéticas utilizando la herramienta Nextera XT Index Kit V2 (Illumina), que utilizó la Polimerasa Herculasa II, esta proteína produjo altos rendimientos en la producción de regiones de DNA complejas a través de PCR, además esta proteína permitió el uso de ciclos más rápidos de replicación, y se produjo un alto rendimiento de fragmentos de baja abundancia de entre 0.9-6 kb producido en un tiempo de 30 seg / kb aproximadamente.

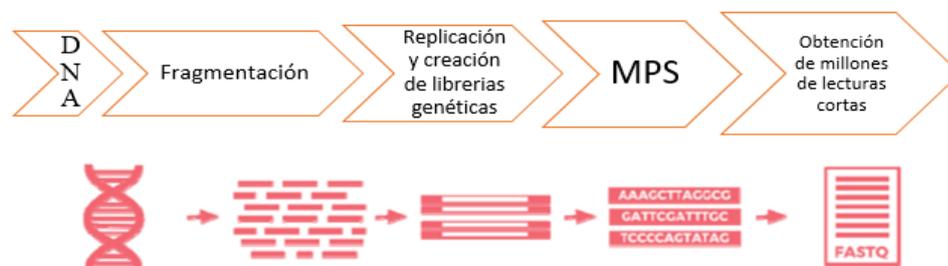
### 2.3.3 Utilización de Marcadores

En paralelo se prepararon librerías genéticas mediante secuenciación metagenómica en base al protocolo 16S de Metagenomic Sequencing, estos estudios se realizaron mediante 16S rRNA estas regiones variables fueron utilizadas en clasificaciones filogenéticas, para género y especie de varios microorganismos.

Este protocolo permitió amplificar regiones del DNA con cebadores o marcadores específicos de la región donde estas secuencias cortas de DNA de cadena simple se hibridaron con el DNA de la muestra y definieron la región amplificada. Resultando en un conjunto de secuencias de DNA como resultado de la PCR. Se utilizó índices Nextera XT, de hasta 96 (muestras indexadas), para agrupar los resultados de la construcción de librerías. Posteriormente se utilizó la base de datos Greengenes e Illumina para secuenciación, MiSeq Reporter o BaseSpace como bases de datos que mostraron los resultados a nivel de género y especie.

### 2.3.4 Secuenciación masiva

Se utilizó secuenciación masiva, secuenciación de nueva generación (NGS) esta sirvió para amplificar los segmentos de DNA generados anteriormente como producto de la PCR, que requiere la secuenciación masiva paralela (MPS), que consistió en separar al DNA en pequeños segmentos y secuenciarlos mediante PCR procesando todos a la vez es decir bajo la generación de lecturas pareadas en la plataforma MiSeq de Illumina, esto permitió analizar DNA y generar un fragmento de la sucesión del genoma de un individuo. Mediante la técnica de secuenciación Illumina se dieron lecturas de hasta 2 x 300 pb, 15Gb y 25 millones de lecturas con el modelo MiSeq.



**Figura 4-2:** Sucesión de procesos a llevar a cabo en secuenciación masiva de DNA.

Realizado por: Ana Argoti, 2019

Posteriormente con la herramienta Trimmomatic se realizó la corrección de errores de secuenciación, esta herramienta sirve para eliminar primers y adaptadores que deben limpiarse ya que son productos de la secuenciación de DNA. Seguido de esto las secuencias se introdujeron a bbmerge, el cual es un programa que está diseñado para combinar dos lecturas pareadas (las cuales son proporcionadas de ambos extremos) de cada fragmento en una sola lectura. Se agruparon las lecturas con Vsearch, que es una herramienta de procesamiento de datos de secuencia de nucleótidos de genómica de población, metagenómica y genómica. Y mediante swarm se agrupan secuencias este es un programa de inteligencia artificial, que está inspirada en el comportamiento de insectos como; hormigas, abejas, avispas, termitas. Consecutivamente con Uchime, el cual es un programa que detecta secuencias quiméricas con dos o más segmentos, este utiliza una base de datos libres de quimeras (es un individuo que tiene más de una población de células genéticamente diferenciadas originadas a partir de más de un cigoto) explorándolas con datos de abundancia, para buscar secuencias similares y se eliminaron los segmentos que contienen secuencias de diferentes especies, llamadas quiméricas. Luego se compararon con bases de datos para buscar secuencias similares con el 97% en las bases de datos: RefSeq 16S, UNITE ITS, BLAST+. Los resultados se muestran con Krona, en el Anexo 1.

Detecta secuencias quiméricas con dos o más segmentos. UCHIME utiliza una base de datos de secuencias libres de quimera o detecta quimeras de novo explotando datos de abundancia. UCHIME tiene mejor sensibilidad que ChimeraSlayer (anteriormente el método de base de datos más sensible), especialmente con secuencias cortas y ruidosas

## **2.4 Configuración de las CCM**

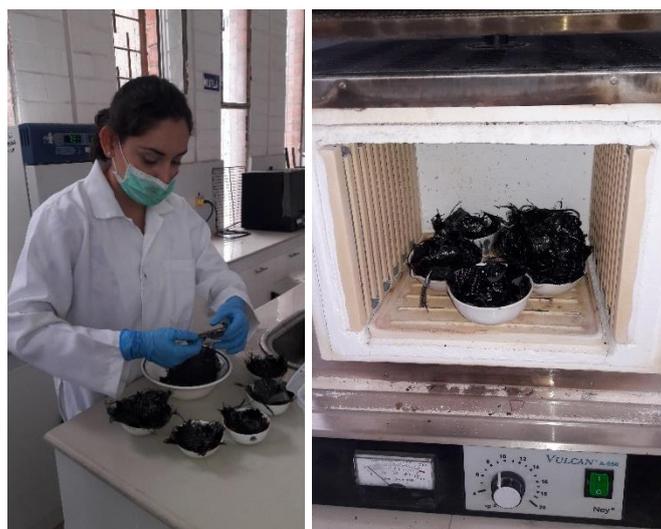
Las Celdas de Combustible Microbiano fueron construidas de material acrílico de 3 mm de grosor dispuesto en una configuración cúbica, de cámara simple con el cátodo parcialmente expuesto al aire, y el ánodo con una configuración anóxica. Las CCCM constan de una entrada y salida adecuadas de tapones de caucho para dar alimentación, es decir suministrar solución acuosa en caso de evaporación del componente líquido. Está configurado en un sistema de tipo Bach, en su estructura superior se encuentra un tejido de fibra de carbono, destinado a funcionar como membrana de intercambio catiónico, compactada entre dos cauchos y una cubierta de papel celofán para impedir el paso del aire a este compartimento. Todo este sistema se encuentra asegurado por 8 tornillos galvanizados alrededor de la configuración cúbica. Se realizaron pruebas de fugas en las celdas posteriormente del ensamblaje de las mismas como se observa en el Anexo 2.

#### **2.4.1 Esterilización de material usado en configuración de CCM**

Para esterilizar se preparó una solución de 1 litro de hipoclorito de sodio al 5 %, y se dejaron todos los materiales (acrílico, cauchos, celofán, alambre de acero inoxidable) sumergidos por un lapso de una hora para la construcción de celdas incluyendo; Posteriormente se sumergió todos estos materiales en agua destilada por 24 horas, realizando varios lavados para eliminar la solución clorada, y se dejó secar los materiales dentro de la cámara estéril e isobárica para preservar la esterilidad, con esta técnica se eliminó el 99% de todas las bacterias y patógenos presentes en los materiales.

#### **2.4.2 Pretratamiento de membrana**

La fibra de tejido de carbono se trató con el fin de eliminar impurezas y mejorar la formación de biopelículas. Primero la membrana del ánodo se sumergió en acetona industrial durante toda la noche, a la mañana siguiente se los lavó con agua destilada de 5 a 6 veces para eliminar los restos de acetona. Luego se elaboró una solución de peroxidisulfato de amonio (50 g/250 mL) en la cual se sumergieron las membranas ya enjuagadas con agua destilada y se esperó un tiempo de reposo de 15 minutos, posteriormente se preparó una solución de ácido sulfúrico concentrado al 96% y se dejó sumergidas por 15 minutos más, después se calentaron durante 30 minutos en un horno mufla a una temperatura de 450 ° C, y una vez a temperatura ambiente se los almacenó en fundas ziploc para conservar. Simultáneamente para el pretratamiento de las membranas de los cátodos se sumergen en agua destilada durante una noche para eliminar las impurezas.



**Figura 5-2:** Pretratamiento de las membranas.

Realizado por: Ana Argoti, 2019

### 2.4.3 Determinación de sustratos y minerales

Para la determinación de sustratos y minerales se empleó una combinación de residuos frutales y vegetales, en relación 50:50 peso, colocando 1.5 g de frutas en proporciones iguales (Naranja: *Citrus sinensis*, Banano: *Musa acuminata L.*, y Manzana: *Pyrus malus L.*), además de 1,5 g de vegetales de las especies (Cascara de arveja: *Pisum sativum L.*, Haba: *Vicia faba L.*, Zapallo: *Cucurbita máxima Duchesne*), estos residuos fueron previamente cortados en pedazos pequeños de un diámetro aproximado de 3 mm.

Además se preparó una solución mineral de Cloruro de Sodio al 0.05% aforadas en 100 mL de agua destilada, y se colocó 5mL de esta solución en cada celda. Para completar el resto del volumen de la celda se utilizó agua (Vivant) cuya composición físicoquímica es: en turbiedad 0.103 NTU, sólidos totales disueltos 6,00 mg/l, pH a 20°C es 6,46.



**Figura 6-2:** Incorporación de sustratos y minerales

Realizado por: Ana Argoti, 2019

### 2.4.4 Incorporación de inóculos

El inóculo utilizado en la cámara anódica de las CCMs provino de suelos de páramo no intervenido, debido a los voltajes relevantes obtenidos en investigaciones anteriores que estos generaron (Logroño, 2015). Se pesó 3 g de dicho suelo para mantener una relación de 1:1 con la mezcla de frutas-vegetales, con la función de convertirte en sustrato para suplir como fuente nutricional de las bacterias del inóculo.



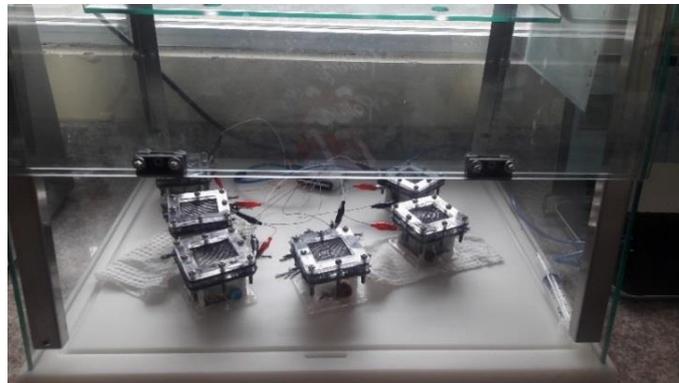
**Figura 7-2:** Inoculación de suelo en la celda

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

#### ***2.4.5 Identificación del sistema de adquisición de datos***

La recolección de datos fue propiciada por un sistema de adquisición de datos de marca DAQ-NI USB-6009 de 8 entradas analógicas y 14 bits de la empresa National Instruments, operada bajo el programa LabView el cual recogía periódicamente los datos bajo un intervalo de tiempo de 1 minuto, en un lapso de 16 días.

Se recolectaron los datos de 6 celdas de combustible microbiano, 2 con inóculo con suelo de páramo (20cm de profundidad) con un grupo de control; 2 con inóculo con suelo de páramo (40cm de profundidad) con un grupo de control.



