



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y EVALUACIÓN DEL
POTENCIAL BIOENERGÉTICO DE BACTERIAS
PROVENIENTES DE SEDIMENTOS DE LAS LAGUNAS DE
ORIGEN VOLCÁNICO QUILOTOA Y AMARILLA.**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORAS: TANNIA LISBETH FREIRE GUEVARA

MARÍA JOSÉ GALLO ALVEAR

DIRECTORA: Ing. ANGÉLICA MARÍA SAETEROS HERNÁNDEZ, PhD.

Riobamba – Ecuador

2023

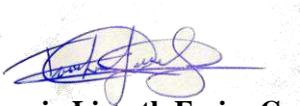
© 2023, Tannia Lisbeth Freire Guevara & María José Gallo Alvear

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo citas bibliográficas del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho los Autores.

Nosotras, Tannia Lisbeth Freire Guevara & María José Gallo Alvear, declaramos que el presente Trabajo de Titulación es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autoras asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de Trabajo de Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 06 de enero del 2023



Tannia Lisbeth Freire Guevara

CI: 180474177-3

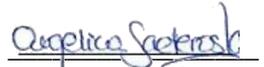
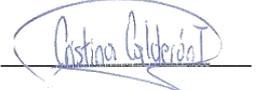


María José Gallo Alvear

CI:060584071-9

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Proyecto de Investigación, **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOENERGÉTICO DE BACTERIAS PROVENIENTES DE SEDIMENTOS DE LAS LAGUNAS DE ORIGEN VOLCÁNICO QUILOTOA Y AMARILLA**, de responsabilidad de las estudiantes: **TANNIA LISBETH FREIRE GUEVARA** y **MARÍA JOSÉ GALLO ALVEAR** ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos y legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Jara Samaniego Lourdes Janneth, PhD. PRESIDENTA DEL TRIBUNAL		2023-08-07
Ing. Angélica María Saeteros Hernández, PhD DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2023-08-07
Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia, MSc. ASESORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2023-08-07

DEDICATORIA

Dedico esta investigación y el esfuerzo de toda mi carrera universitaria a mis padres, Lidia Alvear y José Gallo , quienes me enseñaron que a pesar de los obstáculos hay que mostrarle la mejor cara a las adversidades, gracias por ser valientes y enseñarme a serlo , gracias por sembrar en mi la semilla de la responsabilidad y perseverancia una enorme gratitud por el esfuerzo que han hecho por mí y darme todo lo necesario para cumplir mis metas, es poco en cuanto puedo expresar en este fragmento mil gracias pas. A mi hermana Salin, porque no me ha dejado sola en ningún momento, me ha llenado de consejos y fuerza para avanzar, realmente un apoyo incondicional, quisiera decirle que el esfuerzo que ella pone a diario para salir adelante y darnos todo lo que está en sus manos ahora ha rendido frutos con la culminación de mis estudios. A Vero y Luis, quiero dedicarles también este trabajo de titulación porque sin su apoyo incondicional, y estímulo permanente a cumplir mis metas, realmente no hubiera logrado, alcanzar mi meta. A Gabriel y Karla, porque han sido un ejemplo de perseverancia y paciencia. A mis niños Gaby y Jordy, este trabajo también va por ustedes porque con esfuerzo y concentración se puede alcanzar las metas no dejen nunca de lado sus sueños porque voy a estar a su lado para que los cumplan. A Cris por su manera de ver la vida, me ha enseñado a ser más fuerte, perseverante, a ser un adulto responsable, agradecerte por guiar mis pasos y con tu ejemplo encaminarme a ser una mejor persona y una excelente profesional.

María

Dedico con todo mi corazón esta tesis, a mis padres Marcelo Freire y Guillermina Guevara por ser unas personas honestas, trabajadoras y que sin su apoyo incondicional jamás lo hubiera logrado, a mi abuelita Elsa Manjarrez que con su amor y bendiciones han sido siempre mi pilar fundamental, a mi Tío Mario Freire que en paz descansa. A mis hermanos: Evelyn, Marcela y Kenny por formar parte de mi vida, con ellos he compartido muchas alegrías, penas y pese a todo han estado en mis mejores y peores momentos. A mis primas Narváez Guevara que con sus palabras de apoyo no dejaron que me rinda, y siempre con un tú puedes estuvieron para mí, A mis tías América, Eva y Nancy por su amparo. A Ariel Hurtado que con su amor, conocimientos y tiempo apporto en este trabajo de titulación, y por último un agradecimiento a mis amigas incondicionales, Cynthia, Evelyn, Diana, Sol y Majitos.

Tannia

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecerle a Dios por darnos la oportunidad de cumplir una etapa más, a la Virgencita de Baños a quien hemos encomendado este trabajo de titulación. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a sus docentes por compartir sus conocimientos y habernos formado profesionalmente. Al grupo de investigación GEEA por darnos la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Queremos expresar nuestros más sinceros agradecimientos a nuestra tutora Dra. Angélica María Saeteros, por formar parte de este proyecto de investigación que ha sido un verdadero reto y que junto a ella hemos podido atravesar todas las adversidades. A nuestra asesora Inge Cristi Calderón que nunca nos ha abandonado en este trayecto, cuando la necesitamos ha sido nuestra base y apoyo incondicional tanto emocional como intelectual. De manera especial quisiéramos agradecer también a aquellos técnicos docentes que nos extendieron su mano y ser un pilar fundamental para culminar nuestro trabajo de investigación: Ginita Álvarez, Andrés Mena, Yolita Buenaño, y Benja Román. También queremos extender nuestra gratitud a aquellos que nos impulsaron con ánimos y su ayuda para no decaer en los momentos que nos sentíamos confundidas, nuestros amigos incondicionales: Sol, Ariel, Cristian, Emerson, Damaris, Maritza, Jenny. A María José Gallo por ser una amiga y compañera de tesis, por estar junto a mi en este arduo trabajo de titulación y cumplir nuestro sueño juntas. A Tannia Freire Quiero agradecerle por aceptar caminar junto a mi en este nuestro trabajo de titulación, que ha sido una aventura, llena de lágrimas, risas, decepciones, pero que juntas con paciencia hemos podido superar cada obstáculo hasta el final, quiero agradecer sus consejos, y su manera de ver la vida, que también ha alumbrado la mía.

María & Tannia

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
SUMMARY.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos de la investigación.....	6

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Antecedentes.....	7
2.2. Bases teóricas.....	8
2.2.1. <i>Sedimento</i>	8
2.2.1.1. <i>Tipos de sedimentos</i>	8
2.2.2. <i>Ambientes extremos</i>	9
2.2.3. <i>Microorganismos extremófilos</i>	10
2.2.4. <i>Microorganismos psicrófilos</i>	11
2.2.5. <i>Adaptaciones moleculares de los organismos psicrófilos</i>	11
2.2.5.1. <i>Aumento de la fluidez de la membrana plasmática</i>	11
2.2.5.2. <i>Producción de enzimas</i>	11
2.2.5.3. <i>Proteínas anticongelantes</i>	12
2.2.5.4. <i>Formación de pigmentos</i>	12
2.2.5.5. <i>Procesos de transcripción y traducción</i>	12
2.2.6. <i>Aislamiento de microorganismos</i>	12
2.2.6.1. <i>Pruebas fenotípicas</i>	13
2.2.7. <i>Medios de cultivo</i>	13

2.2.7.1.	<i>Tipos de medios de cultivo</i>	14
2.2.8.	<i>Bacterias</i>	14
2.2.8.1.	<i>Morfología microscópica</i>	15
2.2.8.2.	<i>Morfología macroscópica</i>	15
2.2.9.	<i>Identificación microbiana</i>	16
2.2.9.1.	<i>Tinción diferencial de gram</i>	16
2.2.9.2.	<i>Pruebas bioquímicas</i>	16
2.2.10.	<i>Bioenergía</i>	21
2.2.11.	<i>Bioenergética microbiana</i>	22
2.2.12.	<i>Microorganismos electrogénicos</i>	22
2.2.13.	<i>Bacterias electrogénicas</i>	22
2.2.14.	<i>Sistemas bioelectroquímicos</i>	22
2.2.15.	<i>Celdas de combustible microbianas</i>	23
2.2.15.1.	<i>Componentes de la celda de combustible microbiana</i>	23
2.2.16.	<i>Principio básico de las CCMs</i>	25
2.2.17.	<i>Rendimiento de las celdas de combustible microbianas (CCMs)</i>	26
2.2.18.	<i>Factores que afectan el rendimiento de las CCMs</i>	27
2.3.	Base Legal	28
2.3.1.	<i>Constitución de la República del Ecuador</i>	28
2.3.2.	<i>Reglamento Al Código Orgánico Del Ambiente</i>	29
2.3.3.	<i>TULSMA</i>	30
2.3.4.	<i>Ley Orgánica Del Servicio Público De Energía Eléctrica</i>	30
2.3.5.	<i>Norma Técnica Ecuatoriana INEN</i>	30
2.3.5.1.	<i>NTE INEN 2169: 2013</i>	30
2.3.6.	Reglamento Código Orgánico del Ambiente	31

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	33
3.1.	Lugar de investigación	33
3.1.1.	<i>Laguna Amarilla</i>	33
3.1.2.	<i>Laguna Quilotoa</i>	33
3.2.	Tipo de Investigación	34
3.2.1.	<i>Por el nivel de investigación</i>	34
3.2.2.	<i>Por el enfoque</i>	34
3.2.3.	<i>Por la temporalidad</i>	35

3.3.	Diseño de la investigación	35
3.4.	Identificación de variables	35
3.5.	Hipótesis	35
3.6.	Población de estudio	35
3.7.	Tamaño de la muestra	35
3.8.	Etapas de la investigación	36
3.8.1.	<i> Materiales y equipos</i>	37
3.8.2.	<i> Etapa uno: Recolección de las muestra</i>	39
3.8.2.1.	<i> Muestreo de sedimentos</i>	39
3.8.2.2.	<i> Ficha de muestreo</i>	40
3.8.3.	<i> Etapa dos: Caracterización físicoquímica de los sedimentos</i>	41
3.8.3.1.	<i> In situ</i>	41
3.8.3.2.	<i> Ex situ</i>	41
3.8.4.	<i> Etapa tres: Inoculación de cepas bacterianas</i>	44
3.8.4.1.	<i> Dilución</i>	44
3.8.4.2.	<i> Preparación de medio de cultivo PCA</i>	45
3.8.4.3.	<i> Aislamiento de cepas bacterianas</i>	45
3.8.5.	<i> Etapa cuatro: Caracterización fenotípica</i>	45
3.8.5.1.	<i> Caracterización macroscópica</i>	45
3.8.5.2.	<i> Caracterización microscópica</i>	46
3.8.5.3.	<i> Caracterización bioquímica</i>	46
3.8.6.	<i> Etapa cinco: Celdas de combustión microbianas</i>	50
3.8.6.1.	<i> Fabricación celdas de combustión microbiana</i>	50
3.8.6.2.	<i> Esterilización del material</i>	50
3.8.6.3.	<i> Tratamiento de la fibra de carbono</i>	51
3.8.7.	<i> Etapa seis: Siembra de bacterias electrogénicas</i>	51
3.9.	Análisis estadístico	51

CAPÍTULO IV

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1.	Caracterización físico-química de los sedimentos	53
4.1.1.	<i> Sedimentos de la laguna Quilotoa</i>	53
4.1.1.1.	<i> Características físicas</i>	53
4.1.1.2.	<i> Características fisicoquímicas</i>	54
4.1.2.	<i> Sedimentos de la laguna Amarilla</i>	57

4.1.2.1.	<i>Características físicas</i>	57
4.1.2.2.	<i>Características fisicoquímicas</i>	58
4.2.	Caracterización fenotípica	60
4.2.1.	Caracterización macroscópica	60
4.2.1.1.	<i>Cuantificación y morfología de colonias pertenecientes a la laguna Quilotoa</i>	60
4.2.1.2.	<i>Cuantificación y morfología de las colonias pertenecientes a la laguna Amarilla</i>	64
4.2.2.	Caracterización microscópica	69
4.2.2.1.	<i>Resultados de la tinción Gram de las colonias de bacterias aisladas de la laguna Quilotoa</i>	69
4.2.2.2.	<i>Resultados de la tinción Gram de las colonias de bacterias aisladas de la laguna del Amarilla</i>	70
4.3.	Caracterización Bioquímica	73
4.4.	Configuración de las Celdas de Combustible Microbiana	75
4.4.1.	<i>Beneficios de usar CCM</i>	75
4.4.2.	<i>Funcionamiento</i>	75
4.4.3.	<i>Configuración de las CCM</i>	76
4.4.4.	<i>Estructura de las CCM</i>	77
4.4.5.	<i>Electrodos</i>	77
4.4.6.	<i>Ánodo</i>	78
4.4.7.	<i>Cátodo</i>	78
4.4.8.	<i>Inoculo</i>	78
4.5.	Potencial bioenergético	78
4.5.1.	Registro de voltaje	78
4.5.1.1.	<i>Comparación de las CCM</i>	82
4.5.2.	<i>Curvas de polarización</i>	83
4.5.3.	<i>Bacterias electrogénicas</i>	87
4.6.	Análisis estadístico	88
4.6.1.	Prueba de ANOVA	88
4.6.1.1.	<i>ANOVA CCM Quilotoa vs Amarilla</i>	90
4.6.2.	Prueba de Tukey	90
CONCLUSIONES		92
RECOMENDACIONES		93
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1:	Técnicas de caracterización fenotípica más usuales	13
Tabla 2-2:	Interpretación de resultados prueba Catalasa.....	17
Tabla 2-3:	Interpretación de resultados prueba TSI	17
Tabla 2-4:	Interpretación de resultados prueba Kligler	18
Tabla 2-5:	Interpretación de resultados prueba SIM	19
Tabla 2-6:	Interpretación de resultados prueba indol	19
Tabla 2-7:	Interpretación de resultados prueba Urea de Christensen	20
Tabla 2-8:	Interpretación de resultados prueba indol	20
Tabla 2-9:	Interpretación de resultados prueba manitol	20
Tabla 2-10:	Interpretación de resultados prueba manitol	21
Tabla 2-11:	Clasificación de los sistemas bioelectroquímicos	23
Tabla 2-12:	Factores que inciden en la eficiencia de las CCMs.....	27
Tabla 3-1:	VARIABLES de la investigación	35
Tabla 3-2:	Materiales y equipo de cada etapa de la investigación	37
Tabla 3-3:	Geolocalización de los puntos de muestro en la laguna de Quilotoa.....	39
Tabla 3-4:	Geolocalización de los puntos de muestro en la laguna Amarilla	40
Tabla 3-5:	Formato de ficha de muestreo.....	40
Tabla 4-1:	Características físicas de los sedimentos de la laguna Quilotoa	53
Tabla 4-2:	Características fisicoquímicas de los sedimentos de la laguna Quilotoa	54
Tabla 4-3:	Óxidos de los sedimentos de la laguna Quilotoa	56
Tabla 4-4:	Características físicas de los sedimentos de la laguna Amarilla	57
Tabla 4-5:	Características químicas de los sedimentos de la laguna Amarilla.....	58
Tabla 4-6:	Número de colonias contables por cada dilución de la muestra QN1.....	60
Tabla 4-7:	Número de colonias por cada dilución de la muestra QN2.....	61
Tabla 4-8:	Número de colonias por cada dilución de la muestra QN3.....	61
Tabla 4-9:	Número de colonias por cada dilución de la muestra QN4.....	61
Tabla 4-10:	Número de colonias por cada dilución de la muestra QN5.....	62
Tabla 4-11:	Número de colonias por cada dilución de la muestra QN6.....	62
Tabla 4-12:	Número de colonias por cada dilución de la muestra QN7.....	62
Tabla 4-13:	Número de colonias por cada dilución de la muestra QN8.....	63
Tabla 4-14:	Número promedio de colonias por cada dilución de la muestra de la laguna Quilotoa	63
Tabla 4-15:	Características morfológicas de los 12 tipos de bacterias.....	64