**Figura 8-2:** Recolección de datos

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

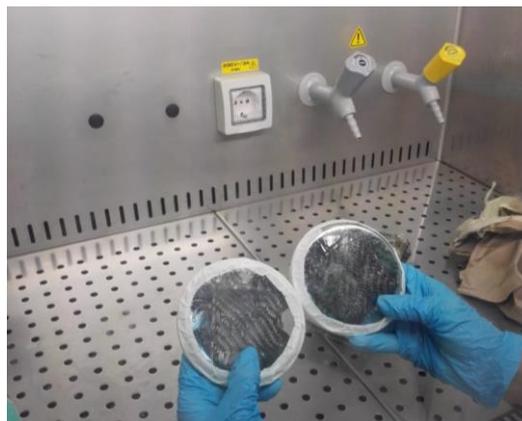
## 2.5 Análisis Macroscópico

### 2.5.1 Formación del Biofilm

Bajo las condiciones de esterilización adecuadas en una cámara isobárica se abrieron las celdas para extraer con precaución el tejido de fibra de carbono de la membrana del ánodo, este fue almacenado en fundas ziploc previamente etiquetadas. Con el objetivo de presenciar la formación del biofilm en el tejido de fibra de carbono mediante la utilización de un microscopio electrónico de barrido tipo SEM con analizador EDS, posibilitó observar y caracterizar la superficie del tejido a una amplitud desde 500  $\mu\text{m}$  hasta 2  $\mu\text{m}$ . Este procedimiento se realizó para observar la formación de biofilm en dos celdas de inóculo de suelo con profundidades diferentes. En esta fase se observó la adhesión de varias especies bacterianas a la fibra formando una biopelícula llamada biofilm que se desarrolla cuando los microorganismos llegan a su fase de crecimiento exponencial.

### 2.5.2 Preparación de la muestra para análisis genéticos

Para extraer la muestra, bajo las condiciones de esterilización adecuadas en una cámara estéril isobárica se abrieron dos celdas de diferentes profundidades y se extrajo el tejido de fibra de carbono del ánodo y se lo colocó en cajas Petri previamente esterilizadas y etiquetadas. Para su envío a los laboratorios de análisis moleculares y genéticos de IDgen donde se analizó la muestra mediante técnica de secuenciación masiva por perfiles taxonómicos, véase el apartado 2.3.4 para procedimiento de análisis según secuenciación masiva.



**Figura 9-2:** Extracción de membrana para analizar biofilm

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

### 2.5.2.1 Secuenciación Masiva del Biofilm por perfiles taxonómicos.

Para estudiar la composición microbiana del biofilm y determinar la identidad de una especie, se realizó la secuenciación mediante amplificación de genes de utilidad taxonómico, el gen rRNA 16S para bacterias, ofreciendo las proporciones de identidad de distintos taxones de microorganismos dentro de una misma muestra identificándolos mediante la comparación con secuencias de especies conocidas en bases de datos de referencia.

### 2.5.2.2 Pruebas bioquímicas de identificación

Posteriormente al aislamiento de la cepa bacteriana y su identificación morfológica se hicieron pruebas bioquímicas mostradas en la tabla 2-2. Se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos. Se usaron los medios de identificación; Agar Urea de Christensen, Agar Manitol, Citrato de Simmons, pruebas TSI, y Agar SIM- Nahrboden para movilidad e Indol. Se prepararon 5 tubos de 5 mL (llenando la muestra hasta 3mL) con las pruebas respectivas por un total de 14 muestras (cepas distintas), la preparación de los medios se dio en condiciones estériles.

**Tabla 2-2:** Pruebas Bioquímicas, fundamento, preparación e identificación potencial de microorganismos.

Prueba B.	Identifica	Fundamento	Preparación	Marca
Agar Urea de Christensen	medio de cultivo utilizado para identificar Gram negativos	degradación de la urea en amonio. Los cambios en el pH se verifican gracias al contenido de rojo de fenol: la producción de ácido se ve como cambio del color de rojo anaranjado a amarillo, en tanto que la alcalinización se observa como viraje hacia el rojo fucsia. (Valtek, 2016)	21 g/ l, en 42 ml de agua destilada, se preparó 0.84 g del medio urea.	BD

Agar Manitol	diferenciación de estafilococos positivos a la coagulasa (por ejemplo, <i>Staphylococcus aureus</i> ) de los estafilococos negativos a la coagulasa	Producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo, mientras que los estafilococos negativos a la coagulasa producen colonias de color rojo y no producen cambio de color en el indicador de rojo fenol. (Chapman, 2013).	111 gr/ L, realizando una relación para 42 mL de agua destilada, se preparó 4.66 g de gramos de manitol.	BD
Citrato de Simmons	Entre las enterobacterias identificadas con esta prueba están: Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Citrobacter y algunas especies de Salmonella.(Bou et al., 2011)	determina la capacidad del microorganismos de usar citrato como fuente de carbono, provocan así la acidificación del medio, produciendo carbonatos y bicarbonatos alcalinos cambiando el color del medio de verde a azul para que sea positivo.	Se preparó 24.2 gr/ l, realizando una relación para 42 ml de agua destilada, se preparó 1.02 de gramos de manitol.	BD

<p style="text-align: center;">Agar SIM- Nährboden</p>	<p>SIM (Sulfide Indole Motility) (medio de sulfuro indol para movilidad) Medium es un medio diferencial utilizado en la confirmación presuntiva de miembros de la familia Enterobacteriaceae</p>	<p>en base a la capacidad de producción de SH<sub>2</sub> (Sulfuro de hidrógeno), formación de Indol, y manifestación de movilidad. La producción de SH<sub>2</sub> se manifiesta por un ennegrecimiento del medio, como consecuencia de la formación de un precipitado negro (Sulfuro de Hierro). (Soria Melguizo, 2009)</p>		<p>BD</p>
<p style="text-align: center;"><i>TSI (Triple Sugar Iron Agar) (Agar Triple Azúcar de Hierro BD)</i></p>	<p>Este medio de cultivo es utilizado para diferenciar Enterobacteriaceae, su aplicación como medio en tubo inclinado, permite diferenciar microorganismos fermentadores de glucosa, lactosa y/o sacarosa, y detecta la producción de sulfuro de hierro</p>	<p>El Agar TSI contiene glucosa, lactosa y sacarosa; cuando estos carbohidratos se fermentan se genera un producto ácido, detectado por un indicador rojo fenol. Se producen cambios de color de amarillo para ácidos, y rojo para alcalinos. (BD Company, 2003)</p>		<p>BD</p>

**Fuente:** Mac Faddin, J. F. (2003).

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

Para la preparación de todos los agares se esterilizó en autoclave durante 30 min, posteriormente se coloca en posición inclinada para formar pico de flauta, se deja enfriar y se procede a sembrar mediante siembra estriada colocando la cepa con la ayuda de un asa estéril, se tapa el tubo y se anotan los resultados de cambio de color después de 24 horas.

### 2.5.2.3. *Agar Urea de Christensen*



**Figura 10-2:** Prueba Ureasa

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

### 2.5.2.4 *Agar Manitol*



**Figura 11-2:** Prueba de manitol

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

### 2.5.2.5. *Citrato de Simmons*



**Figura 12-2:** Prueba Simmons

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

### 2.5.2.6 Agar SIM- Nahrboden



**Figura 13-2:** Prueba SIM

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

### 2.6 Materiales experimentales

Materiales y equipos, así como también reactivos utilizados en la etapa experimental de la investigación se muestran en la Tabla 2-2

**Tabla 3 -2:** Equipos y Materiales utilizados en varias etapas de investigación

<b>Etapas de Investigación</b>	<b>Equipos y Materiales</b>	<b>Cantidad</b>
Muestreo, recolección y transporte de la muestra de suelo de páramo	GPS	1
	Estación metereológica	1
	barreno	2
	combo	2
	Cucharas estériles	4
	Guantes de latex	5 pares
	Fundas ziploc estériles y etiquetadas	10
	Cinta métrica	1
	estacas	5
	cooler	1
	hielo	2 bolsas
	Piezas de acrílico construidas de forma cúbica	6
	Pegamento	10

Configuración y preparación de CCM.	Tejido de fibra de carbono de 0.015 plg de espesor	768 cm <sup>2</sup>
	Alambre de acero inoxidable (7cm)	42 cm
	Tapones de caucho para entradas de alimentación	12
	Tijeras, estilete, playo, pinzas	1
	Tornillos de acero galvanizado con tuercas	48
	Láminas de cauchos cortadas a la medida	24
Instalación de sistema de adquisición de datos	Lagarto de conexión	12
	alambre	1 m
	DAQ-NI USB-6009	1
	Multímetro Digital SDA-201	1
	Computador digital	1
Determinación de Formación de Biofilm y Análisis Microbiológicos	Cámara de PCR	1
	Cámara de flujo laminar	1
	Balanza analítica	1
	Autoclave	1
	espátula	1
	Jeringas	6
	Guantes estériles	1
	Agua vivand	1 botella
Pruebas bioquímicas para identificación de género	Placas petri de vidrio	2
	Estufa	1
	Autoclave	1
	Cámara de flujo laminar	1
	Refrigerador	1
	Balanza analítica	1
	Microscopio óptico	1
	Agua destilada	4 galones
Placas Petri de vidrio	50	

	Tubos de ensayo	20
	Asa de siembra	2
	Algodón	1 paquete
	Alcohol industrial	2 l
	Gasa	2 paquetes
	Guantes de latex	10 pares
	maskarilla y cofia	1 c/u
	Papel aluminio	1 paquete

Fuente: Argoti, Ana (2019)

Los reactivos, sustancias y equipos utilizados en el laboratorio para análisis y pretratamiento de materiales se detallan en la Tabla 3-2.

**Tabla 4-2:** Lista de reactivos, sustancias y equipos utilizados en la parte experimental

Reactivos	Sustancias	Equipos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peroxidisulfato de amonio</li> <li>• Solución de ácido sulfúrico concentrado al 96%</li> <li>• Solución mineral de Cloruro de Sodio al 0.9%</li> <li>• Agar Urea de Christensen</li> <li>• Agar Manitol</li> <li>• Agar Citrato de Simmons</li> <li>• Agar SIM-Nahrboden</li> <li>• Agar TSI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hipoclorito de sodio al 5 %</li> <li>• Agua destilada</li> <li>• Acetona industrial</li> <li>• Agua de Peptona</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Balanza Analítica</li> <li>• Autoclave</li> <li>• Estufa</li> <li>• Sorbona</li> <li>• Cámara isobárica</li> </ul>

Fuente: Ana Argoti, 2019

## 2.7 Planteamiento de Hipótesis

A mayor profundidad de suelo mayor producción de bioelectricidad o mayor cantidad de microorganismos electrogénicos.

### 2.7.1 *Hipótesis Estadística*

Planteamiento de Hipótesis:

$$H_0: \mu_{\text{voltaje del suelo a 20cm}} < \mu_{\text{voltaje del suelo a 40 cm}}$$

$$H_1: \mu_{\text{voltaje del suelo a 20cm}} \geq \mu_{\text{voltaje del suelo a 40 cm}}$$

Nivel de significancia:

$$\alpha = 0.05$$

Estadístico de prueba: Prueba de Muestras Emparejadas, Diferencias Emparejadas

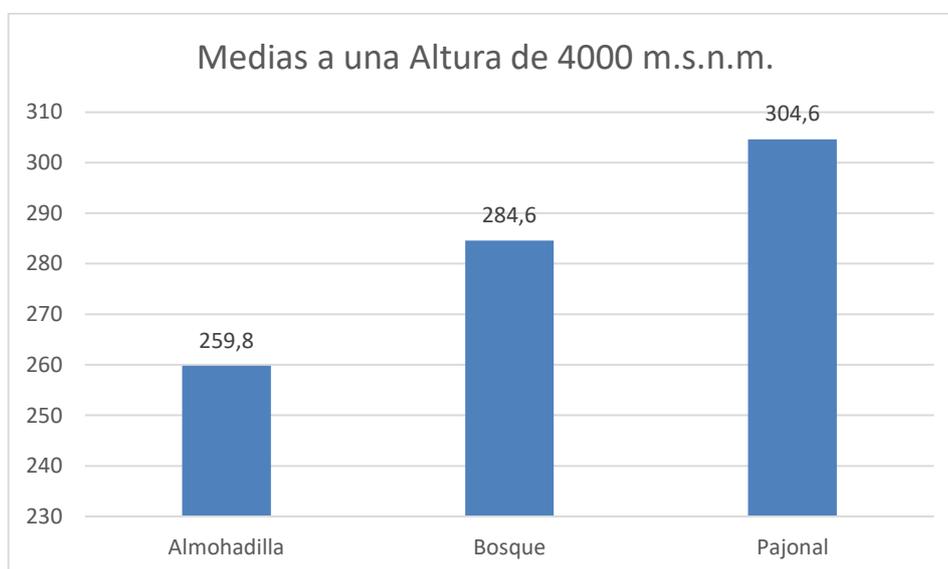
## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Análisis para determinar el punto de muestreo

En base a un análisis estadístico de estudios anteriores sobre CCM, comparando variables de cobertura vegetal y altitud se determinó el punto de muestreo en una cobertura vegetal de tipo pajonal y a una altura de 4000 msnm, debido al dar un indicio de la mayor producción de conductividad alta para seleccionar el sitio.