Tabla 4-16:	Número de colonias por cada dilución de la muestra AN1.....	65
Tabla 4-17:	Número de colonias por cada dilución de la muestra AN2.....	65
Tabla 4-18:	Número de colonias por cada dilución de la muestra AN3.....	65
Tabla 4-19:	Número de colonias por cada dilución de la muestra AN4.....	66
Tabla 4-20:	Número de colonias por cada dilución de la muestra AN5.....	66
Tabla 4-21:	Número de colonias por cada dilución de la muestra AN6.....	66
Tabla 4-22:	Número de colonias por cada dilución de la muestra AN7.....	67
Tabla 4-23:	Número de colonias por cada dilución de la muestra AN8.....	67
Tabla 4-24:	Número promedio de colonias por cada dilución de la muestra de la laguna Amarilla	67
Tabla 4-25:	Características morfológicas de los 10 tipos de bacterias	68
Tabla 4-26:	Características microscópicas las colonias de bacterias de la laguna Quilotoa ...	69
Tabla 4-27:	Características microscópicas las colonias de bacterias de la laguna Amarilla ...	70
Tabla 4-28:	Caracterización bioquímica de muestras de la laguna Quilotoa	73
Tabla 4-29:	Caracterización bioquímica de muestras de la laguna Amarilla	74
Tabla 4-30:	Promedio de voltaje por día para CCM laguna de Quilotoa	79
Tabla 4-31:	Promedio de voltaje por día para CCM de laguna Amarilla.....	81
Tabla 4-32:	Parámetro del instrumento	83
Tabla 4-33:	Prueba ANOVA para CCM Quilotoa	89
Tabla 4-34:	Prueba ANOVA para CCM Amarilla.....	89
Tabla 4-35:	Prueba ANOVA para CCM Quilotoa y Amarilla	90
Tabla 4-36:	Prueba Tukey para CCM Quilotoa y Amarilla	90

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1:	Clasificación de los microorganismos extremófilos	10
Ilustración 2-2-:	Agrupaciones bacterianas.....	15
Ilustración 2-3:	Principio básico de CCMs.....	26
Ilustración 3-1:	Mapa de la laguna Amarilla – El Altar.....	33
Ilustración 4-1:	Porcentaje de cocos y bacilos obtenidos de la laguna Quilotoa	70
Ilustración 4-2:	Porcentaje de cocos y bacilos obtenidos de la laguna Amarilla.....	71
Ilustración 4-3:	CCM con sedimentos de la laguna Quilotoa y Amarilla.....	79
Ilustración 4-4:	Voltaje generados por las CCM con sedimentos de la laguna Quilotoa	80
Ilustración 4-5:	Voltaje generados por las CCM con sedimentos de la laguna Amarilla	82
Ilustración 4-6:	Comparación de los voltajes generados por las CCM con sedimentos de la laguna Quilotoa y Amarilla	82
Ilustración 4-7:	Polarización de la CCM Quilotoa 1	84
Ilustración 4-8:	Polarización de la CCM Quilotoa 2	84
Ilustración 4-9:	Polarización de la CCM Quilotoa 3	85
Ilustración 4-10:	Polarización de la CCM Amarilla 1	85
Ilustración 4-11:	Polarización de la CCM Amarilla 2	86
Ilustración 4-12:	Polarización de la CCM Amarilla 3	86

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** RECOLECCIÓN DE MUESTRAS EN LA LAGUNA QUILOTOA
- ANEXO B:** RECOLECCIÓN DE MUESTRAS EN LA LAGUNA AMARILLA
- ANEXO C:** ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS DE LOS SEDIMENTOS
- ANEXO D:** PLANIFICACIÓN DEL TRABAJO DE DILUCIÓN, SIEMBRA Y TINCIÓN
- ANEXO E:** PREPARACIÓN Y PLAQUEO DE AGAR PCA
- ANEXO F:** PREPARACIÓN DE DILUCIONES Y SIEMBRA EN SUPERFICIE DE LAS MUESTRAS
- ANEXO G:** INCUBACIÓN DE LOS PRIMEROS 7 DÍAS A TEMPERATURA AMBIENTE LAGUNA QUILOTOA
- ANEXO H:** RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS DESPUÉS DE 7 DÍAS EN TEMPERATURAS AMBIENTE LAGUNA AMARILLA
- ANEXO I:** RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS DESPUÉS DE 7 DÍAS EN TEMPERATURAS DE 5 A 10 °C
- ANEXO J:** AISLAMIENTOS DE BACTERIAS
- ANEXO K:** BACTERIAS AISLADAS DESPUÉS DE 7 DÍAS A TEMPERATURA AMBIENTE
- ANEXO L:** TINCIÓN GRAM DE LAS BACTERIAS
- ANEXO M:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS
- ANEXO N:** ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LAS CELDAS DE COMBUSTIÓN
- ANEXO Ñ:** TRATAMIENTO DE LA FIBRA DE CARBONO
- ANEXO O:** CONSTRUCCIÓN DE LAS CELDAS DE COMBUSTIÓN MICROBIANA
- ANEXO P:** INSTALACIÓN DE LAS CELDAS DE COMBUSTIÓN MICROBIANA
- ANEXO Q:** SIEMBRA DE LA FIBRA DE CARBONO DE LAS CELDAS
- ANEXO R:** SIEMBRA FINAL DE LAS DILUCIONES

RESUMEN

En la actualidad, la producción de energía y su impacto en el medio ambiente son temas de gran relevancia. Con el propósito de abordar este desafío, la investigación se enfocó en caracterizar morfológicamente y evaluar el potencial bioenergético de bacterias presentes en los sedimentos de las lagunas Quilotoa y Amarilla de origen volcánico. Se recolectaron muestras de sedimentos en ambas lagunas y se realizaron análisis fisicoquímicos tanto en el lugar como en el laboratorio. Posteriormente, se llevaron a cabo pruebas de aislamiento y caracterización fenotípica mediante la inoculación de cepas bacterianas. Se fabricaron celdas de combustión microbiana, se esterilizó el material y se trató la fibra de carbono para evaluar el potencial bioenergético de los microorganismos a través de celdas de combustible microbianas. Los resultados revelaron diferencias significativas en las características físico-químicas de los sedimentos de ambas lagunas. La laguna Quilotoa mostró una mayor diversidad de tonalidades y texturas en los sedimentos en comparación con la laguna Amarilla, que presentó sedimentos oscuros y gruesos. Además, el análisis fenotípico destacó la presencia de microorganismos extremófilos adaptados a distintas temperaturas en ambas lagunas, con una diversidad bacteriana significativa y bacterias únicas identificadas en cada una. En cuanto al potencial bioenergético, las celdas con cultivo mixto de la laguna Quilotoa alcanzaron un mayor valor de voltaje (0,505 V) en comparación con las celdas de la laguna Amarilla (0,295 V). Estas diferencias en los valores de voltaje sugieren un rendimiento bioenergético superior en las bacterias provenientes de la laguna Quilotoa. Los resultados destacan la relevancia del origen del inóculo bacteriano en la generación de energía eléctrica en celdas de combustible microbiana y resaltan el potencial de las bacterias identificadas en los sedimentos de ambas lagunas como agentes productores de energía.

Palabras clave: <QUÍMICA>, <PRODUCCIÓN DE ENERGÍA>, <POTENCIAL BIOENERGÉTICO>, <SEDIMENTOS DE LAGUNAS>, <CELDAS DE COMBUSTIÓN MICROBIANA>, <ANÁLISIS FISCOQUÍMICOS>, <CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA>.



1786-DBRA-UPT-2023

SUMMARY

Currently, energy production and its impact on the environment are really important issues. To face this challenge, the research was focused on the morphological characterization and evaluation of the bioenergetic potential of bacteria found in the sediments of Quilotoa and Amarilla lagoons, which have a volcanic origin. Sediment samples were collected from both lagoons and the physicochemical analyses were performed both, on site and in the laboratory. Then, isolation and phenotypic characterization tests were carried out by inoculating bacterial strains. Microbial combustion cells were created, the material was sterilized and the carbon fiber was treated to evaluate the bioenergetic potential of the microorganisms through microbial fuel cells. The results revealed significant differences in the physicochemical characteristics of the sediments for both lagoons. The Quilotoa lagoon showed a greater diversity of shades and textures in sediments compared to the Amarilla lagoon, which presented dark and coarse sediments. In addition, the phenotypic analysis highlighted the presence of extremophilic microorganisms which are adapted to different temperatures in both lagoons, with significant bacterial diversity and unique bacteria identified in each one. Regarding the bioenergetic potential, the cells with mixed culture from the Quilotoa lagoon reached a higher voltage value (0.505 V), compared to the cells from the Amarilla lagoon (0.295 V). These differences in voltage values suggest a superior bioenergetic performance of the bacteria from the Quilotoa lagoon. The results highlight the relevance of the origin of the bacterial inoculum in the generation of electrical energy in microbial fuel cells and emphasize the potential of the bacteria identified in the sediments of both lagoons as energy producing agents.

Keywords: <CHEMISTRY>, <ENERGY PRODUCTION>, <BIOENERGETIC POTENTIAL>, <LAGOONS SEDIMENTS>, <MICROBIAL COMBUSTION CELLS>, <PHYCHEMICAL ANALYSIS>, <PHENOTYPICAL CHARACTERIZATION>.



Lic. Paul Rolando Armas Pesántes, Mgs.

C.I. 060328987-7

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos de gran relevancia debido a su amplia distribución en diversos ambientes y su capacidad para desempeñar roles fundamentales en los ciclos biogeoquímicos. La caracterización morfológica y la evaluación del potencial bioenergético de bacterias son áreas de estudio clave para comprender su diversidad funcional y su potencial en la generación de energía sostenible. En el contexto de las lagunas de origen volcánico Quilotoa y Amarilla, estas investigaciones cobran especial importancia, ya que estas lagunas albergan ecosistemas únicos y presentan un potencial aún poco explorado como fuentes de recursos bioenergéticos.

Las lagunas de origen volcánico Quilotoa y Amarilla, situadas en la región andina de Ecuador, son reconocidas por su singularidad y belleza natural. Estos cuerpos de agua se formaron en las calderas de antiguos volcanes y albergan una rica biodiversidad que incluye una variada comunidad bacteriana. El estudio de la caracterización morfológica y el potencial bioenergético de estas bacterias en este particular entorno ofrece la oportunidad de adentrarse en un ecosistema poco explorado y valioso, con implicaciones importantes tanto para la investigación científica como para la sostenibilidad energética.

A pesar de la importancia ecológica de las lagunas de origen volcánico y de la relevancia creciente de la bioenergía en el contexto global, la caracterización morfológica y la evaluación del potencial bioenergético de las bacterias presentes en estos ecosistemas han recibido escasa atención en la literatura científica. La investigación en esta área es crucial para ampliar nuestro conocimiento sobre la diversidad microbiana de estas lagunas y para explorar la viabilidad de utilizar las bacterias como fuentes de energía renovable y sostenible.

El objetivo general de este estudio es caracterizar morfológicamente y evaluar el potencial bioenergético de bacterias obtenidas de los sedimentos de las lagunas de origen volcánico Quilotoa y Amarilla. Para llevar a cabo este estudio, se realizará un muestreo cuidadoso de los sedimentos en las lagunas, seguido de análisis físicos y químicos para determinar las características del medio. Luego, se aplicarán técnicas de cultivo y pruebas macroscópicas y bioquímicas para aislar y caracterizar las cepas bacterianas presentes. La configuración de la celda de combustible microbiana se definirá mediante revisión bibliográfica, y finalmente, se evaluará el potencial bioenergético de las bacterias aisladas mediante ensayos en celdas de combustible microbianas.

Este trabajo de titulación se estructura en secciones principales que incluyen: Problemática, Revisión de la literatura, Metodología, Resultados y Discusión, Conclusiones y Referencias bibliográficas. La Revisión de la literatura proporciona el contexto necesario, mientras que la Metodología describe los procedimientos utilizados. Los Resultados y Discusión presentan los hallazgos obtenidos y su análisis. Las Conclusiones resumen los resultados y sus implicaciones, y se incluyen las Referencias bibliográficas utilizadas.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

Hoy en día, la contaminación del agua, el aire y el suelo es un tema importante de investigación debido a que la población ha comenzado a reconocer su verdadera importancia. La generación tradicional de energía, que se basa mayormente en la combustión de recursos fósiles como el carbón, el petróleo y el gas natural, es perjudicial para el medio ambiente, ya que emite cantidades significativas de dióxido de carbono (CO₂) y otros gases de efecto invernadero a la atmósfera. Estos gases actúan como una barrera que atrapa el calor del sol en la Tierra. Estos gases atrapan el calor del sol en la Tierra, lo que provoca el calentamiento global y el cambio climático, con efectos perjudiciales para el medio ambiente y la vida en el planeta (Romero et al., 2012, pp. 118-143).

En Ecuador, la manera en que se utiliza el combustible es perjudicial para el paisaje, contamina los océanos, provoca lluvia ácida y contaminación urbana, además de destruir bosques y ser letal para la vida en la tierra. Actualmente, la extracción y producción de energía se ha convertido en una gran influencia en el medio ambiente. Para solventar este problema, es esencial adquirir nuevas fuentes de energía eléctrica que no sean contaminantes y que no dependan de los hidrocarburos (Romero et al., 2012, pp. 118-143).

En este sentido, en un mundo cada vez más consciente de la necesidad de fuentes de energía sostenibles y amigables con el medio ambiente, la búsqueda de alternativas bioenergéticas se ha convertido en un objetivo primordial para la comunidad científica. En este contexto, los ecosistemas acuáticos, como las lagunas de origen volcánico, emergen como áreas de particular interés debido a su singularidad y potencial biotecnológico.

Las celdas de combustible microbianas (CCM) son una innovadora tecnología con un gran potencial para la generación de energía sostenible, el tratamiento de materia orgánica y la biorremediación. Sin embargo, para aplicaciones prácticas, es necesario mejorar la eficiencia y el rendimiento eléctrico de los procesos bioelectroquímicos, lo que requiere más investigación en términos de diseño, comunidad microbiana, tipo de sustrato y concentración, entre otros (Ramírez, 2023, pp. 26-32).

En este contexto, las lagunas de origen volcánico Quilotoa y Amarilla, ubicadas en una región de gran riqueza geológica y biodiversidad, presentan características únicas que las hacen ecosistemas de estudio privilegiados. Estos cuerpos de agua, formados por procesos volcánicos, albergan una variada microbiota que ha evolucionado en un entorno particularmente exigente, lo que sugiere la existencia de microorganismos adaptados a condiciones extremas.

Por lo tanto, la presente investigación se plantea caracterizar morfológicamente a los microorganismos presentes en los sedimentos de las lagunas Quilotoa y Amarilla, con el fin de evaluar su potencial bioenergético para ser utilizados en celdas de combustible microbianas. Estos sedimentos contienen partículas sueltas del suelo, como arena, arcilla y limo, lo que representa un entorno propicio para explorar la capacidad de los microorganismos en la generación de energía sostenible (López, 2020, pp. 1-78). Además, esta investigación pretende aumentar el conocimiento sobre la diversidad y adaptaciones de la microbiota en ambientes volcánicos de agua dulce, contribuyendo así a la comprensión de los ecosistemas microbianos que pueden tolerar condiciones frías y características volcánicas.

Formulación (Incógnita)

- ¿Cuáles son los resultados de la caracterización morfológica de microbios a partir de ensayos macroscópicos y bioquímicos en sedimentos de las lagunas Quilotoa y Amarilla?
- ¿Las bacterias presentes en los sedimentos de las lagunas presentan potencial energético?

1.2. Justificación

En el contexto actual, donde la preocupación por la sostenibilidad y la conservación del medio ambiente está en constante aumento, resulta crucial abordar el estudio de microorganismos presentes en ecosistemas únicos y poco explorados, como las lagunas de origen volcánico Quilotoa y Amarilla. La escasez de investigaciones específicas que aborden la caracterización de bacterias en estas lagunas resalta la necesidad de identificar posibles microorganismos con potencial bioenergético, los cuales podrían desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de tecnologías limpias y renovables.