El gráfico 1-3 muestra que la combinación más idónea para tomar el punto de muestreo es a una altura de 4000 m.s.n.m. y a cobertura vegetal de pajonal por su conductividad media de 304,6  $\mu$ s. Existen varias características propias del clima y del suelo que incide en la distribución vegetal y eje altitudinal de los diferentes tipos de páramos, y consecuentemente influyen en la diversidad biológica. (Mena, 2011) (León Yáñez, 2003)



**Gráfico 2-3:** Resultados de conductividad media a diferentes coberturas vegetales y a altura de 4000 m.s.n.m

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

La CE influye directamente en la capacidad de intercambio catiónico (CIC). El grado de saturación de bases (G.S.B%), porcentaje de carbono orgánico, relación C/N, % materia orgánica, así como la velocidad de mineralización del suelo y esta se encuentra variable dependiendo de la cobertura vegetal del suelo de páramo. (Quinteros et al., 2012)

El páramo de pajonal y de almohadilla son los que guardan una gran similitud, esta característica atribuida a su localización; se diferencian bastante de páramos de bosque. Las almohadillas se dispersan a través de las superficies de pajonal, ubicadas en las partes bajas el páramo de almohadilla se sitúa en partes bajas y planas acumulando agua por escorrentía, así generan un microclima menos frío que el del ambiente, por su cercanía con el páramo de pajonal recibe aportes de materia orgánica, el cual tiene condiciones hiperhúmedas. (Hosftede, R. et all, 2003).

Por otra parte se diferencian debido a su capacidad de retención de agua causante de la descomposición de materia orgánica. Se evidencia una relación existente entre agua y materia orgánica; con mucha agua hay mucha materia orgánica (poca descomposición) y con mucha materia orgánica hay mucha agua (adsorción). Estos complejos retienen nutrientes y no se aprovechan por las plantas, es por esto que tienen mucha fertilidad, pero no se puede aprovechar. (Quinteros et al., 2012)

Otro tipo de páramo es el de bosque este se diferencia sobre todo en tener alta CIC, y alta tasa de GSB. Todos estos tres tipos de cobertura vegetal en páramos son clasificados según la FAO como Andolosoles los cuales poseen la cualidad de ser bien drenados, propiciando mayor conductividad eléctrica y fujo de iones, potenciando la capacidad de bioelectricidad del suelo.

### **3.2 Parámetros climatológicos del sitio de muestreo.**

Mediante la estación meteorológica portátil Krestel obtuvimos los siguientes parámetros climatológicos del sitio de muestreo mostrados en la tabla 1-3.

**Tabla 1-3:** Parámetros climáticos del sitio de muestreo

<b>Parámetros</b>	<b>Valores</b>
Fecha de toma de factores ambientales	7/11/2018
Hora	9:32 am
Velocidad del viento/spd	4.7
Velocidad max.del viento/spd	5
Avg de velocidad del viento/spd	1.6
Temperatura/dEG/C	10.4
Temperatura del viento frio	7.2
Humedad	% 100
Índice de estrés térmico	% 9.5
Punto de rocío	-3.4
Temperatura en bubo húmedo	-1.5
Presión barométrica/baro/hPa	626.8
Altitud/ft	12723

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

Como los parámetros de sitio de muestreo indican la temperatura del viento frio que es de 7.2 y temperatura en bulbo húmedo de -1.5, que es para medir la temperatura húmeda del aire; son indicadores de las bajas temperaturas, clima frio y húmedo pertenecientes a suelos de páramo de tipo andosol, estos según (Hedberg, 1992), son ecosistemas de alta montaña que tienen la capacidad de retener grandes cantidades de agua lo cual influye en el movimiento de sales solubles en el suelo, influyendo en el desarrollo microbiano por la concentración de pH, decreciendo el crecimiento microbiano por la acidificación del medio.

### **3.3 Caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo.**

#### **3.3.1 Resultados de Parámetros fisicoquímicos y mineralógicos**

Para la producción de bioelectricidad es importante analizar el suelo a nivel microbiológico y fisicoquímico para reconocer el estado del mismo y reconocer las características y parámetros de este suelo para cada tipo de profundidad de toma de muestra.

En la tabla 2-3, se evidencian los principales resultados de los análisis fisicoquímicos y mineralógicos obtenidos de la muestra compuesta de suelo de páramo alto Andino obtenido de zona de la Parroquia Villa la Unión, Cantón Colta.

**Tabla 2-3:** Resultados de análisis físico-químicos de la muestra de suelo inicial en Agrocalidad.

Parámetro	Método de Ensayo	Referencia			Unidad	Resultado	
		Bajo	Medio	Alto		A (20CM)	B (40CM)
pH	Electrométrico PEE/SFA/06 EPA 90450				...	5.33	5.66
Materia Orgánica	Volumétrico PEE/SFA/09	<1,0	1,0-2,0	>2,0	%	13.73	10.90
Nitrógeno	Volumétrico PEE/SFA/09	0-0,15	0,16-0,3	>0,31	%	0.69	0.54
Fósforo	Colorimétrico PEE/SFA/11	0-0,10	11,00-20,0	>21,0	mg/kg	<3.5	<3.5
Potasio	Absorción Atómica PEE/SFA/12	<0,2	0,2-0,38	>0,4	cmol/kg	0.30	0.18
Calcio	Absorción Atómica PEE/SFA/12	<1,0	1,0-3,0	>3,0	cmol/kg	6.07	6.47
Magnesio	Absorción Atómica PEE/SFA/12	<0,33	0,34-0,66	>0,66	cmol/kg	1.23	1.03
Hierro	Absorción Atómica PEE/SFA/13	0-20,0	21,0-40,0	>41,0	mg/kg	406.8	368.3
Manganeso	Absorción Atómica PEE/SFA/13	0-5,0	6,0-15,0	>16,0	mg/kg	32.71	9.61
Cobre	Absorción Atómica PEE/SFA/13	0-1,0	1,1-4,0	>4,1	mg/kg	7.81	8.37
Zinc	Absorción Atómica PEE/SFA/13	0-3,0	3,1-6,0	>6,1	mg/kg	6.87	3.67

Fuente: AGROCALIDAD

Realizado por: Ana Argoti, 2019

Se puede observar diferencias evidentes en ciertos factores como la concentración de Zinc, Manganeso, el Hierro y materia orgánica. En una CCM los factores que determinan el índice de bioelectricidad son el pH ya que para este tipo de procesos se recomienda un valor de pH neutro y la relación C/N, porcentaje de materia orgánica. El porcentaje de N, P, K, Ca, Mg, Mn, Cu y Zn son factores de influencia en el metabolismo de la microbiota endémica del suelo de páramo de pajonal que producirá bioelectricidad. (Ortega & Malavolta, 2012)

El pH de los suelos de páramos estudiados es ligeramente ácido como lo corroboran los análisis fisicoquímicos; indicadores de pH de 5.33 para suelo a 20cm de profundidad y de 5.66 para suelos de 40cm de profundidad, según (Diaz Granados, et al, 2005) los suelos tienen esta característica por ser de origen volcánico.

De la misma manera procesos de oxidorreducción se ven implicados en la producción de bioelectricidad (Gómez, Castro y Malagón, 2005). Puesto que elementos como la concentración de Nitrógeno, que en el suelo analizado va desde 0.69 y 0.54 siendo estos valores elevados, y otros elementos como el Hierro y Manganeso lo cuales difieren entre los dos tratamientos y son los que determinan el origen de sulfatos ácidos involucrados en la capacidad redox del suelo.

### 3.3.2 Resultado de Conductividad

**Tabla 3-3:** Resultados de Análisis de Conductividad

<b>Profundidad</b>	<b>Conductividad <math>\mu\text{S}/\text{cm}</math></b>
20 cm	100.1
40 cm	77.9

Realizado por: Ana Argoti, 2019

A mayor conductividad eléctrica (CE) existe un mayor flujo de electrones favoreciendo la producción de voltaje, pero disminuyendo la actividad microbiana. Según (Schaefer et al, 2007) la CE elevada cuando la concentración de sales en el suelo es elevada. La CE está determinada por la concentración de sales en el suelo, y este factor influye directamente en el drenaje y estructura del suelo llevándolo a ser inestable con índices de toxicidad para la vegetación y por lo tanto los microorganismos del suelo.

Es de esperarse que bajo este principio la conductividad de 77.9  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a suelo de 40cm produzca mayor voltaje por interferir menos en el drenaje y concentración del suelo para el desarrollo de microorganismos electrogénicos endémicos del suelo.

Las características presentadas por el suelo en estudio están altamente relacionadas con características físico-químicas de los suelos de páramos en Colombia, considerando los factores que afectan la CE y los resultados del suelo se corrobora que la CE disminuye dependiendo de la profundidad debido a la humedad y a la presencia de materia orgánica pues, éstos son capaces de retener cationes y aumentar la cantidad de CE en los horizontes superficiales. (Costa y Castro, 2012)

La conductividad eléctrica se ve condicionada por sales disueltas e ionizadas en la fracción húmeda del suelo, esta depende de los componentes físico-químicos que caracterizan al suelo, su textura, su contenido de materia orgánica, su humedad, es lo que condiciona el intercambio catiónico del cual depende también la capacidad de producir bioelectricidad. (Pansu & Gautheyrou, 2007)

En general, la relación existente entre la conductividad y las zonas de altos contenidos de Ca, Mg y Na presentan pH bajos, lo que puede propiciar al desarrollo de la microbiota bacteriana en estas zonas. La porosidad de los suelos también juega un papel importante en el porcentaje de infiltración que afecta consecuentemente a los valores de conductividad hidráulica, por su efecto en la retención de agua, los primeros 30 cm de profundidad de suelo tienen un contenido del 61% en volumen de agua. (Díaz-Granados et al., 2005)

### ***3.3.3 Resultados de porcentaje de humedad***

La humedad está estrechamente correlacionada con la conductividad y salinidad del suelo y estos en el desarrollo y metabolismo de microorganismos electrogénicos en el suelo. La humedad en el suelo permite la evolución rápida del mismo en cuanto al intercambio catiónico. La humedad es producto de la cantidad de lluvia presente y precipitaciones ocultas como neblina y llovizna en el páramo, las cantidades de lluvia en el páramo pueden variar entre 500 y más de 3.000 mm al año. (P Podwojewski, Poulenard, Zambrana, & Hofstede, 2002)

La humedad ejerce influencia en la pérdida y asimilación de nutrientes por los microorganismos del suelo. El suelo en el que se realizó el experimento pertenece al ecosistema de páramo alto andino, en estos por existir vegetación de tipo no arbórea, alta radiación ultravioleta y niveles bajos de temperatura el suelo tienen humedad elevada.