El agotamiento acelerado de las fuentes de energía tradicionales, impulsado por la creciente demanda energética mundial, el desarrollo industrial y el aumento de la población, plantea la urgente necesidad de buscar alternativas sostenibles para la generación de energía (Naciones Unidas, 2020, p.1). En este sentido, las celdas de combustible microbianas (CCM) han surgido como una

opción prometedora, ya que permiten la conversión de bioelectricidad a partir de diversos sustratos mediante microorganismos electrogénicos, presentando ventajas sobre las fuentes tradicionales al ser consideradas una fuente de energía renovable y no estar sujetas a cambios de temperatura (Redondo, 2018, pp. 5-29). Además, las CCM tienen la capacidad de eliminar compuestos contaminantes presentes en diversos sustratos, como DBO, metales pesados e hidrógeno (Revelo, 2013, pp. 17-28).

No obstante, en el contexto ecuatoriano, las investigaciones centradas en el microbioma y la recolección de bioenergía son limitadas, lo que realza la importancia de la aplicación de la biotecnología para analizar los microorganismos presentes en ambientes extremos, como las lagunas de origen volcánico. Estos ecosistemas microbianos que toleran ambientes de agua dulce fría y presentan características volcánicas representan un campo de investigación relevante y significativo.

La caracterización morfológica de los microorganismos presentes en los sedimentos de las lagunas Quilotoa y Amarilla desempeña un papel esencial en el avance del conocimiento sobre la diversidad microbiana adaptada a condiciones extremas. Para este propósito, se aplicará el método del Grupo de Energías Alternativas y Ambiente (GEAA), reconocido por su enfoque pionero en la obtención de muestras inoculadas para evaluar el potencial energético de las celdas de combustible microbianas. De lograr alta eficiencia, estas tecnologías de CCM podrían posicionarse como una alternativa viable para la generación de energía sostenible, contribuyendo así a la preservación y conservación del medio ambiente.

El presente estudio reviste gran relevancia en el campo de la biotecnología ambiental, al alinearse con los intereses de investigación en ingeniería de procesos y protección del medio ambiente. Además, el desarrollo de una fuente alternativa de energía limpia basada en procesos biológicos u orgánicos beneficia directamente a la sociedad (Bisang et al., 2009, p. 5-22).

La evaluación energética de los microorganismos permitirá explorar nuevas estrategias y procesos biotecnológicos para maximizar la energía generada por estos organismos, al mismo tiempo que se minimiza su impacto ambiental. Aspectos como la producción de biocombustibles, la eficiencia en la generación de energía a partir de residuos orgánicos y la capacidad de los microorganismos para degradar contaminantes ambientales y producir energía serán objeto de estudio en esta investigación.

1.3. Objetivos de la investigación

Objetivo general

Caracterizar morfológicamente y evaluar el potencial bioenergético de bacterias obtenidas de los sedimentos de las lagunas de origen volcánico Quilotoa y Amarilla.

Objetivos específicos

- Identificar las características fisicoquímicas de los sedimentos en las lagunas Quilotoa y Amarilla
- Aislar cepas bacterianas de los sedimentos en las lagunas Quilotoa y Amarilla, mediante pruebas macroscópicas y bioquímicas para identificar la estructura y diversidad biológica del microbiota.
- Establecer la configuración adecuada de la celda de combustible microbiana basándose en la bibliografía.
- Evaluar el potencial bioenergético de las bacterias caracterizadas morfológicamente realizando un ensayo en celdas de combustible microbianas.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La industrialización y el crecimiento económico mundial han aumentado considerablemente con el uso de combustibles fósiles, sin embargo, este abastecimiento de energía no es sostenible, pues se considera que la demanda de petróleo exceda la capacidad de sus reservas para el año 2025. Esta deficiencia de materia para la producción de energía se debe al crecimiento poblacional desmedido, por lo que la demanda energética global se aproxima a los 13.5 TW, y a raíz del año 1970 su aumento paso del 9% al 17%, se pronostica que este porcentaje alcanzará un 25% para el 2050 (Peralta, 2018, p. 13-41).

A partir de estos estudios de necesidades, el interés por las pilas de combustible microbianas aumentó significativamente, de modo que, en la década de 1970, aparecieron los primeros prototipos con características y configuraciones similares al modelo actual propuesto por S. Suzuki en 1973 (Ezgi, 2017, p.1). A fines de la década de 1980, se generaron los primeros modelos computacionales de celdas de biocombustibles en los que se utilizó la base reguladora de consorcios microbianos, como catalizadores de ánodos, para probar la transferencia de electrones entre cultivos mediadores puros de bacterias y electrodos y fuentes de carbono no complejas (Guerrero, 2018, pp. 1-2).

En esta investigación, el estudio de los microbios psicrófilos es importante porque los ambientes fríos representan alrededor del 85 por ciento del planeta y ya están habitados por una amplia variedad de hongos, bacterias, algas y levaduras. Este grupo de extremófilos ha sido estudiado por varios investigadores que descubrieron nuevas enzimas con termo estabilidad y velocidades de reacción que las enzimas químicas no pueden alcanzar (Moreno, 2017, p.16).

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a través del Centro de Energías Alternativas y Ambiente (GIDAC-CEAA), ha realizado varias investigaciones acerca del potencial de las CCMs.

Por ejemplo, Logroño et al. (2016, p.101) evaluó la capacidad electrogénica de microorganismos presentes en suelos de páramo andino, al igual que en suelos de la Amazonia, el resultado fue que en el suelo de 4000msnm se generaba más voltaje. Además, probó este tipo de celdas como

sensores de bioelectricidad para monitorear ciertos parámetros, como la DBO en aguas residuales sintéticas de arroz, disminuyó el tiempo de respuesta, el estudio generó electricidad junto con el tratamiento del efluente (Logroño et al., 2016, p.101).

Otro estudio que se llevó a cabo en la ESPOCH fue la "Caracterización molecular de cultivos axénicos para una aplicación electrogénica en celdas de combustible microbianas", que fue realizado por Guamán en el 2022, este estudio demostró que las CCMs con AR produjeron el mayor porcentaje de reducción de DBO, DQO y Cr (VI): 75.20%, 74.82% y 50 %, respectivamente, en comparación con el AS, se redujo en un 81.30% en el mismo periodo de tiempo para ambos. Asimismo, las CCMs AR2 y AS2 generaron un voltaje máximo de 395,63 mV y 224,39 mV, respectivamente (Guamán, 2022, pp. 1-87).

Con este proyecto se pretende brindar nuevos conocimientos que sean de utilidad para la reactivación de los microorganismos con el fin de generar energía eléctrica a partir de los sedimentos de las lagunas volcánicas Quilotoa y Amarilla.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Sedimento

Es un material sólido procedente de fragmentos de rocas y minerales que surge como consecuencia de un conjunto de fenómenos y procesos atmosféricos como: erupciones volcánicas, vientos, precipitaciones, variaciones de temperatura y la circulación del agua, donde se lo puede encontrar en suspensión y precipita por gravedad hacia el fondo del líquido. Estos sedimentos son los responsables en la generación de los diferentes tipos de rocas sedimentarias, que surgen con procesos de erosión transporte, diagénesis, deposición y litificación (Román, 2016, p. 7).

2.2.1.1. Tipos de sedimentos

Los sedimentos se clasifican en:

- Detríticos
- Biogénicos
- Químicos
- Volcanogénicos.

- **Sedimentos detríticos**

Estos se originan a partir de la descomposición de cualquier tipo de roca, ya sea ígnea, sedimentaria o metamórfica, y se pueden clasificar por tamaño: grava, arena, limo y arcilla (Maldonado, 2021, p.1).

- **Sedimentos biogénicos**

Los minerales que se originan a partir de la actividad de organismos vivos, utilizando iones disueltos presentes en aguas marinas, lagos, lagunas o ríos para formar sus estructuras protectoras, se acumulan en el lecho del cuerpo de agua donde vivieron. Estos minerales, al solidificarse, dan lugar a rocas sedimentarias como las calizas biogénicas y las diatomitas. Dentro de esta categoría, los formaminíferos y las diatomeas son los grupos más comunes (Maldonado, 2021, p.1).

- **Sedimentos químicos**

Son aquellos que precipitan directamente se caracterizan por formarse en agua salada debido a que es rica en iones, este proceso de evaporación transporta el agua dejando los minerales como el yeso, halita, calcita, etc (Maldonado, 2021, p.1).

- **Sedimentos volcanogénicos**

Son todos aquellos formados por la erosión de rocas sedimentarias y procesos volcánicos seguidas de remoción y retrabajo del material. El material piroclástico es la fuente de origen de los materiales volcanoclásticos (Maldonado, 2021, p.1).

2.2.2. *Ambientes extremos*

Estos son entornos en los que parámetros como la temperatura, la acidez, la salinidad y la presión en valores importantes, pero no afectan el crecimiento y el desarrollo de un cierto conjunto de microorganismos para cumplir con el metabolismo y las funciones de batir al médico. Los ambientes fríos son los más comunes estos se caracterizan porque poseen rangos de temperatura que oscila entre 15°C hasta -20°C (Moreno, 2017, pp. 17-30).

A medida que se asciende a lugares que se caracterizan por tener este tipo de ambientes extremos como lo es la cima de alta montaña, la temperatura no supera los 15°C y con precipitaciones anuales de 1000mm (Moreno, 2017, pp. 17-30).

2.2.3. *Microorganismos extremófilos*

Los microorganismos representan un grupo grande y diverso que lleva a cabo los procesos metabólicos de crecimiento, producción de energía y reproducción independientemente de otras células (Oliart-Ros et al, 2016, 77-90). El término “extremófilo” deriva del latín *extremus* (exterior, extremo) y *philos* (amante) y su significado “amante de lo extremo”, estos microorganismos logran sobrevivir y desarrollarse en condiciones totalmente inhóspitas para otros organismos vivos (Rothschuuh, 2022a: p.1).

En ambientes extremos la microbiota se adapta a las condiciones del entorno dependiendo del nicho, las investigaciones recientes han puesto en evidencia que estas formas de vida que se desarrollan en estos ambientes no son reducidas (Moreno, 2017, pp. 17-30).

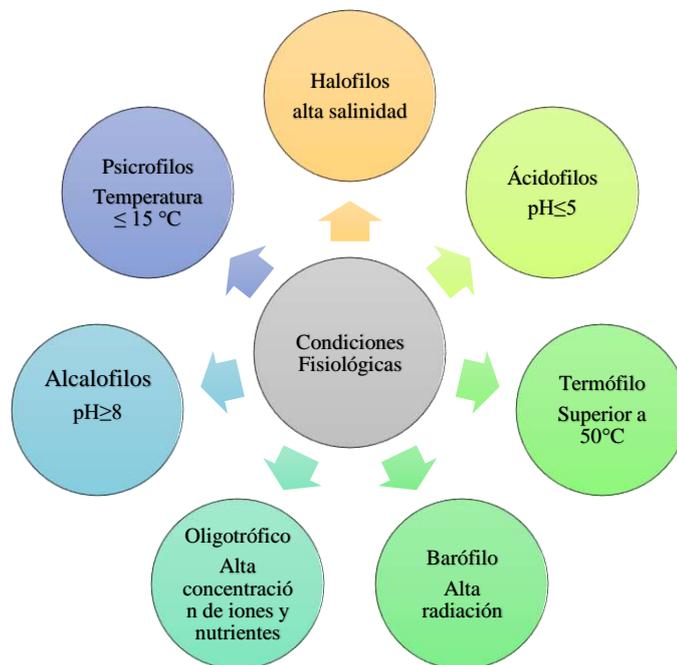


Ilustración 2-1: Clasificación de los microorganismos extremófilos

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

2.2.4. *Microorganismos psicrófilos*

Son aquellos organismos vivos que se desarrollan en temperaturas muy bajas de alrededor 10°C y 20°C donde se registra su desarrollo y crecimiento óptimo, aunque la mayoría puede sobrevivir sin inconvenientes a cero grados centígrados e incluso a temperaturas negativas (Angel y Polo, 2020). Se encuentran en ambientes extremadamente fríos como en zonas polares, el género más representativo corresponde a *Flavobacterium*, *Micrococcus* y *Pseudomonas* (López, 2020, pp. 1-78).

Para que estos organismos psicrófilos se desarrollen normalmente en los entornos antes mencionados, sus mecanismos de supervivencia han evolucionado, tales como: reducción de la actividad enzimática, reducción de la fluidez de la membrana, transporte alterado de nutrientes y desechos, tasas reducidas de transcripción, traducción y división celular, desnaturalización; mal plegamiento de proteínas, congelación intracelular (López, 2020, pp. 1-78).

2.2.5. *Adaptaciones moleculares de los organismos psicrófilos*

Los microorganismos que se coexisten en ambientes extremos se han visto obligados a desarrollar nuevos mecanismos para poder adaptarse (Moreno, 2017, pp. 17-30).

2.2.5.1. *Aumento de la fluidez de la membrana plasmática*

La membrana plasmática es la estructura dinámica primaria que ayuda a determinar y mantener la integridad celular, y sus componentes permiten que la célula participe en procesos como el transporte, la permeabilidad selectiva a sustancias e iones, la excitabilidad, la movilidad, la diferenciación, la secreción celular y la identidad intercelular. La membrana y su composición lipídica mantienen la fluidez de los microorganismos psicrófilos, es decir, transportan grandes cantidades de ácidos grasos insaturados de cadena corta para realizar funciones energéticas vitales (Moreno 2017, pp. 17-30).

2.2.5.2. *Producción de enzimas*

A temperaturas más bajas, la producción de enzimas es eficiente porque tiene un mayor contenido de hélice alfa en la estructura secundaria, menos láminas beta y más aminoácidos polares que las enzimas biológicas (Moreno, 2017, pp. 17-30).

2.2.5.3. *Proteínas anticongelantes*

Estas proteínas, que se encuentran en varios grupos de bacterias, insectos y plantas, se unen a las partículas de hielo y evitan que este estado acuoso se expanda, evitando que el líquido intracelular se congele y evitando el daño a la membrana microscópica (Moreno, 2017, pp. 17-30).

2.2.5.4. *Formación de pigmentos*

En los microorganismos que se desarrollan a bajas temperaturas se encuentran moléculas de la membrana plasmática que incrementan la rigidez de la bicapa lipídica permitiendo que el individuo pueda protegerse de la fotooxidación provocada por la radiación UV evitando la lisis celular, esta protección le otorga a las bacterias colores tomates, rojos y amarillos, estos pigmentos microbianos pueden verse afectados por la cantidad de luz, disponibilidad de carbono, los minerales presentes, la cantidad de oxígeno y el tipo de fermentación que realicen (Moreno, 2017, pp. 17-30).

2.2.5.5. *Procesos de transcripción y traducción*

Los procesos de transcripción y traducción pueden verse alterados por las bajas temperaturas, lo que reduce la actividad enzimática y, por lo tanto, desestabiliza los ácidos nucleicos, ya que la incorporación de bases nitrogenadas contribuye a la formación de estructuras secundarias (Moreno, 2017, pp. 17-30).

2.2.6. *Aislamiento de microorganismos*

El aislamiento de microorganismos siempre debe tener en cuenta las condiciones óptimas requeridas para su incubación. López (2020) señala que el proceso de aislamiento de microorganismos psicrófilos se realiza en un medio solidificado y en una incubadora de baja temperatura simultánea; En cuanto a los criterios de calidad, cantidad de nutrientes, valor de pH, salinidad y otros factores, se modifican en función del hábitat de origen del inóculo. Este proceso respalda la investigación futura sobre la adaptación y supervivencia microbiana en ambientes extremos.

2.2.6.1. Pruebas fenotípicas

Debido a su bajo costo y simplicidad de uso, la caracterización fenotípica de bacterias es el método más utilizado en los laboratorios. Incluye las características observables enumeradas en la Tabla 2-1, así como el crecimiento en el medio de cultivo, la morfología y las propiedades bioquímicas y metabólicas (Mazo, 2020, pp. 6-33).

Tabla 2-1: Técnicas de caracterización fenotípica más usuales

Técnica	Principales ejemplos
Técnicas macroscópicas	Morfología
Cultivo	Requisitos y medios de cultivo
Técnicas bioquímicas	Lectura inmediata (oxidasa y catalasa) Pruebas rápidas (ureasa, indol)
Pruebas lentas	Reducción de nitratos DNasa
Pruebas de resistencia	Antibióticos
Pruebas comerciales automatizadas	API

Fuente: Mazo, 2020.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

2.2.7. Medios de cultivo

Para los microorganismos es necesario condiciones bioquímicas y biofísicas óptimas para su desarrollo. El objetivo principal de preparar un medio de cultivo es proporcionar los nutrientes necesarios en la concentración correcta. Deben estar presentes macroelementos como C, H, O, N, S, P, K, Ca y Mg, junto con microelementos como B, Zn, Cu, Mo, Fe, Cl y fosfato de hierro (Krikorian, 1993, pp. 95-125).

Los medios de cultivo se caracterizan porque crean un ambiente adecuado para el crecimiento de microorganismos simulando lo más cercano posible las condiciones naturales, asegurando el funcionamiento correcto de la maquinaria enzimática de cada individuo, con un balance adecuado de los componentes y requerimientos de cada microorganismo en particular (Pérez, et al., 2015, pp. 111-123).

Se puede diferenciar los diferentes tipos de cultivo entre los que tenemos líquidos y sólidos dependiendo de la disponibilidad de nutrientes que se requiera.

2.2.7.1. Tipos de medios de cultivo

- **Según la proporción de agar**

- **Líquidos:** también llamados caldos, estos no contienen agentes solidificantes por lo mismo se da un crecimiento de microorganismos de manera acelerada debido a la facilidad de movimiento que les ayuda a adquirir todos los nutrientes del medio (Merck, 2020, pp. 1-3).
- **Sólidos:** estos si contienen agentes solidificantes con una proporción de agar de aproximadamente 1,5% en p/v, se caracterizan porque el crecimiento de los microorganismos se da solo en la superficie del medio, y se los almacena comúnmente en cajas Petri o tubos de ensayo (Merck, 2020, pp. 1-3).
- **Semisólidos:** estos medio contienen una cantidad inferior al 0,5% de agar p/v se utilizan para realizar tanto pruebas de movilidad como pruebas bioquímicas (Merck, 2020, pp. 1-3).

- **Según su utilidad**

La Universidad de Granada (2020, p.1) describe los siguientes tipos:

- **Nutritivo:** al tener una gran cantidad de nutrientes en su composición permite el crecimiento de la mayoría de los microorganismos.
- **De enriquecimiento:** poseen también una gran cantidad de nutrientes en su composición, pero se los distingue por ser más específicos.
- **Selectivos:** este medio de cultivo tiene como característica principal el tener componentes que inhiban el crecimiento de cierto grupo de microorganismos, así facilita el desarrollo del que se desea cultivar.
- **Diferenciales:** como su nombre lo indica, su propósito es distinguir las bacterias según el tipo de nutriente en el medio.

2.2.8. Bacterias

Se caracterizan por ser organismos unicelulares que pertenecen al grupo de los procariotas, lo que significa que carecen de núcleo, orgánulos como mitocondrias, cloroplastos y aparato de Golgi, por lo que su ADN se ubica libremente en el citoplasma. A pesar de su simplicidad estructural, albergan una variedad de morfologías diferentes llamadas filamentos, cocos, bacilos, vibrios y espirilla, que tienen una longitud de 0.5-5 μ , esto es demasiado pequeño para observarse a simple vista, excepto cuando se agregan en una colonia (Rothschuuh, 2022b: p.1).

2.2.8.1. Morfología microscópica

Entre los rasgos morfológicos primarios de los microorganismos está la forma y el tamaño.

- **Tamaño:** Fluctúan entre 0,5 μm y 3 μm , aunque en algunas variedades pueden superar los 10 μm (Pérez y Mota, 2010, pp. 1-9).
- **Forma:** Teniendo en cuenta la rigidez de la pared celular, se determina la forma de los diferentes grupos bacterianos, entre los que se distinguen los cocos, que tienen forma esférica o elíptica, los bacilos, que se caracterizan por tener forma cilíndrica o bastoncillo, recto o silueta curva y una espiroqueta helicoidal, su definición depende de sus giros, ya que pocos se llaman Borrelia y muchos son Treponema (Pérez y Mota, 2010, pp. 1-9).



Ilustración 2-2-: Agrupaciones bacterianas

Fuente: Saavedra y Sotelo, 2014.

2.2.8.2. Morfología macroscópica

Esta forma de morfología facilita la observación de ciertos rasgos fenotípicos durante un período de tiempo específico posterior a la finalización del proceso de siembra. Algunas características básicas se pueden reconocer de inmediato, tales como:

- **Forma:** punteada, circular, filamentosa, irregular, rizoide, cónica.

- **Elevación:** plano, elevado, convexo, pulviniforme (en forma de almohada), en forma de botón, umbilicado.
- **Borde:** liso u ondulado, lobulado, corroído, filamentosos o rizado.
- **Color:** blanco, amarillo, negro, beige, naranja.
- **Superficie:** brillante, mate o de otro modo.
- **Densidad:** densa, porosa o transparente.
- **Consistencia:** grasosa o mantecosa, desmenuzable (López 2020).

2.2.9. Identificación microbiana

2.2.9.1. Tinción diferencial de gram

La técnica de tinción de Gram es un procedimiento utilizado para categorizar las bacterias en dos grupos fundamentales: las bacterias Gram-positivas, que mantienen el color azul-violeta de la tinción, y las bacterias Gram-negativas, que pierden el color y luego son teñidas con safranina (Rodríguez y Arenas, 2018, pp. 166- 167).

Este contraste de color es causado por la diferente composición de las paredes celulares bacterianas. Las células grampositivas tienen una pared rígida e impermeable hecha de peptidoglicanos y polímeros que evita que se escape el color. Las células gramnegativas tienen una capa delgada de peptidoglicanos y una bicapa de lipoproteínas que pueden degradar los peptidoglicanos con el blanqueamiento (Rodríguez y Arenas, 2018, pp. 166-167).

2.2.9.2. Pruebas bioquímicas

Este tipo de prueba puede identificar la actividad metabólica de cepas bacterianas puras. Los tipos de pruebas son pruebas rápidas con lectura menor a 6 horas, pruebas con lectura inmediata y pruebas lentas entre 18 y 48 horas, dependiendo de incubaciones previas con los microorganismos (López, 2020, pp. 1-78).

- **Pruebas con lectura inmediata**

Catalasa

Enzima que se encuentra en la mayoría de las bacterias anaerobias y aerobias con citocromos, excepto en *Streptococcus*. Su función es separar el oxígeno de la molécula de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), separando así el hidrógeno del oxígeno (López 2020).

Tabla 2-2: Interpretación de resultados prueba Catalasa

Interpretación de resultados	
Positivo	Desprendimiento de burbujas de gas Micrococos.
Negativo	<i>Streptococcus</i> .

Fuente: López, 2020, pp. 1-78.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

- **Pruebas lentas con lectura de 18 a 48 h**

TSI (Agar triple azúcar hierro)

Esta prueba permite evaluar la capacidad de los microorganismos para generar gas y H₂S, y revela la fermentación de azúcares a través de la producción de ácidos. Es un ensayo característico de la familia de bacterias *Enterobacteriaceae* (López, 2020, pp. 1-78).

Tabla 2-3: Interpretación de resultados prueba TSI

Interpretación de resultados	
Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo)	Los microorganismos fermentan solo glucosa.
Superficie ácida/Profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo)	Los microorganismos fermentan glucosa, lactosa y/o sacarosa.
Superficie alcalina/Profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo)	Microorganismos que no fermentan azúcares.
La presencia de burbujas de aire o ruptura del medio indica producción de gas por parte del microorganismo.	
Un oscurecimiento del medio indica que los microorganismos están produciendo sulfuro de hidrógeno.	

Fuente: López, 2020, pp. 1-78.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

Kligler

Estima cuánta energía puede consumir un microorganismo para atacar un carbohidrato y, a la vez, producir gas o ácido sulfhídrico (López, 2020, pp. 1-78).

Tabla 2-4: Interpretación de resultados prueba Kligler

Interpretación de resultados	
Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo)	Los microorganismos fermentan solo glucosa.
Superficie ácida/Profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo)	Los microorganismos fermentan glucosa, lactosa y/o sacarosa.
Superficie alcalina/Profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo)	Microorganismos que no fermentan azúcares.
La presencia de burbujas de aire o ruptura del medio indica producción de gas por parte del microorganismo.	
Un oscurecimiento del medio indica que los microorganismos están produciendo sulfuro de hidrógeno.	

Fuente: López, 2020, pp. 1-78.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad)

Determina si un organismo es móvil o inmóvil, capaz de liberar ácido sulfhídrico a través de la enzima que contiene azufre en sus aminoácidos: la metionina, la cistina y la cisteína, además de la capacidad de oxidar la molécula de triptófano, que da como resultado el indol (Bailón. et al., 2003, pp. 92-223).

Tabla 2-5: Interpretación de resultados prueba SIM

Interpretación de resultados	
Movilidad	Positivo: la nubosidad o el crecimiento se produce más allá de la línea de plantación. Negativo: crecimiento solamente en la línea de siembra.
Producción de SH₂	Positivo: oscurecimiento medio a lo largo de la línea de plantación o en todo el medio. Negativo: el medio permanece sin cambio de color.

Fuente: López, 2020, pp. 1-78.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

Prueba de indol

En el cultivo, se añaden de 3 a 5 gotas del reactivo de Kovac (López, 2020, pp. 1-78).

Tabla 2-6: Interpretación de resultados prueba indol

Interpretación de resultados	
Positivo	Color rojo
Negativo	El color del reactivo revelador permanece incoloro-amarillento .

Fuente: López, 2020, pp. 1-78.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

Urea de Christensen

La finalidad de esta prueba es verificar si los microorganismos pueden descomponer la urea mediante la acción de la ureasa, una característica distintiva de la familia Enterobacteriaceae, que incluye especies de los géneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Yersinia* (López, 2020, pp. 1-78).

Tabla 2-7: Interpretación de resultados prueba Urea de Christensen

Interpretación de resultados	
Microorganismos que hidrolizan la urea	El medio de cultivo es de color rosado-rojizo.
Microorganismos que no hidrolizan la urea	El medio de cultivo permanece de color amarillo

Fuente: López, 2020, pp. 1-78.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

Citrato

Esta prueba tiene como objetivo determinar si los microbios pueden utilizar el citrato como fuente de carbono para su metabolismo. Algunas bacterias, al emplear el citrato, obtienen energía sin recurrir a la fermentación ni producir ácido láctico (López, 2020, pp. 1-78).

Tabla 2-8: Interpretación de resultados prueba indol

Interpretación de resultados	
Positivo	Crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta.
Negativo	Ausencia de crecimiento y permanencia del color verde del medio de cultivo.

Fuente: López, 2020, pp. 1-78.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

Manitol

Utilizado para diferenciar y asilar a los estafilococos, para la determinación de *Staphylococcus aureus* (López, 2020, pp. 1-78).

Tabla 2-9: Interpretación de resultados prueba manitol

Interpretación de resultados	
Positivo	Microorganismos fermentadores de manitol colonias de color amarillo.
Negativo	Microorganismo no fermentadores colonias rojas rodeadas, o no halo rojizo-purpura.

Fuente: López, 2020, pp. 1-78.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

Coagulasa

Esta prueba busca identificar si un organismo bacteriano tiene la capacidad de coagular el plasma mediante la enzima coagulasa. Se emplea para distinguir a *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva) de otras especies del mismo género (López, 2020, pp. 1-78).

Tabla 2-10: Interpretación de resultados prueba manitol

Interpretación de resultados	
Positivo	Presencia de coagulo en el fondo del tubo, diferencia al <i>Staphylococcus aureus</i> (coagulasa positiva) de otros estafilococos y micrococos.
Negativo	No hay la presencia del coagulo.

Fuente: López, 2020, pp. 1-78.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

2.2.10. Bioenergía

Es la capacidad de generar energía a partir de materia orgánica; este tipo de energía tiene una gran importancia en muchos contextos, por ejemplo, intenta limitar el cambio climático y contribuye significativamente al sistema energético global (Reid et al., 2019, pp. 274-286).

La fabricación de biocombustibles, biogás y gases de relleno sanitario, así como el biohidrógeno y la bioelectrogénesis, que se basan en la generación de energía eléctrica o combustible a través de la interacción de sistemas biológicos o partes de ellos (principalmente enzimas) con sistemas electroquímicos. En estos últimos, los sustratos orgánicos se transforman en electrones exocelulares y protones, los cuales pueden ser devueltos de manera directa a la generación de energía eléctrica, además de agua y dióxido de carbono (Reid et al., 2019, pp. 274-286).

2.2.11. Bioenergética microbiana

Los microorganismos necesitan fuentes nutricionales para poder cumplir con el metabolismo y de esta manera ser una fuente que favorece el desarrollo de reacciones de oxidación-reducción liberando electrones y protones (Rodríguez, 2020).

2.2.12. Microorganismos electrogénicos

Estos microorganismos generan sus propios mediadores redox, los que son liberados en el entorno y tienden a adherirse al electrodo, de esta manera se evitan los problemas asociados con la toxicidad en dispositivos electroquímicos y el medio, la cantidad de sustancias que se pueden utilizar queda limitada al tipo de combustible que se desea utilizar (Lara, 2016).

2.2.13. Bacterias electrogénicas

Los electrótrofos son microorganismos que son capaces de generar electricidad a través del metabolismo, como en la respiración celular, estos microorganismos necesitan un ambiente favorable para oxidar la materia orgánica mientras reducen los iones metálicos; siempre y cuando tenga la posibilidad de eliminar el exceso de electrones generados por la liberación de energía durante catabolismo, estos electrones liberados generan electricidad en el entorno adecuado (Rodríguez, 2020).

2.2.14. Sistemas bioelectroquímicos

Los sistemas bioelectroquímicos son tecnologías avanzadas que aprovechan la capacidad de ciertos microorganismos para catalizar diversas reacciones electroquímicas, especialmente aquellas que involucran transferencia de electrones, como la oxidación-reducción, con el propósito de mejorar y alterar el metabolismo (Guamán, 2022, pp. 2-23)

Se clasifican en cuatro categorías considerables en la Tabla 1-11 según su modo de operación y aplicación.

Tabla 2-11: Clasificación de los sistemas bioelectroquímicos

Tipo	Aplicación
Celdas de electrólisis microbiana (CCM)	Generación de energía eléctrica.
Celdas de electrólisis microbiana (CEM)	Generación de compuestos químicos inorgánicos como el hidrógeno.
Celdas de electrosíntesis microbiana (CESM)	Síntesis de compuestos químicos orgánicos)
Celdas de desalinización microbiana (CDM)	Desalinización del agua en combinación con otras funciones

Fuente: Guamán, E., 2022.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

2.2.15. Celdas de combustible microbianas

Las celdas de combustible microbianas (CCMs) son dispositivos electroquímicos que transforman energía química en eléctrica la energía almacenada en compuestos químicos como los ácidos nucleicos o los ácidos orgánicos solubles o disueltos a través de reacciones catalizadas por microorganismos que generan electricidad (Logroño, 2015, pp. 1-11).

Entre los beneficios de utilizar CCMs a temperatura ambiente está que funcionan de manera eficiente, no generan ruido y liberan menos dióxido de carbono por lo que es más eficiente que cualquier otra tecnología para generar energía (Logroño, 2015, pp. 1-11).