**Tabla 4-3:** Tabla de cálculos de Porcentaje de Humedad

Muestra	Peso húmedo	Peso Seco			% humedad
A1	3,0432	1,696			
A2	3,1116	1,689	Prom. peso húmedo	Prom. de peso seco	De 40cm profundidad
A3	3,2101	1,735	3,1216	1,707	45,33
B1	3,0179	1,650			
B2	3,0084	1,665			De 20 cm de profundidad
B3	3,1014	1,711	3,0426	1,675	44,94

Donde A1, A2, Y A3 son muestras respectivas a profundidad de 40cm, y las muestras B1, B2, y B3 corresponden a 20 cm.

Fuente: Ana Argoti, 2019

Los porcentajes de humedad en las muestras de suelo variaron levemente entre profundidades; para una profundidad de 40 cm el resultado fue % 45.33, mientras que para profundidad de 20 cm la humedad fue de 44.94 %. Aunque la diferencia entre porcentajes no es muy notoria, indica que en el suelo a una profundidad de 40 cm será su capacidad de intercambio catiónico mayor y su conductividad eléctrica más propicia para usar como inóculo en celdas de combustible microbiano.

En comparación con estudios en suelos de páramos, los suelos con mayor índice de retención de humedad, presentan mayor contenido de materia orgánica. Los suelos (en época de verano) no intervenidos como es el caso del suelo estudiado presentan un porcentaje de humedad del 42.857%, a diferencia de suelos de páramo intervenidos que presentan un 25%, se puede observar que la humedad de suelo de paramo no intervenido es mayor y se conserva mejor haciendo a este tipo de suelos más húmedos. (Martínez, 2017)

### 3.4 Profundidad en el punto de muestreo.

La variabilidad de crecimiento a diferentes profundidades es evidente, demostrando que el suelo más superficial es decir el arable tiene diez veces más contenido de CO<sub>2</sub> y menos de O<sub>2</sub> debido a la actividad biológica. Como menciona el apartado 1.3 la microfauna edáfica es la responsable de procesos de descomposición y mineralización en el suelo, y esta actividad biológica acelera la aireación del suelo y reciclaje de nutrientes dándole estructura y composición al suelo. (Cabrera & Crespo, 2001).

Es de suponer que la distribución de microorganismos en el suelo varía según las profundidades; datos que evidencian que a mayor profundidad existe menor cantidad de microorganismos. Estudios anteriores han demostrado que a una profundidad de 0-10 cm existen 7.800 bacterias aerobias por gramo de tierra, y a 20-25 cm de profundidad existen 1.800 bacterias aerobias por 3 gramos de tierra. (Brito, 2014) Lo que sustenta que al haber mayor cantidad de microorganismos en el suelo de 20 cm, y menor en 40 cm quizás la producción de bioelectricidad se reduzca con la profundidad.

Según los resultados de secuenciación masiva de la muestra de suelo utilizado como inóculo del apartado 3.4 se encontró efectivamente que a menor profundidad de suelo hay mayor diversidad de especies; a 20 cm existen 55 especies diferentes de bacterias y a 40cm hay 25 especies diferentes de bacteria, estos resultados pueden ser un factor determinante que influye en el funcionamiento de las CCM y su producción de bioelectricidad, específicamente por procesos de competencia por nutrientes y espacio sobre la formación del biofilm, es decir por la cantidad de sustrato que provoco antagonismo y una nueva selección de consorcio microbiano apto para vivir en las condiciones del medio dentro de una CCM para su producción de bioelectricidad.

Como o explica la dinámica de biofilms en el apartado 1.8, según (Bordi & Bentzman, 2011), existe un funcionamiento como comunidad activa dentro de un consorcio microbiano en el cual existen relaciones tanto de sinergismo como de antagonismo entre ellos la competencia por requerimientos nutricionales y espacio, criterios que perpetúen la supervivencia de las especies más fuertes del consorcio.

### 3.5 Resultados de Secuenciación masiva paralela de suelo de páramo.

La identificación molecular de bacterias a nivel de género y especie, determinó la presencia de *Bradyrhizobium canariense*, con un 63% de abundancia en la muestra en su mayoría con una cantidad de aparición de 1195 ejemplares en ambas muestras de profundidad; esta especie pertenece al *phylum Proteobacteria* y a la clase *Alphaproteobacteria*, la cual tiene antecedentes de ser productora de electricidad en CCM. La tabla 5-3 da una breve descripción de esta especie.

**Tabla 5-3:** Descripción de la especie *Bradyrhizobium canariense*

			<i>Bradyrhizobium canariense</i>
Reino	Bacteria	E	Se observan <b>alfaproteobacterias</b> y clostridios. En sedimentos de manglares con bajo contenido de sal, que producen $10.77 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$ . Estos hallazgos sugieren la
Filo	Proteobacteria		
Clase	Alfaproteobacterias	si	
Orden	Rizobiales		
Familia	Bradyrhizobiaceae		

Genero	<i>Bradyrhizobium</i>		aparición de interacciones como la sintrofia, Lo que podría favorecer la producción actual.
Especie	<i>Bradyrhizobium canariense</i>		
Es una especie de leguminosa : bacteria noduladora de la raíz , fijadora de nitrógeno por endosimbionte			
Donde E significa que pertenece al grupo de bacterias electrogénicas			

Realizado por: Ana Argoti, 2019

Además se determinó la presencia del *phylum* Proteobacteria y Terraproteobacteria mediante la aproximación metagenómica del suelo de pajonal de la Parroquia Villa la Unión, Cantón Colta, en la región Andina de la Provincia de Chimborazo, pues, según Lizardo & Gomez (2014), mencionan que mediante secuenciaciones masivas se ha podido determinar la presencia de este tipo de microorganismos es característicos de los suelos de páramos alto andinos.

Al parecer, otro de los microorganismos electrogénicos con aparición en la muestra de suelo de 20 cm es *Geobacter psychrophilus*, el cual pertenece a la clase *Deltaproteobacteria* la cual presenta afinidad para conformar la biopelícula sobre los ánodos de las MFC. (Mora Collazos & Bravo Montaña, 2017)

**Tabla 6-3:** Descripción de la especie *Geobacter psychrophilus*

			<i>Geobacter psychrophilus</i>
Reino	Bacteria	E	Las raíces de las plantas (arrozales) albergan gran diversidad de bacterias involucradas en el rendimiento eléctrico. <b>Deltaproteobacteria</b> y Clostridia se dominan cuando el suelo agrícola es utilizado en MFC y alimentado con glucosa. Cuando se introducen electrodos en los campos de arroz, una gran diversidad de Deltaproteobacteria ( <b>Geobacter spp.</b> , Myxococcus, Deferrisoma y Desulfobulbus) dominan.
Filo	Proteobacterias		
Clase	Deltaproteobacteria	Si	
Orden	Desulfuromonadales		
Familia	Geobacteraceae		
Genero	Geobacter		
Especie	<i>G. psychrophilus</i>		
<i>Geobacter psychrophilus</i> es una bacteria reductora de Fe (III). Es gramnegativo , ligeramente curvado, en forma de varilla y móvil a través de flagelos monotricos.			
Donde E significa que pertenece al grupo de bacterias electrogénicas			

Realizado por: Ana Argoti, 2019

La presencia de este phylum en los suelos de páramos andinos ha sido explicada por Spain (2009), la abundancia se debe a los procesos metabólicos y fisiológicos que mantienen y su relación con los diferentes ciclos biogeoquímicos que tienen lugar en el suelo.

Otras especies que predominan en este análisis genético son: *Bacillus Circulans* (20-40cm), *Arthrobacter russicus* (20cm), *Kitasatospora kazusensis*(40cm), *Reyranella soli* (20cm), *Moraxella osloensis* (40cm) y *Pseudarthrobacter defluvii* (20cm). Como muestra la tabla 7-3, especies que tienen mayor índice de aparición.

**Tabla 7-3:** Especies más abundantes encontradas por secuenciación de suelo de páramo

Profundidad	Conteo	Filo	Clase	Especie microbiana
20- 40cm	1195	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium canariense</i>
20cm	85	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium sp. SEMIA 6399</i>
20- 40cm	63	<i>Terrabacteria group</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus circulans</i>
20cm	53	<i>Terrabacteria group</i>	<i>Actinobacteria &lt;phylum&gt;</i>	<i>Arthrobacter russicus</i>
40 cm	31	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Kitasatospora kazusensis</i>
20cm	21	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Reyranella soli</i>
40 cm	16	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Sporosarcina globispora</i>
40 cm	15	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium sp. SEMIA 6399</i>
40 cm	14	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
20cm	10	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylocella silvestris</i>
20cm	10	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alpha Proteobacteria</i>	<i>Hyphomicrobium facile</i>
20cm	10	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudarthrobacter defluvii</i>
40 cm	9	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptacidiphilus carbonis</i>
20- 40cm	12	<i>Terrabacteria group</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium bowmanii</i>

Realizado por: Ana Argoti, 2019

### 3.6 Resultados de Pruebas Bioquímicas para Bacilos Gram (-)

**Tabla 8-3:** Resultados de Pruebas Bioquímicas para Bacilos Gram (-)

	Urea	Manitol	Citrato	TSI		Sim		Oxidasa	Catalasa	Posible Especie
				Glu	Lac	Mov	In			

Ambiente (20 cm) #1 Medio TSB	+	-	-	+	-	-	-	+	+	ND
Ambiente (40 cm) #3 Medio Nutri	+	V	-	+	-	+	-	+	+	<i>Pasteurella ureae</i> <i>Bacterioides melanogenicus</i>
	Urea	Manitol	Citrato	TSI		SIM		Oxidasa	Catalasa	Posible Especie
				Glu	Lac	Mov	In			
Ambiente (20 cm) #4 Medio Nutri	+	-	-	+	-	+	-	+	+	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Ambiente (40 cm) #4 Medio Nutri	+	-	-	+	-	+	-	+	+	ND
Refrigeración (20 cm) #1 Medio Nutri	+	-	-	+	-	-	-	+	+	ND
Refrigeración (20 cm) #1, 2 Medio Nutri	+	-	-	+	-	-	-	-	+	ND
Refrigeración (40 cm) #4 Medio Nutri	+	V	-	+	-	+	-	-	+	ND
Refrigeración (20 cm) #7 Medio Nutri	-	-	-	+	-	+	-	-	-	ND
Estufa replica (20 cm) #3 Medio TSB	+	-	-	-	-	-	-	-	+	ND
Estufa (20 cm) #1 Medio TSB	+	V	-	-	-	-	-	-	+	ND

Estufa (40 cm) #1,2 Medio TSB	-	+	-	+	+	+	-	-	+	ND
Estufa borde (40 cm) #3,3 Medio TSB	-	+	-	+	+	+	-	-	+	ND
Estufa borde (40 cm) #2,3 Medio TSB	-	V	-	+	+	+	-	-	+	ND
Estufa borde (20 cm) #3 Medio nutri	+	-	-	+	+	+	-	-	-	<i>Enterobacter spp.</i>
Donde V significa variable ND significa no identificado (+) positivo para prueba (-) negativo para prueba										

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

En la tabla 8-3 se muestran los resultados obtenidos durante las pruebas bioquímicas, los clones aislados fueron sometidos pruebas de identificación rápida donde se obtuvieron 14 clones de forma bacilar Gram (-), sin embargo la caracterización bioquímica no permitió obtener las especies pertenecientes al biofilm, pues, el aislamiento y caracterización de bacterias electrogénicas se realizan con medios diferenciales enriquecidos, sin embargo se presume la presencia de *Pseudomona aeruginosa*, *Pasteurella ureae* y *Bacterioides melanogenicus*.