2.2.15.1. Componentes de la celda de combustible microbiana

- **Ánodo**

El ánodo es donde se adhieren los microorganismos para formar la biopelícula, que a su vez hace que el sustrato se oxide. Como resultado, para que el ánodo funcione correctamente, debe tener ciertas cualidades, como:

- Excelente conductividad de transferencia de la carga y alta capacidad de recolección de corriente.
- Fuerte biocompatibilidad con el medio.
- Estabilidad química.
- Propiedades anticorrosivas y una gran área superficial.

La mayoría de los materiales que se emplean son aquellos que contienen carbono, ya que son los más efectivos y baratos (Chacón, 2018. p. 23).

- **Cátodo**

El área en la cual ocurre la reducción del oxígeno, que es el aceptor de electrones más común debido a su alta capacidad de oxidación, disponibilidad y bajo costo, sin embargo, a un pH neutro, se requiere el uso de catalizadores (Chacón, 2018. p. 23).

- **Electrolitos**

La función principal del electrolito es conducir los protones generados en el compartimiento del ánodo al compartimiento del cátodo, separar el contenido del compartimiento del ánodo del compartimiento del cátodo y evitar el flujo de electrones del ánodo al compartimiento del cátodo. Por lo tanto, el electrolito se encuentra entre los compartimientos del ánodo y el cátodo (Basak et al., 2018, p. 17-23).

- **Conductor externo**

El conductor exterior es responsable de cerrar el circuito en el CCM ya que transporta electrones del ánodo al cátodo, generando así electricidad. Estos deben ser metales altamente conductivos, no tóxicos y resistentes a la corrosión como el acero inoxidable (Condori y Torres, 2019, p.53).

- **Sustrato**

Las células de combustible microbianas (CCM) tienen la capacidad de procesar una amplia gama de sustratos, tanto naturales como sintéticos, que incluyen aguas residuales domésticas y municipales, aguas residuales industriales y cualquier otra fuente que contenga materia orgánica (Mazo, 2020, pp. 4-18).

- **Componente microbiano**

Se trata de microorganismos que descomponen la materia orgánica presente en el sustrato para generar protones y electrones, los más comunes son las bacterias, que son originarias del sustrato o que se cultivan, que se agrupan en una película de biopelícula en el ánodo de la célula, posibilitando la transferencia de electrones (Basak et al., 2018, p. 17-23).

- **Sistema de transporte de electrones**

La mayoría de los microorganismos pueden trasladar electrones de forma independiente del organismo hacia el cátodo. Sin embargo, cuando no es posible, se precisa de un sistema de transporte de electrones (Basak et al., 2018, p. 17-23).

2.2.16. Principio básico de las CCMs

El principio básico implica emplear microorganismos con la habilidad de transferir electrones directamente al ánodo, o en algunos casos, pueden necesitar una sustancia química externa para llevar a cabo esta función (Ilustración 2-1). El sistema se compone de dos compartimentos: el ánodo y el cátodo, separados por un electrolito y conectados externamente mediante un cable conductor a través de los electrodos (Basak et al., 2018, p. 17-23).

El sustrato que ingresa al compartimento del ánodo es sometido a oxidación por los microorganismos, lo que resulta en la producción de electrones. Estos electrones son transportados desde el ánodo mediante el sistema de transporte de electrones y, una vez llegan al ánodo, son conducidos a través del cable conductor conectado externamente hasta el cátodo, suministrando así energía eléctrica a la carga conectada en el circuito. Por otro lado, los protones generados durante la descomposición de la materia orgánica son transportados hacia el cátodo, donde se combinan con el oxígeno presente, formando agua (Basak et al., 2018, p. 17-23).

Las reacciones principales que ocurren en el ánodo y cátodo son:

Ánodo: sustrato orgánico \rightarrow H⁺ + e⁻ + sustrato oxidado

Cátodo: 4H⁺ + 4e⁻ + O₂ \rightarrow 2H₂O

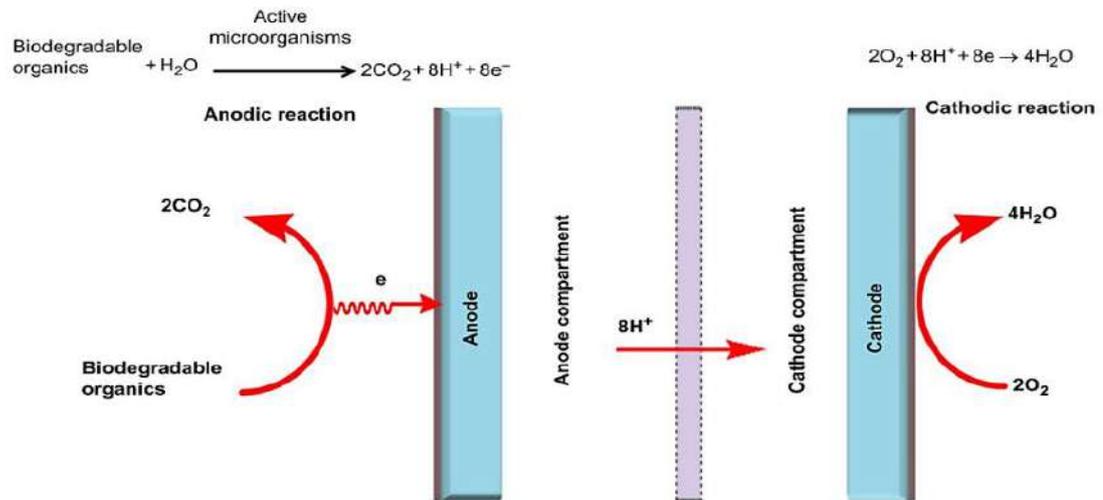


Ilustración 2-3: Principio básico de CCMs

Fuente: Basak et al., 2018, p. 17-23.

2.2.17. Rendimiento de las celdas de combustible microbianas (CCMs)

La capacidad eléctrica de una CCM se calcula a partir de las mediciones de voltaje que se llevan a cabo en la resistencia externa que está conectada entre el polo negativo y el polo positivo y que a su vez se deriva de ellas (Logroño, 2015, pp. 1-11).

Los factores que se miden para evaluar la conducta eléctrica son: la densidad de potencia (DP) y la eficiencia coulombica (EC).

Densidad de potencia: Mide cuánta potencia o cuánta energía se produce por unidad de área de electrodo o volumen de sustrato (Logroño, 2015, pp. 1-11).

$$DP = \frac{V^2}{AR_{ext.}} = \frac{P}{A}$$

Dónde:

DP: densidad de potencia (W/m²)

V: Voltaje (V)

P: Potencia (W)

A: área del electrodo (m²)

R_{ext.}: Resistencia externa (Ω)

Eficiencia coulombica: Permite encontrar el porcentaje de energía eléctrica que se puede producir en el CCM a partir de un sustrato específico. Se determina dividiendo la carga generada por la carga teórica que debería estar presente en el sustrato de la cámara del ánodo (Logroño, 2015, pp. 1-11).

$$EC = \frac{\text{Coulombios recuperados}}{\text{Coulombios totales en el sustrato}}$$

2.2.18. Factores que afectan el rendimiento de las CCMs

Para que las CCM funcionen adecuadamente, es necesario controlar ciertos factores, por ejemplo: el tipo de microorganismo, la concentración y tipo de sustrato, la fuerza iónica, el pH, la temperatura y la resistencia externa (Guamán, 2022, pp. 4-25). En la Tabla 2-1 se explica con mayor detalle los aspectos que se deben considerar:

Tabla 2-12: Factores que inciden en la eficiencia de las CCMs

Factor	Descripción
Potencial de Hidrogeno (pH)	Los gradientes de pH, produce acidificación en la cámara anódica y alcalinidad en la cámara catódica. Esto se debe a que la migración de los protones a través de la membrana es lenta generando un descenso en la actividad bacteriana y en la transferencia de protones hacia la cámara catódica.
Resistencia eléctrica externa	Una resistencia externa muy alta actúa como una barrera que inhibe el flujo de electrones desde el ánodo hacia el cátodo, disminuyendo el potencial eléctrico y la remoción de materia orgánica.
Concentración de la materia orgánica.	La alta concentración de materia orgánica estimula una alta generación de electricidad y densidad de potencia.
Temperatura	La variación de temperatura genera efectos negativos en el funcionamiento del sistema, debido a su influencia en la cinética y termodinámica de las reacciones bioquímicas,

	por ende, afectando la potencia de salida de las CCMs.
--	--

Fuente: Condori y Torres, 2019.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

2.3. Base Legal

2.3.1. Constitución de la República del Ecuador

El Estado fomentará el empleo de tecnologías ambientalmente limpias y energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto tanto en el sector público como en el privado. La soberanía energética se buscará sin perjudicar la soberanía alimentaria ni afectar el derecho al agua (**Art. 15**).

El Estado tendrá la obligación de garantizar la difusión y el acceso a los conocimientos científicos y tecnológicos, así como el aprovechamiento de sus descubrimientos y hallazgos, en consonancia con lo establecido en la Constitución y la Ley (**Art. 387**).

La administración y gestión de la biodiversidad serán ejercidas por el Estado, el cual ejercerá soberanía sobre ella con una visión responsable y de largo plazo, teniendo en cuenta las generaciones futuras. Se establece que la conservación de la biodiversidad y todos sus elementos, incluyendo la biodiversidad agrícola y silvestre, así como el patrimonio genético del país, son de interés público (**Art. 400**).

El Estado se abstendrá de establecer convenios o acuerdos de cooperación que contengan cláusulas que pongan en peligro la conservación y el manejo sostenible de la biodiversidad, la salud humana, así como los derechos colectivos y los derechos de la naturaleza (**Art. 403**).

Art. 313.-El Estado retiene el derecho exclusivo de administrar, regular, controlar y gestionar los sectores estratégicos, en línea con los principios de sostenibilidad ambiental, precaución, prevención y eficiencia. Los sectores estratégicos son aquellos que poseen una importancia significativa y de gran magnitud, ejerciendo una influencia decisiva en aspectos económicos, sociales, políticos y ambientales, y deben enfocarse en el pleno desarrollo de los derechos y el interés social. Los sectores considerados estratégicos abarcan la energía en todas sus formas, las telecomunicaciones, los recursos naturales no renovables, el transporte y la refinación de hidrocarburos, la biodiversidad y el patrimonio genético, el espectro radioeléctrico, el agua, así como otros que sean designados por la legislación correspondiente.

Art. 408.- Los recursos naturales no renovables y en general, los productos del subsuelo, como yacimientos minerales y de hidrocarburos, junto con otras sustancias distintas de las del suelo, incluyendo aquellas presentes en áreas cubiertas por las aguas del mar territorial y zonas marítimas, la biodiversidad y su patrimonio genético, y el espectro radioeléctrico, son propiedad exclusiva e inalienable del Estado. Estos bienes solo pueden ser explotados cumpliendo estrictamente con los principios ambientales establecidos en la Constitución, siendo también imprescriptibles e inembargables.

Art. 413.- El Estado fomentará la utilización eficiente de la energía, la adopción y avance de prácticas y tecnologías amigables con el medio ambiente y la salud, así como el desarrollo de energías renovables, diversificadas y de bajo impacto, que no comprometan la soberanía alimentaria, el equilibrio ecológico de los ecosistemas y el derecho al agua.

2.3.2. Reglamento Al Código Orgánico Del Ambiente

CAPÍTULO II

Áreas especiales para la conservación de la biodiversidad

Art. 162.- Objetivos. - Las áreas designadas para la conservación de la biodiversidad tendrán como finalidad alcanzar los siguientes objetivos: a) Complementar los propósitos de conservación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas para garantizar la integridad de los ecosistemas, la funcionalidad de los paisajes y el suministro de servicios ambientales.

Art. 164.- Registro Nacional de Áreas Especiales para la Conservación de la Biodiversidad.
- La información relativa a las áreas especiales destinadas a la conservación de la biodiversidad será registrada por la Autoridad Ambiental Nacional en el Registro Nacional de Áreas Especiales para la Conservación de la Biodiversidad, el cual formará parte del Sistema Único de Información Ambiental.

CAPÍTULO I

Especies invasoras

Art. 196.- Especies invasoras. - Para efectos de cumplimiento del Código Orgánico del Ambiente y este Reglamento, se considerará como especie invasora a cualquier planta, animal o

microorganismo que se establezca y se propague, ocasionando alteraciones o daños en la biodiversidad, la economía o la salud humana.

2.3.3. TULSMA

Art. 49.- Políticas generales de la gestión integral de los residuos sólidos no peligrosos, desechos peligrosos y/o especiales. - Se establecen políticas generales para la gestión integral de estos residuos y/o desechos, las cuales son de carácter obligatorio para todas las instituciones estatales en sus diferentes niveles de gobierno, así como para personas naturales o jurídicas, tanto públicas como privadas, comunitarias o mixtas, de origen nacional o extranjero.

2.3.4. Ley Orgánica Del Servicio Público De Energía Eléctrica

Art. 12.-Atribuciones y deberes. - Dentro de las atribuciones y deberes del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable en materia eléctrica, energía renovable y eficiencia energética, se encuentra la responsabilidad de impulsar la investigación científica y tecnológica en dichos campos.

Art. 26.-Energías renovables no convencionales. - El Ministerio de Electricidad y Energía Renovable se encargará de promover el empleo de tecnologías limpias y energías alternativas, siguiendo las directrices establecidas en la Constitución que busca desarrollar un sistema eléctrico sostenible basado en la utilización de recursos renovables de energía. La electricidad generada mediante estas fuentes de energía contará con condiciones preferentes que serán establecidas mediante regulaciones emitidas por ARCONEL.

2.3.5. Norma Técnica Ecuatoriana INEN

2.3.5.1. NTE INEN 2169: 2013

Manejo y conservación de muestras

Esta regla se aplica específicamente cuando una muestra, ya sea simple o compuesta, no puede ser analizada en el lugar de muestreo y, en consecuencia, debe ser transportada al laboratorio para su posterior análisis.

2.3.6. Reglamento Código Orgánico del Ambiente

Art. 5.- Derecho de la población a vivir en un ambiente sano. El derecho a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado comprende:

8. El desarrollo y uso de prácticas y tecnologías ambientalmente limpias y sanas, así como de energías alternativas no contaminantes, renovables, diversificadas y de bajo impacto ambiental;

Art. 9.- Principios ambientales. De acuerdo con lo dispuesto en la Constitución y los tratados internacionales ratificados por el Estado, los principios ambientales contemplados en este código constituyen los cimientos conceptuales para todas las decisiones y acciones, tanto públicas como privadas, de las personas, comunas, comunidades, pueblos, nacionalidades y colectivos en relación con la conservación, uso y manejo sostenible del medio ambiente.

Los principios ambientales deben ser reconocidos e integrados en todas las manifestaciones de la administración pública, así como en las decisiones judiciales dentro del ámbito jurisdiccional. Los principios ambientales son los siguientes:

El principio de "Mejor tecnología disponible y mejores prácticas ambientales" establece que el Estado debe fomentar el desarrollo y uso de tecnologías ambientalmente limpias y energías renovables, tanto en el sector público como privado. Estas tecnologías deben ser no contaminantes y de bajo impacto, buscando minimizar los riesgos de daño al medio ambiente en todas las etapas de una actividad productiva, así como reducir los costos asociados al tratamiento y disposición de residuos.

Además, el Estado debe promover la implementación de mejores prácticas en el diseño, producción, intercambio y consumo sostenible de bienes y servicios. Esto implica evitar o reducir la contaminación y optimizar el uso de los recursos naturales en busca de una gestión más responsable y sostenible del ambiente.

Art. 245.- Obligaciones generales para la producción más limpia y el consumo sustentable. Todas las instituciones del Estado y las personas naturales o jurídicas, están obligadas según corresponda, a:

3. Fomentar y propender la optimización y eficiencia energética, así como el aprovechamiento de energías renovables;

Art. 248.- Fines. Los fines del Estado en materia de cambio climático serán:

9. Fomentar el uso y garantizar el acceso de energías renovables;

Art. 261.- De las medidas mínimas. La Autoridad Ambiental Nacional, como ente rector, coordinará con las entidades intersectoriales priorizadas para el efecto y en base a las capacidades locales, los siguiente:

9. La promoción y el fomento de programas de eficiencia energética, dentro de toda la cadena, así como el establecimiento de incentivos económicos y no económicos de energías renovables convencionales y no convencionales;

Art. 768.- Alcance de la normativa ambiental. Las disposiciones de este Reglamento se aplican al componente ambiental en aguas suprayacentes al lecho marino, al lecho y al subsuelo, tanto para recursos vivos como no vivos. También abarca la exploración y explotación económica, así como la generación de energía proveniente del océano a través del agua, corrientes, vientos u otras fuentes. Este Reglamento incluye las actividades que se llevan a cabo en el medio marino o con infraestructura operativa instalada en tierra que pueda afectar a los recursos marinos y costeros.

Art. 804.- Incentivos para el desarrollo de bioindustrias. - Se consideran como bioindustrias a aquellos centros transformadores de residuos en productos terminados que no generan residuos ni impacto negativo al ambiente, ni consumen energía de origen fósil, al producir la energía que requieren para su funcionamiento.

La Autoridad Ambiental Nacional, en coordinación con la Autoridad Única del Agua y los Gobiernos Autónomos Descentralizados, diseñará incentivos que contribuyan a que las plantas de tratamiento de aguas servidas o rellenos sanitarios se conviertan o se construyan bajo el concepto contenido en el presente artículo, en bifactorial.

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Lugar de investigación

Para llevar a cabo este estudio, se recolectaron los sedimentos de dos áreas:

3.1.1. *Laguna Amarilla*

Se encuentra en Ecuador, provincia de Chimborazo en la Cordillera Oriental de los Andes, a unos 20 km al este de Riobamba dentro de los límites del parque nacional Sangay (Ilustración 3-1).

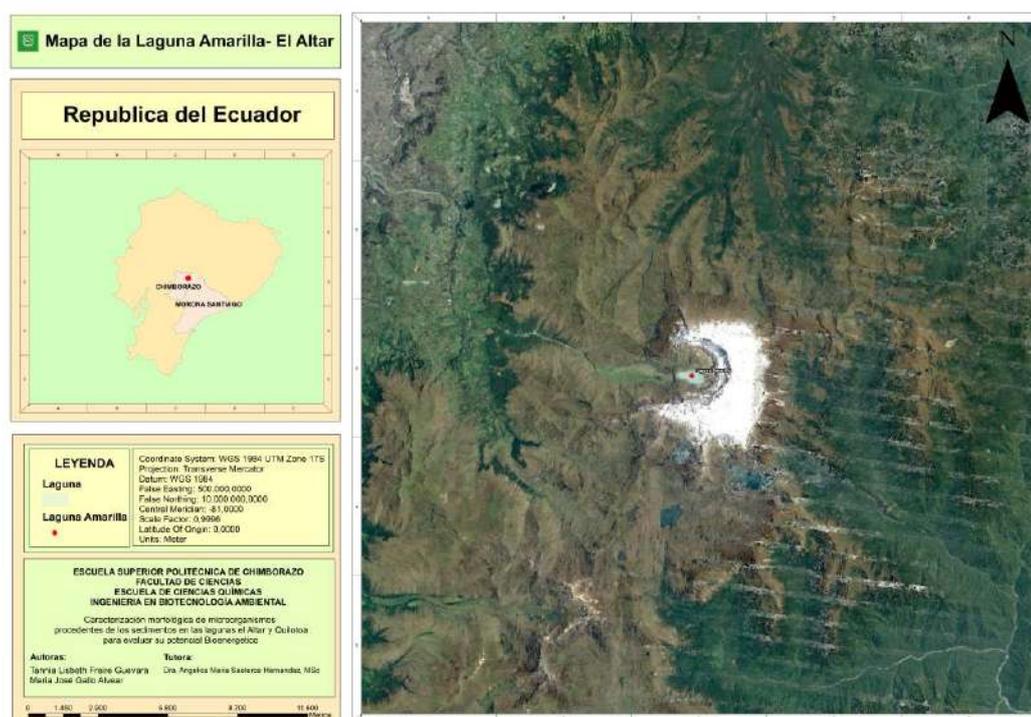


Ilustración 3-1: Mapa de la laguna Amarilla – El Altar

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

3.1.2. *Laguna Quilotoa*

La laguna Quilotoa, que se encuentra ubicada a 66 km. al sur de Latacunga, en la parroquia de Zumbahua del cantón Pujilí, la misma que forma parte de la Reserva Ecológica Los Ilinizas (Ilustración 3-2).

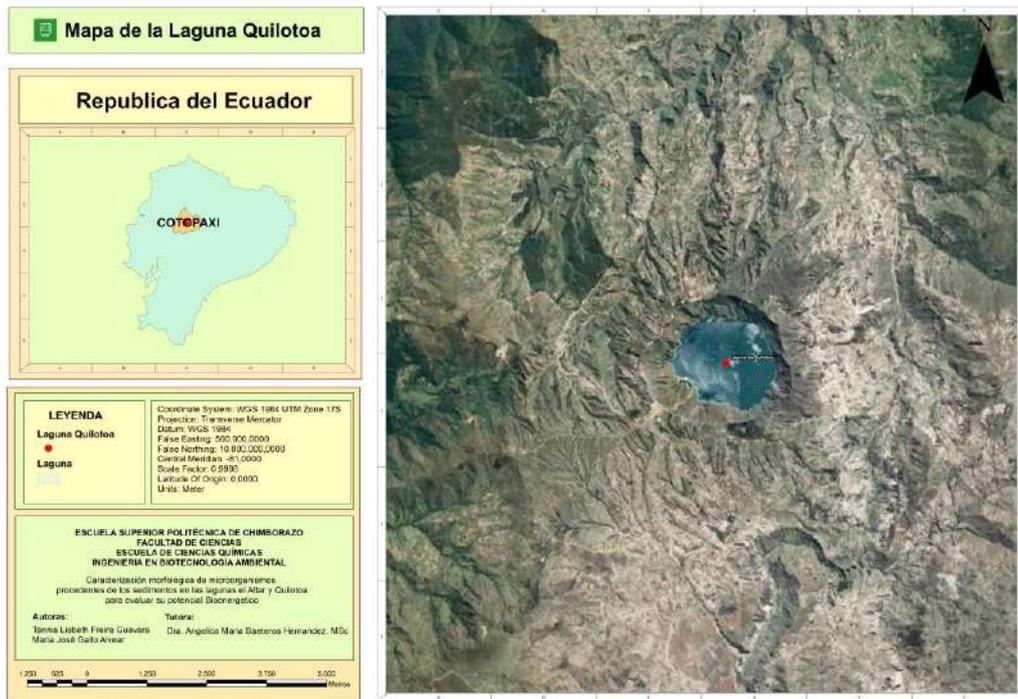


Ilustración 3-2: Mapa de la laguna Quilotoa

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

3.2. Tipo de Investigación

3.2.1. Por el nivel de investigación

Investigación aplicada ya que el objetivo fue evaluar el potencial bioenergético de los microorganismos a través de la implementación de celdas de combustible microbianas. Además, fue de tipo descriptivo debido a que, además de describir los métodos y técnicas empleadas en el estudio, también se describió el objeto de estudio (Bioenergía), es decir, se explicó por qué se dio y en qué condiciones se manifestó.

3.2.2. Por el enfoque

Se empleó un enfoque de investigación mixta que combina métodos cuantitativos y cualitativos. En cuanto al enfoque cuantitativo, se recopilaron datos numéricos sobre las propiedades físico-químicas de los sedimentos de las lagunas, así como datos relacionados con el potencial bioenergético. Por otro lado, en el enfoque cualitativo, se llevó a cabo la caracterización morfológica de las colonias, identificando los microorganismos en base a características descritas en la literatura científica.

3.2.3. *Por la temporalidad*

Debido a que los datos se recopilaron durante un período de tiempo específico, es transversal.

3.3. **Diseño de la investigación**

La investigación se llevó a cabo utilizando un diseño experimental, en el cual se realizaron alteraciones en las variables independientes, que incluyeron la manipulación de parámetros fisicoquímicos y la selección de microorganismos con propiedades electrogénicas. El objetivo principal fue evaluar el efecto de estas variables en la variable dependiente, que en este caso fue la producción de bioelectricidad.

3.4. **Identificación de variables**

Tabla 3-1: Variables de la investigación

Independiente	Dependiente	Intervinientes
<ul style="list-style-type: none">• Microorganismos presentes en los sedimentos• Parámetros fisicoquímicos	<ul style="list-style-type: none">• Bioenergía	<ul style="list-style-type: none">• Análisis de laboratorio• Contaminación cruzada• Condiciones climáticas

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

3.5. **Hipótesis**

Los sedimentos procedentes de la laguna Quilotoa y Amarilla contienen consorcios bacterianos con la capacidad de producir bioenergía y ser evaluadas a través de celdas de combustible microbiano (CCMs).

3.6. **Población de estudio**

En este estudio, la muestra consistió en microorganismos obtenidos de los sedimentos de las lagunas volcánicas Quilotoa y Amarilla.

3.7. **Tamaño de la muestra**

Se eligieron deliberadamente ocho puntos de muestreo considerando varios factores, tales como la accesibilidad, las condiciones climáticas y las zonas parcialmente inundadas o completamente

inundadas. La muestra de sedimento recolectada en la laguna Quilotoa fue de 2 kg, mientras que en la laguna Amarilla se recolectó una muestra de 1 kg.

3.8. Etapas de la investigación

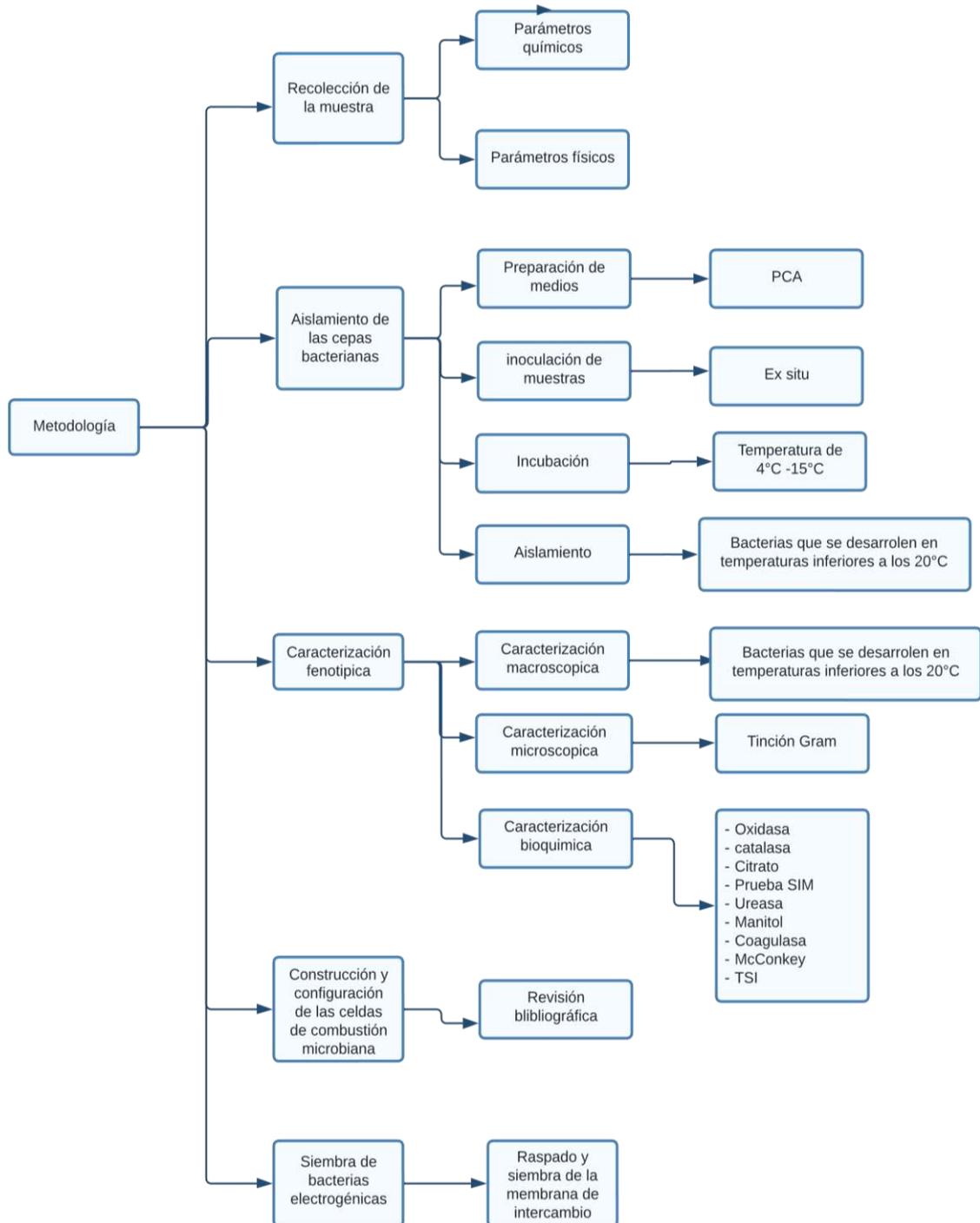


Ilustración 3-3: Metodología de recolección de datos

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

3.8.1. Materiales y equipos

Los materiales, equipos y reactivos utilizados en cada etapa de la investigación se muestran en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2: Materiales y equipo de cada etapa de la investigación

Etapas de la investigación	Materiales y equipos
Recolección de muestras	<ul style="list-style-type: none"> - Balanza - Cooler - Funda Ziploc - GPS - Guantes - Guantes - Hielo seco - Libreta - Marcador - Pala - Sensor de temperatura - Soga con medidas - Talla - Tiras de pH - Vasos
Caracterización físicoquímica de los sedimentos	<ul style="list-style-type: none"> - Agitadores - Balón de aforo - Bandejas de aluminio - Estufa - Fotómetro - Gotero - Mortero - Multiparámetros - Piceta - Tubos de ensayo - Varilla de agitación - Vasos de precipitación
Aislamiento de las cepas bacterianas	<ul style="list-style-type: none"> - Asa de Digralsky - Asa de siembra

	<ul style="list-style-type: none"> - Autoclave - Cajas Petri - Cámara de flujo laminar - Cinta masking - Equipo de protección personal - Etiquetas - Mechero de alcohol - Refrigerador - Rotuladores.
Caracterización fenotípica	<ul style="list-style-type: none"> - Asa de siembra - Autoclave - Cajas Petri - Cámara de flujo laminar - Cinta masking - Equipo de protección personal - Etiquetas - Mechero de alcohol - Microscopio - Portaobjetos - Refrigerador - Rotuladores
Caracterización bioquímica	<ul style="list-style-type: none"> - Asa de siembra - Autoclave - Cajas Petri - Cámara de flujo laminar - Cinta masking - Equipo de protección personal - Etiquetas - Gradillas - Mechero de alcohol - Refrigerador - Rotuladores - Tubos de ensayo
Construcción de las celdas de combustión microbianas	<ul style="list-style-type: none"> - Frascos de vidrio - Corchos de caucho - Agujas de uso veterinario

	<ul style="list-style-type: none"> - Alambre inoxidable moldeable de uso dental - Cinta Parafilm, - Fibra de carbono - Papel celofán - Tapas de material autoclavable - Envases de plástico autoclavable - Difusores - Módulo ADS1115, LM35 - Cables de conexión - Lagartos - Potenciómetro - Computadora - Sistemas de aireación
--	--

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2022.

3.8.2. *Etapas de recolección de las muestras*

3.8.2.1. *Muestreo de sedimentos*

La recolección de muestras en la laguna Quilotoa se llevó a cabo utilizando una draga en las partes profundas y una pala en las orillas. Se recolectaron 2 kg de muestra en cada uno de los 8 puntos de muestreo, seleccionados al azar y considerando el tiempo y/o volumen de agua en cada ubicación. En cuanto a la laguna Amarilla, también se tomaron muestras al azar en 8 puntos diferentes. En este caso, se recolectaron 1 kg de muestra en cada punto utilizando exclusivamente una pala debido a las dificultades de acceso que presenta esta laguna (Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2176, 2013).