Dentro de una CCM es mejor usar cultivos mixtos de esta manera los requerimientos y exigencia son menores y estos generan altos potenciales, entre bacterias más comunes pertenecen a los géneros *Shewanella*, *Geobacter*, *Proteobacter* y *Pseudomonas*, se destaca la especie *Pseudomona aeruginosa*, los mediadores redox producidos por esta bacteria pueden usarse para la transferencia de electrones al ánodo. (Revelo, Hurtado, & Ruiz, 2013)

La dificultad para el aislamiento y caracterización de las bacterias se debe al carácter no cultivable que los microorganismos poseen, pues, solo entre el 0.1 y el 10% son bacterias cultivables, esto se debe a que no existen estudios que puedan identificar y establecer parámetros nutricionales o las condiciones físico químicas que necesitan los microorganismos para crecer en medio sólidos o líquidos. (Escalante et al., 2004)

La carente información sobre las relaciones entre microorganismos y su ambiente natural es una limitante para el desarrollo de las bacterias, si bien las bacterias cultivables pueden ser

filogenéticamente parecidas o incluso iguales a las bacterias no cultivables, los procesos fisiológicos impiden que éstas sean cultivables, lo que se considera un factor limitante que impide el estudio de la diversidad microbiana presente en el suelo. (Escalante Lozada et al., 2004)

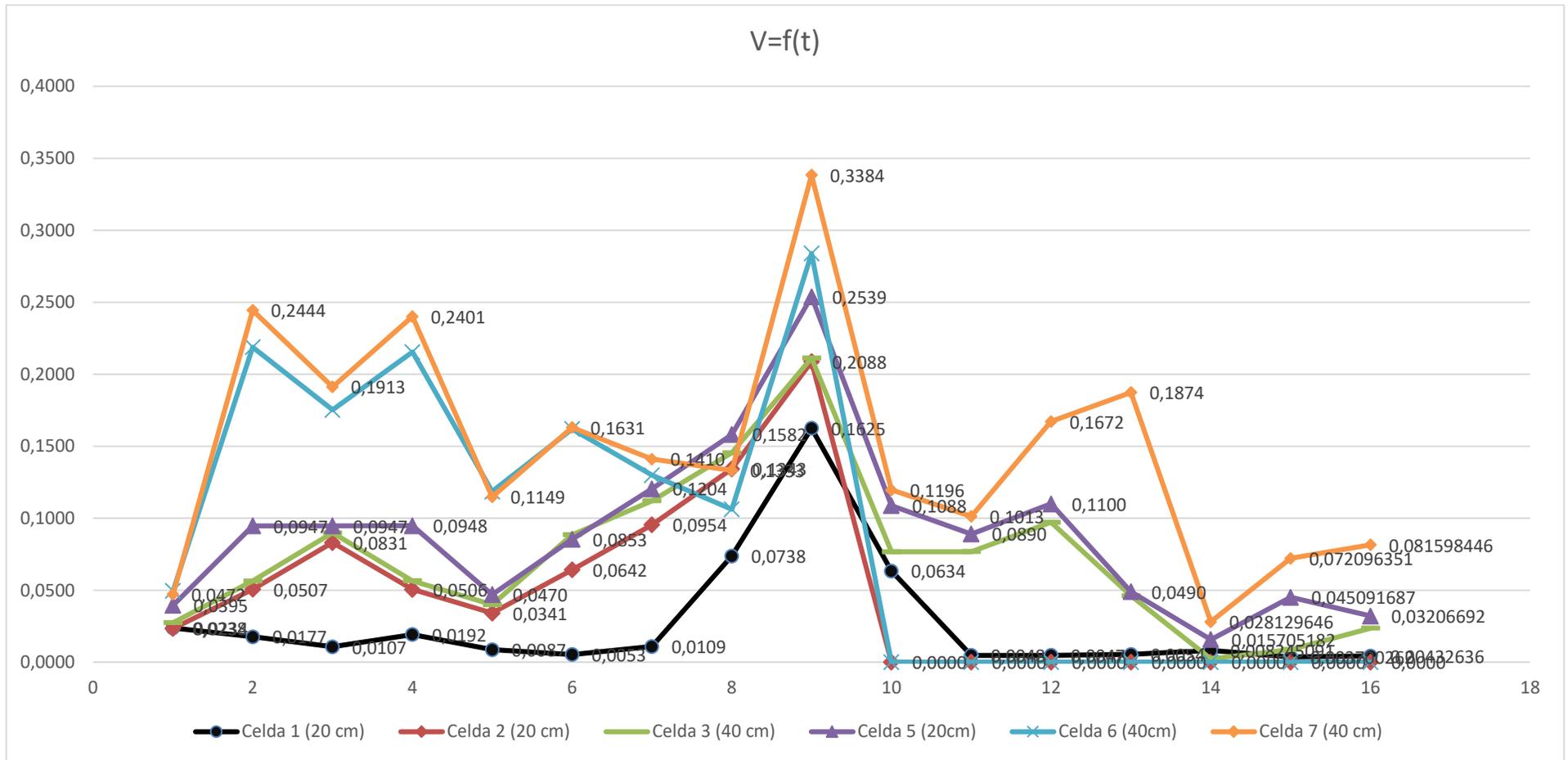
### **3.7 Resultados de Voltaje mediante Sistema de Adquisición de datos**

Se obtuvo los datos por medio de un sistema de adquisición de datos DAQ-NI USB-6009 de 8 entradas analógicas de las cuales fueron conectadas 6 Celdas de Combustible Microbiano. El programa LabView recogió periódicamente los datos bajo un intervalo de tiempo de 1 minuto, en un lapso de 16 días y estos datos fueron almacenados en Excel, se realizó un promedio de los datos recogidos en cada día para construir la tabla 8-3, que ejemplifica los datos de voltaje obtenidos de las 6 celdas en 16 días.

**Tabla 9-3:** Resultados de voltaje

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15	Dia 16
Celda 1 (20 cm)	0,0238	0,0177	0,0107	0,0192	0,0087	0,0053	0,0109	0,0738	0,1625	0,0634	0,0048	0,0047	0,0054	0,00824509	0,00370026	0,00432636
Celda 2 (20 cm)	0,0234	0,0507	0,0831	0,0506	0,0341	0,0642	0,0954	0,1343	0,2088	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Celda 3 (40 cm)	0,0274	0,0565	0,0899	0,0565	0,0400	0,0885	0,1121	0,1455	0,2112	0,0767	0,0768	0,0972	0,0462	0,00227464	0,00883358	0,02356919
Celda 5 (20cm)	0,0395	0,0947	0,0947	0,0948	0,0470	0,0853	0,1204	0,1582	0,2539	0,1088	0,0890	0,1100	0,0490	0,01570518	0,04509169	0,03206692
Celda 6 (40cm)	0,0496	0,2188	0,1753	0,2155	0,1186	0,1620	0,1299	0,1062	0,2839	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Celda 7 (40 cm)	0,0472	0,2444	0,1913	0,2401	0,1149	0,1631	0,1410	0,1333	0,3384	0,1196	0,1013	0,1672	0,1874	0,02812965	0,07209635	0,08159845

Realizado por: Ana Argoti, 2019



**Gráfico 2-3:** Resultados de voltaje en un lapso de 16 días de experimento, muestra 6 CCM con variaciones de profundidad y 2 réplicas de cada variación de profundidad.

Realizado por: Ana Argoti, 2019

Se puede observar según el gráfico 2-3 que para las Celdas CM7C (40 cm) y Celda CM6C (40cm) la cantidad de voltaje producido en comparación a las otras celdas es mayor, no existen diferencias significativas entre estas dos líneas de voltaje. Para la capacidad de producir voltaje de las celdas se encuentran en la tabla 8-3. Enfocándonos en el día 9 del experimento que es donde hubo una mayor producción de voltaje.

Del día 1 al 5 los microorganismos se encuentran en una fase de latencia según (Willenegger, 1990) en la cual se están adaptando, se están acondicionando a su nuevas condiciones dentro de la CCM, no hay duplicación de población pero existe gran metabolismo por parte de las bacterias por eso existen picos elevados de voltaje como podemos observar en el gráfico 2-3. Desde el día 5 al 9, especialmente el día 9 donde se produce mayor cantidad de voltaje es donde ocurre la fase exponencial o fase logarítmica en un proceso de crecimiento bacteriano, en esta etapa existe una mayor producción de voltaje debido a que los microorganismos crecen y aumentan todos los mecanismos que constituyen sus componentes celulares, y la población se duplica o triplica como lo indica el apartado 1.8.2.2. según (Willenegger, 1990). Después de esto el voltaje decae en el día 10, hasta no producir ningún voltaje relevante donde se asume que las bacterias están en su fase de muerte.

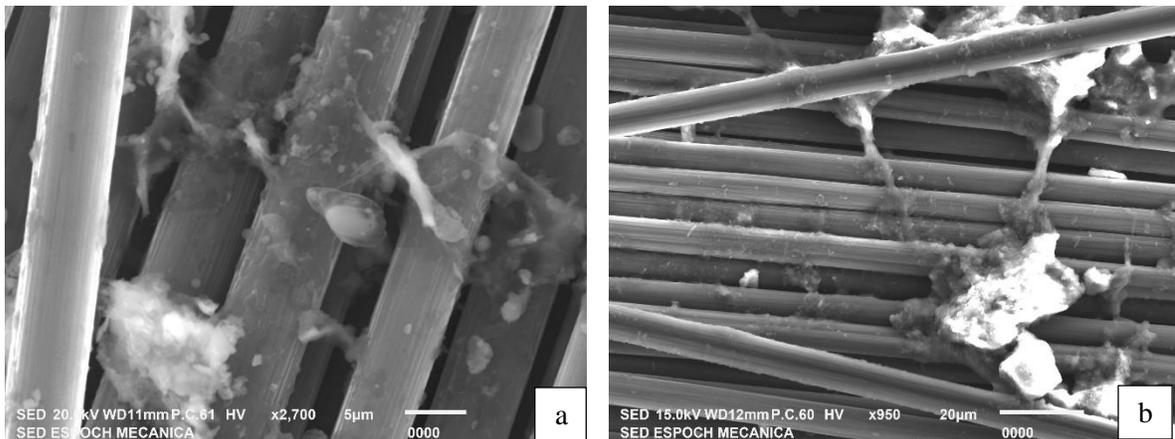
Las profundidades del muestreo del suelo juegan un papel importante en la producción de voltaje, según Brito, (2014) existe mayor población bacteriana a una profundidad de 20-40 cm en relación a la profundidad de 0-20 cm, existe mayor diversidad microbiana, a una profundidad de 40cm lo que expone que la distribución de microorganismos en el suelo varía según las profundidades, y por consiguiente el voltaje. Estudios anteriores demostraron que a una profundidad de 0-10 cm existen 7.800 bacterias aerobias por gramo de tierra, mientras que a 20-25 cm de profundidad existen 1.800 bacterias aerobias por 31 gramo de tierra, datos que evidencian que a mayor profundidad existe menor cantidad de microorganismos aerobios, pero lo opuesto sucede en comparación con bacterias de carácter anaerobio.

Los microorganismos cumplen un papel muy importante en el funcionamiento de las CCM ya que gracias a sus reacciones metabólicas es que existe la transferencia de electrones, este proceso acontece de la misma célula; con un flujo que se dirige de la célula al electrodo y viceversa; por consiguiente comprender las interacciones microbianas, identificarlas y fundamentar su función en el proceso de producción de energía en las CCM aporta al mejoramiento de este mecanismo de

producción energética. Además, explorar consorcios eficaces para las funciones de generación de electricidad, remoción de materia orgánica y biorremediación, a partir de muestras ambientales sometidas a diferentes condiciones, puede permitir el desarrollo de novedosos bioánodos y/o biocátodos. (Revelo et al., 2013)

### 3.8 Resultados de Análisis Macroscópico

En el día de mayor producción de voltaje se extrajo el tejido de fibra de carbono de las membranas de la cámara anódica de la CCM, para su observación en el microscopio y de la formación del biofilm, la muestra fue analizada en un microscopio electrónico de barrido tipo SEM con analizador EDS, que permitió observar la superficie de la membrana en imágenes con amplitud de 500 - 2  $\mu\text{m}$ .



a) Fotografía del biofilm de la celda 2 (20 cm), tomada a una amplitud de 5  $\mu\text{m}$ ,

b) Fotografía del biofilm de la celda 6 (40cm), tomada a una amplitud de 20  $\mu\text{m}$ .

**Figura 1-3:** Se observa la adhesión de partículas microbianas, llamada biofilm formando adherencias a la membrana, extraídas después de la mayor producción de voltaje.

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

En la celda de 20cm se encontró una menor cantidad de biofilm, por lo que se necesitó una mayor amplitud para poder visualizar las partículas, esto evidencia que la mayor producción de voltaje se encuentra en las celdas de 40 cm porque se necesitó una menor amplitud para visualizar las partículas.

### 3.9 Resultados de análisis genéticos

Mediante el análisis genético molecular de las membranas de la cámara anóxica de las CCM *Pseudomonas azotoformans* fue la especie predominante con 24984 ejemplares, además existe la presencia de *Bradyrhizobium canariense*, en menor proporción que el análisis genético inicial, con 512 ejemplares. Existe también la aparición en menor proporción de *Pseudomonas flavescens* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas migulae*, *Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas chloritidismutans*. Y otras especies predominantes como: *Gluconobacter cerinus*, *Leuconostoc citreum*, *Acetobacter okinawensis*.

**Tabla 10-3:** Especies más abundantes encontradas en membranas de CCM

Celda	Profundidad	Cantidad	Filo	Clase	Especie
5	(20 cm)	24984	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
7	(40 cm)	24477	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Gluconobacter cerinus</i>
5	(20 cm)	10442			<i>Leuconostoc citreum</i>
7	(40 cm)	11156	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Acetobacter okinawensis</i>
5	(20 cm)	9687	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Acetobacter okinawensis</i>
7	(40 cm)	9383	<i>Terrabacteria group</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
5	(20 cm)	8596	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas oligophenolica</i>
7	(40 cm)	4219	<i>Terrabacteria group</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
5	(20 cm)	3335	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
7	(40 cm)	3230	<i>Terrabacteria group</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
7	(40 cm)	2945	<i>Terrabacteria group</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>
7	(40 cm)	1935	<i>Terrabacteria group</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Lawsonella clevelandensis</i>
7	(40 cm)	1812	<i>Terrabacteria group</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium akagii</i>
Celda 7	(M1) (40 cm)	1542	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Shigella flexneri</i>
Celda 7	(M1) (40 cm)	1435	<i>Terrabacteria group</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>
Celda 5	(M2) (20 cm)	1396			<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Celda 7	(M1) (40 cm)	1217	<i>Terrabacteria group</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Kocuria rosea</i>
------------	--------------	------	--------------------------------	-----------------------	----------------------

Realizado por: Ana Argoti, 2019

### 3.10 Análisis Estadístico

Hipótesis:

$$H_0: \mu_{\text{voltaje del suelo a 20cm}} < \mu_{\text{voltaje del suelo a 40 cm}}$$

$$H_1: \mu_{\text{voltaje del suelo a 20cm}} \geq \mu_{\text{voltaje del suelo a 40 cm}}$$

Nivel de significancia:

$$\alpha = 0.05$$

Estadístico de prueba:

Prueba de Muestras Emparejadas									
Diferencias Emparejadas									
					95% de intervalo de confianza de la diferencia				
		Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio	inferior	superior	T	gl	Sig. (bilateral)
Par 1	Suelo con profundidad de 20cm- Suelo con profundidad de 40cm	-0.049585	0.050443	0.007281	-0.064232	-0.034938	- 6.810	47	,000

Región de rechazo

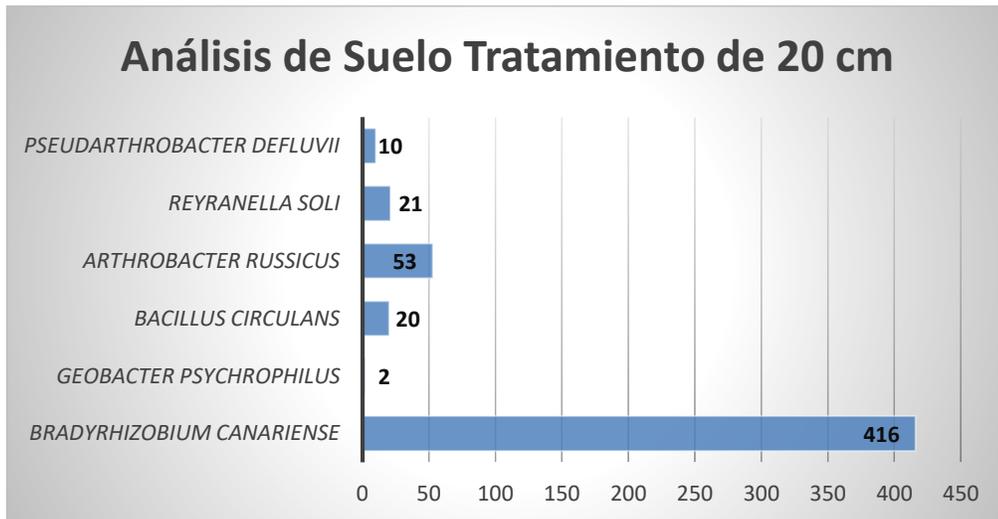
$$\text{Si el valor } p < \alpha$$

Se acepta la hipótesis nula

Decisión:

El valor p es mayor que el nivel de significancia, se acepta la hipótesis nula y se concluye que a mayor profundidad se presenta una mayor cantidad de microorganismos electrogénicos en el suelo de páramo alto andino por lo que es estadísticamente significativo.

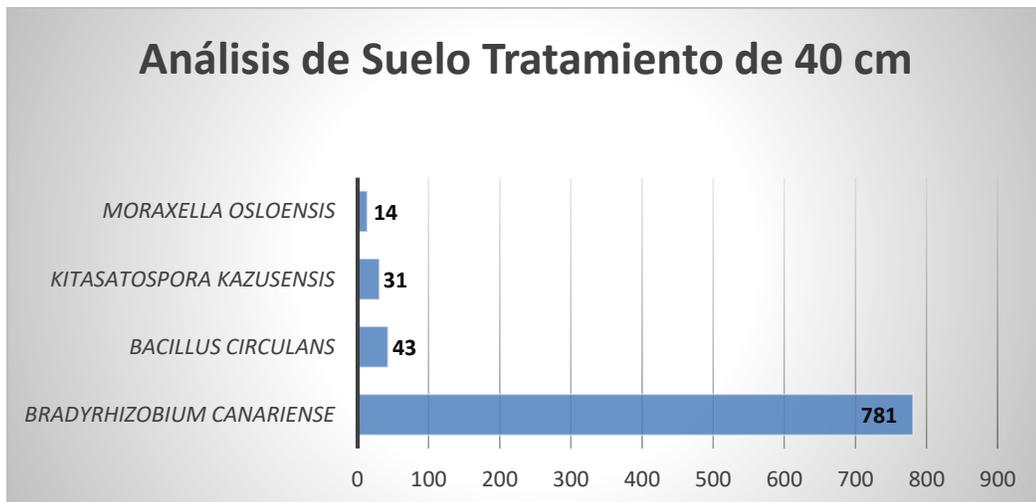
### 3.11 Especies encontradas en el suelo muestreado:



**Gráfico 3-3** Comparación de especies microbianas encontradas en CCM con suelo de profundidad de 20cm.

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

En el gráfico 3-3 el máximo está dado por la especie *Bradyrhizobium canariense*, con una aparición de 416 ejemplares, que refiere a las secuencias de cada unidad taxonómica operacional, indica cuantas lecturas salieron de cada especie o género. Mientras el mínimo está dado por *Geobacter psychrophilus*.

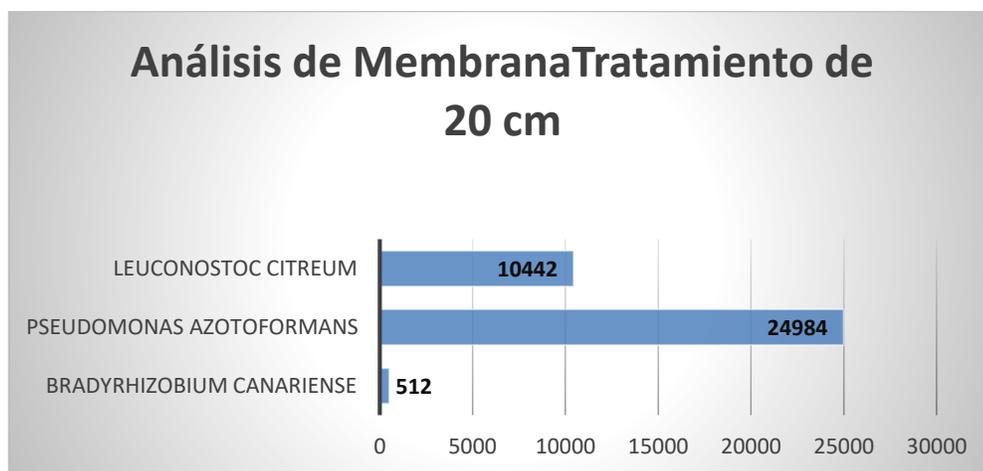


**Gráfico 4-3** Comparación de especies microbianas encontradas en CCM con suelo de profundidad de 40cm.

**Realizado por:** Ana Argoti, 2019

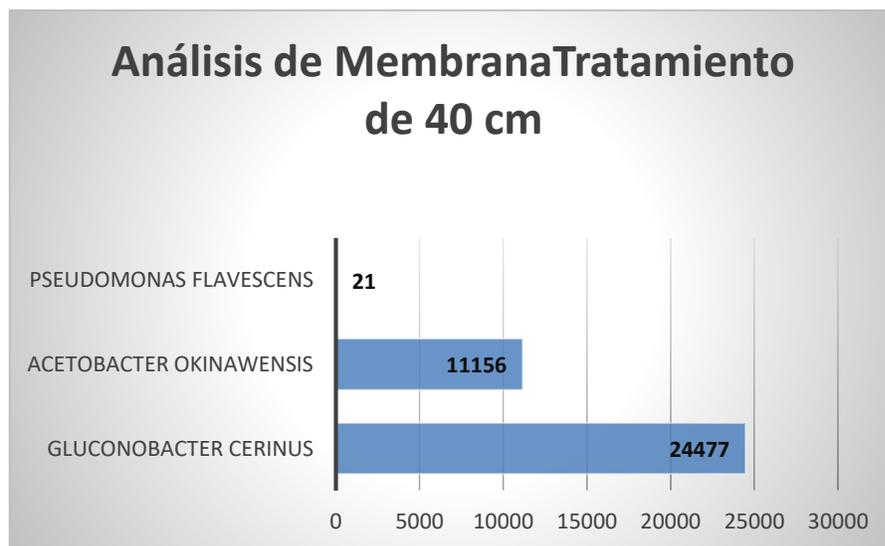
En el gráfico 4-3 el máximo está dado por la especie *Bradyrhizobium canariense*, con una aparición de 781 ejemplares, mientras el mínimo está dado por 14 ejemplares de *Moraxela osloensis*.

Especies encontradas en el biofilm de la membrana:



**Gráfico 5-3** Comparación de especies microbianas encontradas en membrana con suelo de profundidad de 20cm.

Realizado por: Ana Argoti, 2019



**Gráfico 6-3** Comparación de especies microbianas encontradas en membrana con suelo de profundidad de 40cm.

Realizado por: Ana Argoti, 2019

En el gráfico 5-3 el máximo esta dado por la especie *Pseudomonas azotoformans*, con una aparición de 24984 ejemplares, el máximo en el gráfico 6-3 está dado por la especie *Gluconobacter cerinus* con la aparición de 24477 ejemplares.