Tabla 3-3: Geolocalización de los puntos de muestro en la laguna de Quilotoa

Nombre	Coordenadas	
QN1 -SH1	732557 mE	9904643 mS
QN2 – SH2	732332 mE	9904670 mS
QN3 – H1	732344 mE	9904675 mS
QN4 - H2	732351 mE	9904674 mS
QN5 – H3	732279 mE	9904759 mS
QN6 – H4	732297 mE	9904722 mS
QN7- SH3	732622 mE	9904611 mS

QN8 –SH4	732639 mE	9904599 mS
----------	-----------	------------

QN= Quilotoa Numero, SH=Semi Hundido, H= Hundido.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 3-4: Geolocalización de los puntos de muestro en la laguna Amarilla

Nombre del punto de muestreo	Coordenadas	
AN1	167265 mS	78428730 mO
AN2	1672535 mS	7842862 mO
AN3	1672715 mS	7842876 mO
AN4	167272 mS	7842877 mO
AN5	167273 mS	7842878 mO
AN6	1672715 mS	7842876 mO
AN7	1672259 mS	7842865 mO
AN8	1672535 mS	78428620 mO

AN= Amarilla Numero

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

3.8.2.2. Ficha de muestreo

A continuación, se presenta el formato de la ficha de muestreo que se aplicó en cada punto de muestreo para ambas lagunas de estudio. Este formato fue diseñado con el objetivo de recopilar información relevante.

Tabla 3-5: Formato de ficha de muestreo

Nombre del punto de muestreo	
Coordenadas	
Fecha	
Hora	
Condiciones climáticas	
Descripción de la superficie	
Componentes antropogénicos	
Técnica de muestreo	
Instrumentos usados	
Profundidad	

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

3.8.3. *Etapa dos: Caracterización físicoquímica de los sedimentos*

3.8.3.1. *In situ*

Utilizando un multiparámetro como herramienta de apoyo, se realizaron mediciones in situ en las lagunas para obtener datos precisos sobre la temperatura, pH, conductividad y presión. Asimismo, se procedió a una detallada caracterización de los parámetros organolépticos, tales como el color, olor, textura y consistencia. Esta metodología permitió recopilar información exhaustiva y coherente acerca de las características físicas y químicas de las muestras de sedimento obtenidas de las lagunas.

3.8.3.2. *Ex situ*

Primero, las muestras recolectadas en ambas lagunas fueron colocadas en bolsas Ziploc y luego transferidas a un cooler con hielo seco. Este procedimiento se llevó a cabo para prevenir cualquier posible contaminación y garantizar la preservación de las muestras durante el transporte al laboratorio de biotecnología y tratamiento de agua, ubicado en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Una vez en el laboratorio, se realizaron los análisis correspondientes a las muestras recolectadas.

Conductividad, pH, salinidad, temperatura y sólidos totales disueltos

Se generó una muestra compuesta con el propósito de determinar los parámetros de los sedimentos. A continuación, se tomaron 10 gramos de esta muestra y se diluyeron en 100 ml de agua destilada, logrando así una concentración óptima para llevar a cabo los análisis necesarios.

Una vez que la muestra diluida estuvo lista, se empleó el multiparámetro para realizar las mediciones y obtener los resultados de los distintos parámetros deseados. Este dispositivo permitió obtener información precisa y detallada de manera simultánea, facilitando la evaluación de los sedimentos en estudio.

Dureza

- Se diluyó 1 gramo de sedimentos en 25 ml de muestra en un matraz Erlenmeyer.
- Posteriormente, se añadió 1 ml de cianuro de potasio (KCN), seguido de 2 ml de Buffer con un pH de 10, junto con una pequeña cantidad del indicador Eriocromo T.
- Luego, se llevó a cabo la titulación utilizando EDTA (0.02 M).

- La determinación del resultado se realizó midiendo los mililitros utilizados hasta que se produjo el cambio de color, que se observó de rojo a azul.

$$\text{CaCO}_3 = \frac{\text{VM} \cdot \text{VEDTA} \cdot 40 \cdot 1000}{\text{Alicuota}}$$

Donde:

CaCO₃: concentración de carbonato de calcio en ppm (mg/L)

VM: volumen consumido de EDTA (mL)

VEDTA: molaridad exacta del EDTA

Alícuota: volumen de la muestra (mL)

Calcio

- Se llevó a cabo la dilución de 1 gramo de sedimentos en 25 ml de muestra en un matraz Erlenmeyer.
- Después, se agregaron 1 ml de cianuro de potasio (KCN) y 1 ml de hidróxido de sodio 1 N (NaOH).
- Luego, se incorporó una pequeña cantidad del indicador Murexida.
- Posteriormente, se realizó la titulación utilizando EDTA (0,02 M).
- La determinación del resultado se efectuó midiendo los mililitros utilizados hasta que se produjo el cambio de color, el cual fue observado desde una tonalidad rosada hasta lila.

$$\text{Calcio} = \frac{\text{VM} \cdot \text{VEDTA} \cdot 40 \cdot 1000}{\text{Alicuota}}$$

Donde:

Ca: concentración de calcio (mg/L)

VM: volumen consumido de EDTA (mL)

VEDTA: molaridad exacta del EDTA

Alícuota: volumen de la muestra (mL)

Magnesio

Se utilizó un enfoque rápido y económico que se fundamentó en la diferencia entre los volúmenes gastados para la medición de la dureza total y el calcio.

$$[\text{Mg}^{2+}] = \frac{(V_2 - V_1) * \text{VEDTA} * 24,3 * 1000}{\text{Alicuota}}$$

Donde:

Mg²⁺: concentración de magnesio (mg/L)

V1: volumen consumido Dureza total (mL)

V1: volumen consumido Calcio (mL)

VEDTA: molaridad exacta del EDTA

Alícuota: volumen de la muestra (mL)

Cloruros

- Se procedió a realizar la determinación de cloruros mediante la dilución de 1 gramo de sedimento en 25 mL de agua destilada.
- En esta muestra, se añadieron 4 gotas de cromato de potasio (K₂CrO₄), seguido de la titulación utilizando nitrato de plata (AgNO₃) con una concentración de 0.01N.
- Los resultados fueron obtenidos al observar el cambio de color de amarillo a color ladrillo.

Amonios

- Se procedió a diluir 1 gramo de sedimentos en 25 mL de agua destilada en un balón de 50 mL.
- Posteriormente, se añadió 1 mL de NaK tartrato y 2 mL de solución de Nessler, que tenía un color amarillo característico.
- Luego, se completó el volumen del balón con la muestra hasta el aforo.
- Por último, se midió la concentración de amonios utilizando un fotómetro a una longitud de onda de 425 nm.

Fosfatos

- Se diluyeron los sedimentos en agua destilada y se transfirieron a tubos de ensayo de 10 ml.
- Se añadió un sobre de reactivo de fosfato a los tubos con la muestra, se agitó y se esperó durante 2 minutos para permitir que ocurriera la reacción del reactivo.
- Además, se colocaron 10 ml de muestra de agua destilada en tubos de ensayo para utilizarlos como blancos.
- Se calibró el espectrofotómetro utilizando el blanco.
- A continuación, se introdujo la muestra con el reactivo de fosfato en el espectrofotómetro.

- Finalmente, se midió la concentración de fosfatos en las lagunas del Quilotoa y la laguna Amarilla.

DBO5

- Se optó por el método gasométrico para determinar el DBO5.
- Se llevó a cabo la dilución de 1 gramo de sedimento en 100 ml de agua destilada.
- Posteriormente, se transfirió la muestra diluida a una botella ámbar.
- En la botella ámbar, se añadieron los nutrientes necesarios, como magnesio, hierro y calcio, junto con un agitador magnético.
- Se procedió al sellado hermético de la botella ámbar con un tapón y se añadió hidróxido de sodio (NaOH) para evitar la pérdida de gases.
- Por último, se observaron y registraron los cambios en la botella ámbar luego de 5 días.

DQO

- Se diluyó 1 gramo de sedimento en 100 ml de agua destilada.
- A partir de esta muestra, se tomó una alícuota de 25 ml y se transfirió a un matraz de 100 ml.
- Se completó el volumen del matraz con agua destilada hasta el aforo.
- Posteriormente, se tomó una muestra de 2 ml del matraz aforado y se introdujo en el vial HACH (CAT 2125925).
- El vial se sometió a una temperatura de 180 °C durante 5 horas en el equipo Thermoreactor.
- Por último, se midió el resultado utilizando el equipo HACH DR2800.

3.8.4. Etapa tres: Inoculación de cepas bacterianas

3.8.4.1. Dilución

Se prepararon ocho matraces Erlenmeyer con una solución madre, utilizando una relación de 10 gramos de sedimentos provenientes de las lagunas y 90 ml de agua destilada previamente autoclavada a 121 °C durante 15 minutos a una presión de 1 atm mediante calor húmedo. Posteriormente, se procedió a diluir la muestra en tubos de ensayo utilizando la misma relación de 1 parte de muestra por 9 partes de diluyente, hasta alcanzar una dilución de 10^{-5} .

3.8.4.2. Preparación de medio de cultivo PCA

Se procedió a preparar el medio de cultivo PCA mediante el uso de agua destilada, el cual posteriormente fue sometido a esterilización. Para ello, se colocó en una autoclave junto con las cajas Petri, manteniéndolos a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos, aplicando calor húmedo a una presión de 1 atmósfera.

Una vez obtenido el medio de cultivo esterilizado, se llevó a cabo el proceso de plaqueo de las cajas Petri de vidrio en una cámara de flujo laminar. A continuación, se sembraron las disoluciones, utilizando una cantidad de 0.1 ml de cada una. Empleando un asa de Digralsky, se distribuyó de manera uniforme la muestra sobre toda la superficie de la base de la caja Petri. Luego, se sellaron las cajas con cinta y se dejaron incubar durante un período de 7 días a temperatura ambiente, seguidos de otros 7 días en refrigeración. De esta forma, se buscó observar y analizar las bacterias sobrevivientes y extremófilas presentes en las muestras.

3.8.4.3. Aislamiento de cepas bacterianas

Con el objetivo de aislar las cepas bacterianas, se llevó a cabo una selección basada en características como la forma, color, tamaño, bordes, textura, elevación y transparencia de las colonias. En la cámara de flujo laminar, se utilizó un asa bacteriológica para tomar una colonia bacteriana previamente seleccionada. Esta colonia se resembró en un medio agarizado con PCA utilizando la técnica de estría, lo cual permitió obtener cultivos puros al aislar bacterias y generar colonias separadas. Después de sellar las cajas Petri, se dejaron incubar a temperatura ambiente durante siete días, seguidos de otros siete días en refrigeración.

Se realizó una revisión minuciosa de las cajas Petri para verificar si los aislamientos obtenidos eran puros. En caso de que no lo fueran, se llevaron a cabo Re-aislamientos tantas veces como fuera necesario para alcanzar el objetivo de obtener cultivos puros.

3.8.5. Etapa cuatro: Caracterización fenotípica

3.8.5.1. Caracterización macroscópica

Estas características de las bacterias fueron detectadas visualmente, ya que la forma, el color, el borde y la elevación de las colonias son fáciles de identificar.

3.8.5.2. *Caracterización microscópica*

Tinción Gram

Se procedió a realizar la tinción Gram de las colonias puras cultivadas en Agar PCA siguiendo las normas y técnicas estandarizadas.

- Se utilizó un asa previamente esterilizada y un mechero de Bunsen para tomar una muestra de la colonia y realizar un frotis en un portaobjetos.
- El frotis se fijó aplicando calor con la llama del mechero de Bunsen, cuidando de no calentar en exceso la muestra.
- Se agregaron unas gotas de cristal violeta, se esperó un minuto y se enjuagó con abundante agua destilada.
- Luego, se cubrió el frotis con Lugol y se dejó actuar durante un minuto antes de enjuagar nuevamente con agua destilada.
- Continuando con la tinción de Gram, se aplicó alcohol cetona durante 15 segundos y se enjuagó con abundante agua destilada.
- Posteriormente, se cubrió el frotis con safranina, se dejó actuar durante un minuto y se realizó otro enjuague con agua destilada.
- Por último, se esperó a que los portaobjetos se secaran para poder observar las características microscópicas utilizando un microscopio, lo que permitió identificar y analizar las características de las bacterias.

3.8.5.3. *Caracterización bioquímica*

Catalasa

Se procedió a realizar un frotis en un portaobjetos utilizando un asa esterilizada a partir de una colonia previamente aislada. Posteriormente, se añadió una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%. Se observó de manera inmediata si se producía un burbujeo, lo cual confirmaría la presencia de esta enzima.

Oxidasa

Para llevar a cabo este proceso, se empleó el método directo utilizando un papel filtro de aproximadamente 3x3. En el centro del papel, se agregaron dos gotas del reactivo de Kovacs, y

con la ayuda de un asa bacteriológica, se tomó una colonia y se extendió sobre el reactivo. La reacción se considera positiva si se observaba un cambio de color a púrpura o negro alrededor de 10 a 20 segundos, lo cual indicaría la presencia de la enzima citocromo oxidasa y la oxidación del reactivo. Por el contrario, si no se produce ningún cambio de color, se interpreta como una reacción negativa.

Pruebas SIM

Se realizó la prueba bioquímica de movilidad utilizando el medio de cultivo SIM (sulfuro, indol, movilidad). El objetivo de esta prueba fue evaluar la movilidad de ciertas bacterias, su capacidad para producir ácido sulfhídrico y su habilidad para desdoblar el indol del triptófano. Para ello, se preparó el medio SIM mediante la mezcla de agua esterilizada y el medio de cultivo, el cual se distribuyó en tubos de ensayo y se sometió a autoclave a 121 °C durante 15 minutos bajo una presión de 1 atmósfera utilizando calor húmedo.

Luego, se utilizó un asa bacteriológica para tomar una colonia previamente aislada y se realizó una siembra por punción en el medio semisólido en posición vertical. Los tubos de ensayo se incubaron a una temperatura de 35 a 37 °C durante 48 horas. Si los microorganismos presentaban movilidad hacia las paredes del tubo y se observaba turbidez en el medio, se consideraba una prueba positiva para movilidad. Por el contrario, si los organismos se mantenían en la línea de siembra, se interpretaba como una prueba negativa. En cuanto a la detección de la producción de ácido sulfhídrico, se consideraba positiva si se observaba ennegrecimiento del medio y negativa si no se producía ennegrecimiento.

Para la prueba de indol, se utilizó el reactivo de Kovacs para identificar microorganismos capaces de fermentar hidratos de carbono. Se agregaron 5 gotas del reactivo de Kovacs al medio SIM, se mezclaron suavemente y se interpretaron de inmediato los resultados. Si en la superficie del medio se forma un anillo rojo, se interpreta como un resultado positivo para la prueba de indol. En caso contrario, si no se produce ningún cambio de color, o si la superficie adquiere un color naranja, se considera un resultado negativo.

Ureasa

Se llevó a cabo la prueba bioquímica de la ureasa utilizando el medio de cultivo agar urea de Christensen. Esta prueba permite evaluar la capacidad de un microorganismo para desdoblar la urea y producir 2 moléculas de amoníaco (NH₃) gracias a la enzima ureasa. Para preparar el medio

de cultivo, se utilizó agua destilada y posteriormente se autoclavó en tubos de ensayo a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos a una presión de 1 atmósfera mediante calor húmedo. Una vez autoclavado, el medio se dejó solidificar en forma de pico de flauta o cola de pescado.

Utilizando un asa de punta, se tomó una colonia y se sembró en el medio de cultivo mediante una estría, sin hacer una punción en el medio. A continuación, se incubó durante 24 horas a una temperatura de 36 grados centígrados en una incubadora. Si la colonia produce un color rojo intenso en el pico de flauta, se interpreta como un resultado positivo para la ureasa. Por el contrario, si el color del medio se vuelve amarillo, se considera un resultado negativo.