## CONCLUSIONES

- Mediante la identificación de ADN total de la muestra de suelo se determinó la presencia de *Bradyrhizobium canariense*, como especie dominante encontrada en suelo de páramo de alto andino de pajonal a una altura de 4000 msnm, esta muestra un porcentaje de abundancia del 63%, apareciendo 1195 ejemplares en ambas muestras de profundidad. Se considera que esta es la responsable de producción de bioelectricidad ya que al filo (*Proteobacteria*) y clase (*Alphaproteobacteria*) que pertenece son productores de electricidad en CCM.
- Además se identificaron otras especies con menor índice de aparición como *Geobacter psychrophilus*, que también pertenecen al filo *Proteobacteria*, pero a la clase *Deltaproteobacteria*, utilizados en MFC con suelos agrícolas. Y otras especies como: *Bacillus circulans*, *Arthrobacter ruscus*, *Kitasatospora kazusensis*, *Reyranella soli*, *Sporosarcina globispora*, *Moraxella osloensis*, *Methylocella silvestris*, *Hyphomicrobium facile*, *Pseudarthrobacter defluvii*, *Streptacidiphilus carbonis*, *Clostridium bowmanii*.
- Se acepta la hipótesis nula que concluye que a una mayor profundidad de suelo presenta una mayor cantidad de microorganismos electrogénicos. Debido a que los mayores voltajes alcanzados fueron en celdas de 40cm de profundidad. En los 16 días de monitoreo en las celdas en las que se utilizó como inóculo suelos de 40cm fueron de 0,3384 voltios; y en las celdas de 20 cm el mayor voltaje fue de 0,2539 voltios.
- El análisis genético de las membranas determinó que los microorganismos potencialmente electrogénicos son *Pseudomonas azotoformans*, con una aparición de 24984 ejemplares, la especie *Gluconobacter cerinus* con la aparición de 24477 ejemplares. La especie *Bradyrhizobium canariense*, aparece en menor proporción con aparición de 512 ejemplares. Mientras que el bioquímico determinó la aparición de la especie *Pseudomona aureginosa*, y en los análisis moleculares del suelo existe la aparición de especies de la misma familia como; *Pseudomonas mediterránea*, *Rhodopseudomonas rhenobacensis*, *Rhodopseudomonas pseudopalustris*. Además, existe la aparición de *Pseudomonas flavescens* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, las cuales provienen directamente del grupo de la *Pseudomona*

*aureginosa*. Los mediadores redox producidos por esta bacteria pueden usarse para la transferencia de electrones al ánodo generando bioelectricidad.

## **RECOMENDACIONES**

Se podría utilizar otros tipos de sustratos como alimentación para la CCM, pueden ser aguas residuales o residuos sintéticos para su aprovechamiento, debido a que estas poseen un contenido de materia orgánica y una CCM aprovecha la energía bioquímica liberada en esta degradación.

Implementar otro tipo de pruebas de identificación microbiana como pruebas API, basadas en fermentación de carbohidratos, producción de  $H_2S$ , reacciones de hidrólisis, con este sistema se puede identificar aproximadamente 600 especies.

## **GLOSARIO**

<b>CCM</b>	Celdas de Combustible Microbiano
<b>CCB</b>	Celdas de configuración de biocátodos
<b>TEE</b>	Transferencia Extracelular de Electrones
<b>SBEs</b>	Bioelectrochemical systems (Sistemas Bioelectroquímicos)
<b>H</b>	Hidrógeno
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>RAPD</b>	Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>API</b>	Índice Analítico de Perfil
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Ácido sulfhídrico
<b>ITS</b>	Espaciadores internos Transcritos (para evaluar variaciones interespecie)
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>C/N</b>	Relación Carbono- Nitrógeno
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>G-C</b>	Guanina y Citocina
<b>MPS</b>	Secuenciación masiva paralela
<b>NGS</b>	Secuenciación de segunda generación
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy)
<b>pb</b>	Partes por billón
<b>SIM</b>	Sulfide Indole Motility (medio de sulfuro indol para movilidad)
<b>TSI</b>	Triple Sugar Iron Agar (Agar Triple Azúcar de Hierro BD)
<b>CIC</b>	Capacidad de Intercambio Catiónico
<b>GSB</b>	Grado de saturación de bases
<b>PGPR</b>	Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas

## BIBLIOGRAFÍA

(CAR/PL), C. D. Aplicaciones de la Biotecnología en la industria, 2003. 1–132.

**ALVARADO, M. ET AL.** "Morfología de las colonias bacterianas." *Comunicacion Breve.*, [en línea], 2002, (México) pp. 1- 5 [Consulta: 05 enero 2019] Disponible en <https://microdonto.files.wordpress.com/2009/03/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.pdf>

Alvarez, M. V., Boquet, E., & De Fez, M. I. (n.d.). *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica.*

**ALZATE, L. F.** "Generación de electricidad a partir de una celda de combustible microbiana tipo pem." *Redalyc, Interciencia*, [en línea], 2008, (México) 33(7), pp. 503-509. [Consulta: 20 enero 2019] ISSN: 0378-1844. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33933706>

**ARMAS, P. R.** "Generación de electricidad microbiana con diferentes matrices orgánicas mediante celdas de combustibles". 2014. ESPOCH. CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3648>

**AVELLANEDA-ET AL.** "Actividades Enzimáticas en Consorcios Bacterianos de Suelos Bajo Cultivo de Papa con Manejo Convencional y Bajo Pastizal Enzyme Activities in Bacterial Consortium Isolated from Soils with Potato Crop under Conventional Management and under Grassland." *Revista Facultad Nacional de Agronomía -Medellín*, 65(1), 6349–6360. [en línea], 2012, (USA) 1(1), p. 19 [Consulta: 31 enero 2019]. Disponible en: Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179924340006>

**BORDI, C., & DE BENTZMANN, S.** "Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge." *Annals of Intensive Care*, [en línea], 2011, (USA) 1(1), p. 19 [Consulta: 31 enero 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/2110-5820-1-19>

**BOSE, A., ET AL.** "Electron uptake by iron-oxidizing phototrophic bacteria." *Nature Communications*, [en línea], 2014, (Canadá) 5, p. 3391. [Consulta: 15 febrero 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ncomms4391>

**BOU, G., ET AL.** "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, [en línea], 2011, (Colombia) 29(8), pp. 601–608. [Consulta: 06 marzo 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

**BOWEN, W. H., & KOO, H.** "Biology of streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms." *Caries Research*, [en línea], 2011, (México) 45(1), pp. 69–86. [Consulta: 31 enero 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000324598>

**BRITO, F.** "Identificación por fenotipo , cuantificación y técnicas moleculares de bacterias a dos profundidades en el cultivo " Hypericum " antes y después del tratamiento de 1-3 Dicloropropeno y Cloropicrina Fidel". 2014. Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3164/1/000110286.pdf>

**CALDERÓN, C., JARAMILLO, D., RÍOS, A., & BRITO, G.** "Monitoring of Microbial Population of the Páramo Soil of the Charge Zone of Lake Mapahuiña in Chimborazo-Ecuador". 2016. *Perfiles*, 1(1), 23–30.

**CASTILLO, D., & VARGAS, C.** "Producción de Bioelectricidad en Celdas de Combustible Microbiana utilizando *Acidithiobacillus ferrooxidans*". 2017. Ciencias.

**CHUGCHO, A. A.** *Generación de Electricidad Microbiana con diferentes matrices orgánicas mediante celdas de combustibles* .2014. Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

**COLLAZOS, A. M., & MONTAÑO, E. B.** *Isolation of Electrogenic Microorganisms with Potential to Reduce Hexavalent Chromium*, 22(Vi), 2017. 27–36.

**COMPANY, B. AND D.** BD Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar), 2–5. 2003. Retrieved from <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254458.pdf>

**DEEPIKA, J., MEIGNANALAKSHMI, S., & RICHARD THILAGARAJ, W.** "A study on bioelectricity production by the synergistic action of *Bacillus tequilensis* DMR-5 and *Pseudomonas aeruginosa* DMR-3 isolated from rumen fluid." *American Journal of Environmental Sciences*, [en línea], 2013, (México) 9(5), pp. 424–430. [Consulta: 31 enero 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.3844/ajessp.2013.424.430>

**DÍAZ-GRANADOS, M., NAVARRETE, J. D., & SUÁREZ, T.** "Páramos: Hidrosistemas Sensibles." *Revista de Ingeniería. Facultad de Ingeniería. Universidad de Los Andes..* [en línea], 2005, (Ecuador) pp. 64–75 [Consulta: 30 junio 2019]. Disponible en:

<https://ojsrevistaing.uniandes.edu.co/ojs/index.php/revista/article/view/373>

**DU, Z., LI, H., & GU, T.** "A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy." *Biotechnology Advances*, [en línea], 2007, (Canadá) 25(5), pp. 464–482. [Consulta: 31 julio 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.05.004>

**ESCALANTE LOZADA, A., LAGARDA, G., JIMÉNEZ, M., & ZAPATA, B.** "Diversidad Bacteriana Del Suelo: Métodos De Estudio No Dependientes Del Cultivo Microbiano E Implicaciones Biotecnológicas." *Agrociencia*, 38(6), 583–592. [en línea], 2004, (Canadá) 38(6), pp. 583–592. [Consulta: 31 julio 2019]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30238602>

**FERNÁNDEZ-OLMOS, A., GARCÍA, C., SÁEZ-NIETO, J. A., & VALDEZATE, S.** "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [en línea], 2011, (Ecuador) (Vol. 29). p. 19 [Consulta: 17 de agosto 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

**GANGULY, S., & MITCHELL, A. P.** "Mucosal biofilms of *Candida albicans*." *Current Opinion in Microbiology*, [en línea], 2011, (México) 14(4), pp. 380–385. [Consulta: 19 de agosto 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.06.001>

**GÓMEZ, M., CASTRO, H., & MALAGÓN, D.** "Interpretación de procesos redox en suelos sulfatados ácidos del distrito de riego del Alto Chicamocha " *Boyacá*. [en línea], 2005, (Colombia) 1, 23(1), pp. 136–142 [Consulta: 31 enero 2019]. Disponible en:

**HEDBERG, O.** "Afroalpine vegetation compared to paramo: convergent adaptations and divergent differentiation. In: Balslev, H., Luteyn J.L. (Eds.), *Paramo: An Andean Ecosystem under Human Influence*." *London: Academic Press.*, [en línea], 1992, (Perú) 15– 29. [Consulta: 31 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.worldcat.org/title/paramo-an-andean-ecosystem-under-human-influence/oclc/26290593>

**JIANG, Y., ULRICH, A. C., & LIU, Y.** "Coupling bioelectricity generation and oil sands tailings treatment using microbial fuel cells." *Bioresource Technology*, [en línea], 2013, (USA) 139, pp. 349–354. [Consulta: 10 septiembre 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.050>

**LLAMBÍ, L., SOTO-W, A., BORJA, P., SOTO-W, A., & CALLE, T.** *Páramos Andinos Ecología, hidrología y suelos de páramos*. 2012.

**LOERA, A., RAMÍREZ, F., AVELAR, F., & GUERRERO, A.** "Biopelículas multi-especie : asociarse para sobrevivir Multi-species biofilms : association to survive". *Investigacion y Ciencia de La Universidad Autonoma de Aguascalientes*, [en línea], 2012, (Colombia) 20(54), pp. 49–56. [Consulta: 15 septiembre 2019]. Disponible en: <https://studylib.es/doc/4534601/biopel%C3%ADculas-multi-especie---universidad-aut%C3%B3noma-de-agua...>

**LOGROÑO, W. N., ECHEVERRÍA, M. M., RECALDE, C. G., & GRAZIANI, P.** "Bioconversion of organic solid wastes with soils from the Amazonian and high Andean regions of Ecuador in single chamber microbial fuel cells | Bioconversión de residuos sólidos orgánicos con suelos de la región Amazónica y alto andina del Ecuador en celd". *Informacion Tecnologica*, [en línea], 2012, (Ecuador) 26(2), pp. 61–68. [Consulta: 31 enero 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000200008>

**LÓPEZ, J., CASTILLO, F., & SALAVERT, M.** "Técnicas de identificación." *Microbiología Aplicada*, [en línea], 2007, (México) pp. 27–41. [Consulta: 31 enero 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF02643862>

**LÓPEZ, L., ET AL..** "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología." *Investigación En Discapacidades*, [en línea], 2014, (Colombia) 3(1), pp. 1–9. [Consulta: 12 octubre 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403563>

**MAC FADDIN, J. F.** *Uso de Pruebas Bioquímicas y Técnicas Rápidas para la Caracterización Fisiológica de Bacterias. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3ª edición, pp. 1–9). 2003. México: S. A. De C. V.

**MARTÍNEZ, J.** "RÉGIMEN DE HUMEDAD DEL SUELO DE PÁRAMO Y SU RELACIÓN CON LAS PRÁCTICAS SOCIOCULTURALES DE MANEJO ANTE LA VARIABILIDAD CLIMÁTICA." UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI. 2017. Retrieved from <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4291/1/UTC-PC-000184.pdf>

**MENA, P. ET ALL.** "Páramo. Paisaje estudiado, habitado, manejado e institucionalizado. In *EcoCiencia* " (Editorial).2011.

**MOCALI, S., GALEFFI, C., PERRIN, E., FLORIO, A., MIGLIORE, M., FRANCESCO, C., ... BENEDETTI, A.** Alteration of bacterial communities and organic matter in microbial fuel cells (MFCs) supplied with soil and organic fertilizer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3),2013. 1299–1315. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3906-6>

**MORA COLLAZOS, A., & BRAVO MONTAÑO, E.** "Bacterial diversity associated with anodic biofilms in microbial fuel cells fed with wastewater." *Acta Biologica Colombiana*, [en línea], 2005, (Colombia) 22(1), pp. 77–84. [Consulta: 15 julio 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/abc.v22n1.55766>

**MUÑOZ, M. A.** "Estimation of kinetic parameters of *Saccharomyces cerevisiae* in batch fermentation during different growth conditions". *ResearchGate*, [en línea], 2013, (Perú) p. 1–11. [Consulta: 15 agosto 2019]. Disponible en: Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/257310255>

**ORTEGA, A. E., & MALAVOLTA, E.** "Los más recientes micronutrientes vegetales." *Informaciones Agronómica de Hispanoamérica*, [en línea], 2012, (Ecuador) 7, pp. 16–25. [Consulta: 30 septiembre 2019]. Disponible en: [http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/232B901BB70122F985257A80005228D7/\\$FILE/16.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/232B901BB70122F985257A80005228D7/$FILE/16.pdf)

**PANSU, M., & GAUTHEYROU, J.** Soluble Salts. *Handbook of Soil Analysis*, 605–628. 2007. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-31211-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-540-31211-6_18)

**PARKASH, A.** "Generation of Bioenergy from Sewage Using Dual Chamber Microbial Fuel Cell." *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, [en línea], 2015, (USA) 05(07). [Consulta: 31 enero 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10571-011-9705-2><https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000242>

**PÉREZ, M., & MOTA, M.** "Morfología y estructura bacteriana." *Revista de Actualización Clínica Investiga*, [en línea], 2010, (Ecuador) 1(1), 49, pp 1–9. [Consulta: 30 septiembre 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10571-011-9705-2>

**PODWOJEWSKI, P., POULENARD, J., ZAMBRANA, T., & HOFSTEDDE, R.** "Overgrazing effects on vegetation cover and properties of volcanic ash soil in the pa". *Soil Use and Management*, [en línea], 2002, (España) 18, pp. 45–55. [Consulta: 10 octubre 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1079/SUM2001100>

**PODWOJEWSKI, PASCAL, & POULENARD, J.** *Los suelos de los Páramos del Ecuador*. serie de Páramo 5, (January 2000), 1–75.

**PRESCOTT, L.; HARLEY, J.; KLEIN, D.** *Microbiología*. Cuarta edición. (4ta Edición). 1999. McGraw-Hill.Interamericana.

**PURUNCAJAS, L.** "Identificación de bacterias benéficas mediante cultivos microbiológicos para el tratamiento de aguas residuales en el sector la calzada (humedal) del cantón Saquisilí, provincia de Cotopaxi", 2013. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.

**QUINTEROS, P., TRIPALDI, P., & ANSALONI, R.** "Comparación química de suelos en distintas coberturas vegetales del PNC mediante métodos de clúster análisis". *II Congreso Binacional De Investigación, Ciencia Y Tecnología De Las Universidades*, 2012. 746–764.

**RABAEY, K., & VERSTRAETE, W.** "Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation", 23(6). 2005. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.008>

**RAHIMNEJAD, M., ADHAMI, A., DARVARI, S., ZIREPOUR, A., & OH, S. E.** "Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review." *Alexandria Engineering Journal*, [en línea], 2015, (México) 54(3), pp. 745–756. [Consulta: 16 octubre 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aej.2015.03.031>

**REVELO, D. M., HURTADO, N. H., & RUIZ, J. O.** "Celdas de combustible microbianas (CCMs): Un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica." *Informacion Tecnologica*, [en línea], 2013, (España) 24(6), pp. 17–28. [Consulta: 18 octubre 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000600004>

**REVELO, D. M., HURTADO, N. H., RUIZ, J. O., & LÓPEZ, S.** "Uso de microorganismos nativos en la remoción simultánea de materia orgánica y cr(VI) en una celda de combustible microbiana de biocátodo (CCM)." *Informacion Tecnologica*, [en línea], 2015, (USA) 26(6), pp. 77–88. [Consulta: 06 noviembre 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000600010>

**RIETZ, D. N., & HAYNES, R. J.** "Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity". *Elsevier. Soil Biology and Biochemistry*, [en línea], 2003, (México) Volume 35(6), 845-854. [Consulta: 06 noviembre 2019]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071703001251>

**RÍOS LARA, S. C., & ECHEVERRÍA, M.** *Generación de bioelectricidad microbiana con estiércol de ganado vacuno, mediante celdas de combustible microbiano, Estación Experimental Tunshi ESPOCH. Facultad de Ciencias* (Vol. Bachelor). 2016. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/5662>

**RODICIO, R., & MENDOZA, M. DEL C.** *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbial Clin*, 22(4), 2016. 238–245.

**ROJAS, A.** "Conceptos y práctica de microbiología general." *Universidad Nacional de Colombia*, [en línea], 2011, (Colombia) 1(1), pp. 1–161. [Consulta: 18 septiembre 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ijc.10666>

**ROMÁN, J.** *Pruebas bioquímicas de identificación. Bioservice S.R.L. ESPOL (Escuela Superior Politécnica del Litoral)*. 2003. Disponible en: <https://es.slideshare.net/StephaneLovon/pruebasbioquimicasdeidentificacion243338506-16283374>

**SCHAEFER, G. L., COSH, M. H., & JACKSON, T. J.** The USDA Natural Resources Conservation Service Soil Climate Analysis Network (SCAN). *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology*, [en línea], 2007, (USA) 24(12), pp. 2073–2077. [Consulta: 18 de septiembre 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1175/2007JTECHA930.1>

**SCHLEGEL, H.** Microbiología general. *General Pharmacology*, 27, 679–688. 1997. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1468-0084.1995.tb00031.x>

**SORIA MELGUIZO, F. D.** SIM Medium, 1–4. 2009.

**TRAPPETTI, C., OGUNNIYI, A. D., OGGIONI, M. R., & PATON, J. C.** Extracellular matrix formation enhances the ability of streptococcus pneumoniae to cause invasive disease. 2011. *PLoS ONE*, 6(5). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019844>

**VALTEK, S. A.** Agar Urea de Christensen, (562). 2016.

**VARELA, G.** "Fisiología y metabolismo bacteriano." *Educa Madrid*, [en línea], 2004, (USA) pp. 1–8 [Consulta: 18 septiembre 2019]. Disponible en:

[http://www.educa2.madrid.org/cms\\_tools/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/10.-](http://www.educa2.madrid.org/cms_tools/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/10.-)

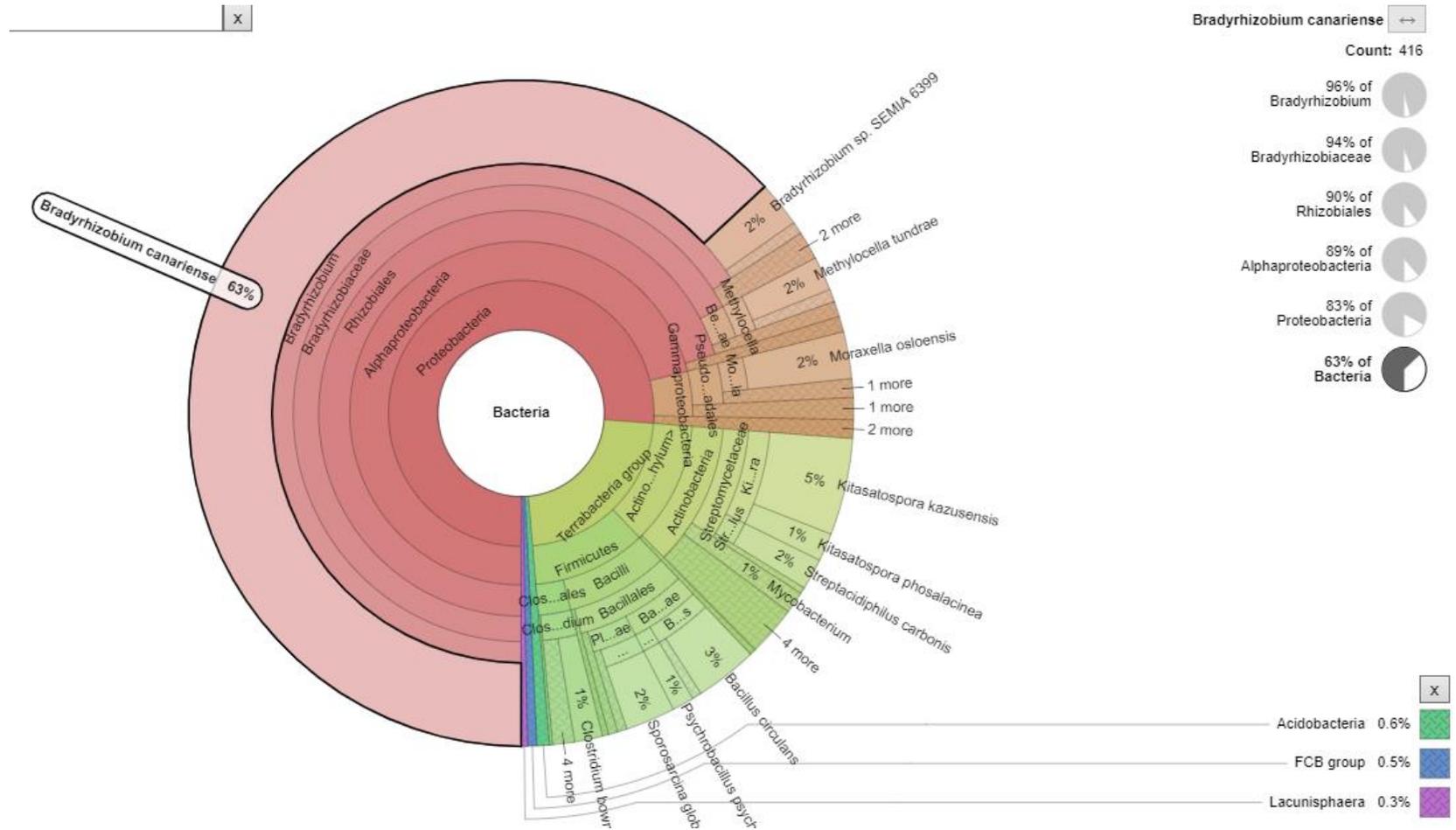
Fisiologia y metabolismo bacteriano.pdf

**WILLENEGGER, H.** Az AO-International. *Magyar Traumatologia Orthopaedia Es Helyreallito Sebeszet*, 33(4), 1990. 243–246.

**ZHANG, T., & TREMBLAY, P. L.** *Current challenges and future perspective on emerging bioelectrochemical technologies*. 2016. *Frontiers in Microbiology*.

# ANEXOS

## Anexo A. Resultados Genéticos de la muestra de suelo mostrados con Krona



## Anexo B- Configuración de CCM