Citrato

Se realizó la prueba de citrato utilizando el medio de cultivo citrato de Simmons. Esta prueba tiene como objetivo determinar la capacidad de los microorganismos para utilizar el citrato como fuente de carbono para su metabolismo y crecimiento, lo cual provoca alcalinidad. Al igual que las otras pruebas, se preparó el medio mezclando agua destilada, se autoclavó y se dejó solidificar a temperatura ambiente en forma de pico de flauta.

A continuación, se tomó una colonia previamente aislada y se inoculó en forma de una única estría en la superficie del pico de flauta. El medio se incubó durante un tiempo de 24 a 48 horas aproximadamente a una temperatura de 37° C. Es considerado un resultado positivo si se observa crecimiento, incluso si no hay cambio de color en el medio. También se considera positivo si el medio muestra un cambio de color azul intenso en el pico de flauta. Por otro lado, se considera un resultado negativo si no se observa crecimiento y el color del medio es verde.

Manitol

Se utilizó el medio de cultivo Manitol Salt Agar para llevar a cabo la prueba de manitol, con el objetivo de lograr un crecimiento selectivo de estafilococos. Para preparar este medio, se suspendió el polvo en agua destilada y se calentó en una estufa hasta que se disolviera por completo. Luego, se distribuyó en recipientes y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Para realizar el plaqueo en las cajas Petri, se llevó a cabo el procedimiento dentro de la cámara de flujo laminar. Utilizando un asa bacteriológica, se tomó una muestra de una colonia y se realizó una siembra por estría en los cuatro cuadrantes de la placa de agar. Posteriormente, se selló con

masqui, se etiquetó y se dejó incubar a una temperatura de 37 °C durante 18 a 24 horas. Se considera positivo si tanto el medio circundante como las colonias adquieren un color amarillo. Por el contrario, si las colonias son de color rojo y no hay cambio en el medio, se considera un resultado negativo.

McConkey

Para realizar la prueba de lactosa, se emplea el medio de cultivo McConkey, el cual tiene como objetivo identificar la fermentación de la lactosa en enterobacterias y es selectivo para bacterias no entéricas, inhibiendo el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. Para preparar este medio, se suspendió el agar en agua destilada y se calentó mientras se agitaba para lograr una completa disolución. Posteriormente, se autoclavó junto con las cajas Petri limpias a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

Una vez solidificado el medio, se procedió a plaquear las cajas Petri con el medio en la cámara de flujo laminar. Utilizando un asa bacteriológica, se tomó una colonia aislada y se sembró en forma de estría en los cuatro cuadrantes de la placa. Luego, se sellaron las cajas con masqui y se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. Los microorganismos que fermentan la lactosa presentan colonias de color rosado o rojizo, acompañadas de un halo de precipitación biliar. Por el contrario, las colonias que no fermentan la lactosa son incoloras o del mismo color que el medio.

TSI

Se utilizó el Agar Hierro Triple Azúcar (AHK) como medio de cultivo para realizar la prueba de TSI (Triple Sugar Iron). El AHK es un medio de diferenciación que permite determinar la fermentación de hidratos de carbono y la producción de ácido sulfhídrico. Para preparar el medio de cultivo, se utilizó agua destilada y se colocó en tubos para su posterior autoclave a 121 °C durante 15 minutos a una presión de 1 atmósfera mediante calor húmedo. Una vez autoclavado, el medio se dejó solidificar a temperatura ambiente en forma de pico de flauta.

Utilizando un asa de punta, se tomó una colonia aislada y se inoculó el medio AHK mediante una picadura y una estría en el pico de flauta. Las condiciones de incubación fueron de 24 horas a una temperatura de 37 °C. La interpretación de los resultados se realiza de la siguiente manera:

- Si el pico de flauta se torna rojo, indica degradación aeróbica de la glucosa.
- Si la capa profunda se vuelve amarilla, se interpreta como degradación anaeróbica de la glucosa.
- Un color amarillo en el pico indica acidez.
- Un color amarillo en la capa profunda también indica acidez.
- Si el pico se vuelve rojo, indica alcalinidad.
- Si no hay cambio de color en la capa profunda, se interpreta como alcalinidad.
- Si se forma un precipitado negro, hay producción de H₂S.
- La presencia de burbujas, descomposición del medio o desplazamiento al fondo dejando espacio libre indica la presencia de gases.

3.8.6. Etapa cinco: Celdas de combustión microbianas

3.8.6.1. Fabricación celdas de combustión microbiana

En el laboratorio de biotecnología de la ESPOCH, se llevó a cabo la fabricación de celdas utilizando material de vidrio con medidas proporcionadas por el grupo de investigación GEAA (Grupo de Energías Alternativas y Ambiente). Todo el proceso se realizó dentro de la cámara de flujo laminar en una configuración redonda de una sola cámara. Esta configuración se eligió para evitar la entrada de aire en la cámara catódica y reducir las pérdidas óhmicas.

Se crearon dos orificios con un diámetro de 2 cm como puntos de entrada, los cuales fueron adaptados con tapones de caucho. En la parte superior de la celda, se colocó una fibra de carbono que funcionó como una membrana de intercambio catiónico. Esta fibra se compactó con una tapa de aluminio envuelta en parafilm y se cubrió con papel celofán para evitar el paso de aire al compartimento. Luego, se creó un ánodo de configuración anóxica, donde se pasó un alambre de acero inoxidable de ortodoncia número 7 alrededor de la celda utilizando una aguja.

A continuación, se introdujo la muestra compuesta por sedimentos procedentes de las lagunas en la celda. Finalmente, se sumergió la celda completa en agua esterilizada previamente, utilizando aireadores. Los alambres conectados al ánodo y al cátodo se expusieron al aire y se conectaron con pinzas de lagarto hacia una DAG que transmitía la información al ordenador.

3.8.6.2. Esterilización del material

Se empleó el autoclave para esterilizar tanto el agua como las celdas, sometiéndolos a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos a una presión de 1 atm por calor húmedo. Asimismo,

se utilizó luz ultravioleta (UV) en la cámara de flujo laminar para esterilizar todos los materiales, como el celofán, el parafilm, las pinzas, las tapas, el alambre de acero inoxidable, los cauchos y los recipientes. La luz UV tiene la capacidad de inactivar microorganismos, como bacterias, virus y protozoos. Durante todo el proceso, se implementó el uso de alcohol como desinfectante.

3.8.6.3. Tratamiento de la fibra de carbono

La fibra de carbono fue cortada según las dimensiones requeridas para nuestra celda de combustión microbiana. Con el objetivo de mejorar la formación de biopelículas y eliminar cualquier impureza, se llevó a cabo un tratamiento específico. En primer lugar, se sumergió la membrana del ánodo en cetona industrial durante 12 horas. Luego, se lavó con agua destilada de 5 a 6 veces para eliminar los residuos de cetona. A continuación, la fibra de carbono se sumergió en una solución que contenía 100 gramos de peróxidosulfato de amonio y 50 ml de ácido sulfúrico concentrado al 96%. Se aseguró que la fibra estuviera completamente sumergida y se dejó reposar durante 15 minutos. Posteriormente, se secó en una mufla a una temperatura aproximada de 450 °C durante unos 30 minutos. Después de enfriar en un área estéril, se almacenó en una funda ziploc para su posterior uso.

En el caso de la membrana utilizada como cátodo, se sumergió en agua destilada durante toda la noche con el fin de eliminar cualquier impureza presente en la fibra.

3.8.7. Etapa seis: Siembra de bacterias electrogénicas

Para la siembra de bacterias electrogénicas, se procedió desmontando las celdas en una cámara de flujo laminar. La fibra de carbón utilizada como ánodo se cortó en una muestra representativa y se colocó en un tubo con agua de peptona. Asimismo, se obtuvo un raspado de las bacterias utilizando un hisopo, que también se sumergió en agua de peptona. Posteriormente, se realizaron diluciones hasta una dilución de 10^{-5} . Estas diluciones se sembraron en la superficie de placas de Petri previamente esterilizadas. Las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 7 días, seguido de otros 7 días en refrigeración. Se llevó a cabo una tinción de Gram y se realizó una comparación fenotípica para su identificación final.

3.9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis inferencial con el propósito de examinar las posibles disparidades entre los grupos de Celdas de Combustión Microbiana (CCM). Para este propósito, se utilizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con el fin de determinar si había diferencias estadísticamente

significativas entre los grupos. A continuación, se aplicó la prueba de Tukey como una prueba post hoc para identificar de manera específica las diferencias que podrían existir entre los grupos.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización físico-química de los sedimentos

4.1.1. Sedimentos de la laguna Quilotoa

4.1.1.1. Características físicas

A continuación, se presentan las características físicas que se obtuvieron in situ de cada muestra. Cabe destacar que estas muestras consistieron en muestras simples de 2 kg cada una. Además, es importante mencionar que las condiciones ambientales de presión y temperatura se mantuvieron constantes en 0.997 atm y 10 °C respectivamente para todas las muestras recolectadas.

Tabla 4-1: Características físicas de los sedimentos de la laguna Quilotoa

Nombre	Color	Olor	Textura	Consistencia
QN1 -SH1	Grisáceo	Característico del suelo	Gruesa	Mojado
QN2 – SH2	Marrón	Característico del suelo	Fina	Mojado
QN3 – H1	Grisáceo	Característico del suelo	Gruesa	Mojado
QN4 - H2	Grisáceo	Característico del suelo	Gruesa	Mojado
QN5 – H3	Grisáceo	Característico del suelo	Fina	Mojado
QN6 – H4	Marrón	Característico del suelo	Fina	Mojado
QN7- SH3	Marrón, verduzco	Característico del suelo	Gruesa	Mojado
QN8 –SH4	Casi negro	Característico del suelo	Fina	Mojado

QN= Quilotoa Numero, SH=Semi Hundido, H= Hundido.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

La tabla 4-1 revela una amplia diversidad de características físicas en los sedimentos de la laguna Quilotoa. La tonalidad grisácea predomina en la mayoría de las muestras, pero también se aprecian tonalidades marrón y negro en algunos casos específicos. Además, se destaca que el olor característico del suelo está presente en todas las muestras analizadas.

En cuanto a la textura, se observa una variación entre las muestras, con algunas presentando una textura gruesa, mientras que otras exhiben una textura más fina. Estas diferencias en la textura podrían deberse a factores como la composición mineralógica de los sedimentos y la dinámica de sedimentación en la laguna. Es importante destacar que la consistencia de todos los sedimentos

es uniformemente mojada, lo cual indica la presencia de humedad en el momento de la recolección.

4.1.1.2. Características fisicoquímicas

Se realizó un análisis de las características fisicoquímicas mediante una muestra compuesta que fusionó las 8 muestras individuales recolectadas. De acuerdo con IDEAM (2020, p. 1), una muestra compuesta se compone de la combinación de muestras individuales de igual volumen o proporcionales al flujo. Este enfoque se emplea principalmente para obtener una evaluación representativa de la composición química de la muestra en consideración.

Tabla 4-2: Características fisicoquímicas de los sedimentos de la laguna Quilotoa

Parámetro	Valores de referencia	Unidades
Conductividad	333,4	$\mu\text{S}/\text{cm}$
Salinidad	316,5	ppm
Ph	8,43	-
Sólidos totales disueltos	202,8	ppm
Sulfatos	26	mg/L SO_4^{2-}
Fosfatos	0,45	mg/L PO_4^{3-}
Amonios	0,01	mg/L N-NH_3
Cloruros	18,43	mg/L Cl^-
Magnesio	26,05	ppm
Calcio	28,8	ppm
Dureza	192	ppm
DBO5	89	mg/L
DQO	597	mg/L

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

La tabla 4-2 presenta los resultados del análisis químico de la muestra compuesta de sedimentos de la laguna Quilotoa. El valor de conductividad eléctrica obtenido, 333,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$, es consistente con los rangos reportados en diversas áreas de alta montaña en Ecuador y otras partes del mundo, que oscilan entre 280 y 337 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Escobar et al., 2021, pp. 76-81). En cuanto al valor de salinidad, se registró un valor de 316,5 ppm, similar al obtenido por Vásquez (2021, pp. 86-87) en los sedimentos de la laguna Cuicocha, donde se reportó un valor de 312,6 ppm. Además, siguiendo la

clasificación propuesta por Chavira y Castellanos (1987 citado en Vásquez, 2021, pp. 86-87), se determinó que el sedimento periférico de la laguna Quilotoa se clasifica como "no salino" (0-3000 ppm).

El valor de pH obtenido de 8,43 de los sedimentos se considera ligeramente básico y se encuentra dentro de los límites máximos permisibles establecidos por la normativa ambiental ecuatoriana vigente. Según esta normativa, los cuerpos de agua utilizados con fines recreativos deben tener un rango de pH entre 6,50 y 8,50 (Tulsma, 2015). El valor obtenido en este estudio es ligeramente mayor al reportado por Acuña (2021, pp. 58-98), donde menciona que el pH de la laguna Quilotoa varió entre 7,45 y 7,53, también clasificado como ligeramente básico. Es importante destacar que varios autores en diferentes partes del mundo han señalado que las aguas en ecosistemas lacustres similares suelen presentar valores de pH entre 6 y 9, valores que concuerdan con los encontrados en este estudio (González et al., 2020, pp. 71-83).

La cantidad de sólidos disueltos presentes fue de 202,8 ppm. Este valor es considerablemente inferior al valor de 11,99 g/L reportado por Acuña (2021, pp. 58-98). Según este autor, los valores altos de sólidos totales disueltos pueden indicar la presencia de un fenómeno geoquímico activo dentro del cuerpo de agua de la laguna.

En relación a los componentes químicos, se observó que el sulfato obtuvo un valor de 26 mg/L, superando los valores planteados por Roldán y Ramírez (2008), que oscilan entre 2 y 10 mg/L. Sin embargo, este valor es similar al obtenido por Vásquez (2022, p. 92) en la laguna Cuicocha, quien reportó un valor de 30,54 mg/L para el sulfato.

Por otro lado, la concentración de fosfato fue de 0,45 mg/L, siendo este valor superior al reportado por Acuña (2021, pp. 58-98), quien obtuvo un valor medio de 0,28 mg/L. Según Roldán y Ramírez (2008), altas cantidades de fosfatos pueden promover un crecimiento desmesurado de algas y otros organismos, lo que aumenta el grado de eutrofización en cuerpos de agua como lagunas y lagos.

En relación a los cationes evaluados, se obtuvo un valor de 28,8 mg/L para el calcio, el cual es inferior al valor de 410 mg/L reportado por Acuña (2021, pp. 58-98). Según Marín (2003, pp. 351-402), las concentraciones de calcio en aguas o sedimentos varían ampliamente y están relacionadas con el nivel de mineralización presente en el medio. En cuanto al magnesio, se registró un valor de 26,05 mg/L, el cual se encuentra dentro de las concentraciones naturales que pueden variar entre 1 y 100 mg/L, dependiendo del tipo de roca de la cual se origine (Acuña, 2021, pp. 58-98). Por otro lado, el resultado obtenido de 192 mg/L indica que el grado de dureza es considerado

moderadamente alta, ya que se encuentra dentro del rango de valores establecido por Roldán y Ramírez (2008) de 75 mg/L a 150 mg/L.

En el caso de DBO₅, el valor de 89 mg/L se encuentra dentro del rango establecido por Benjumea y Álvarez (2017, pp. 131-146) de 20 a 100 mg/L, lo que indica que la contaminación en los sedimentos es baja. En contraste, el valor de 597 mg/L para DQO indica una alta concentración de contaminantes orgánicos en el agua. Los valores elevados de DQO en el agua sugieren una mayor contaminación y un mayor consumo de oxígeno debido a la oxidación de la materia orgánica presente (BAIRES, 2023, p.1).

Análisis Químico

Tabla 4-3: Óxidos de los sedimentos de la laguna Quilotoa

Óxidos		Composición	Muestra compuesta Quilotoa
Dióxido de silicio	SiO ₂	%	18,96
Óxido de aluminio	Al ₂ O ₃	%	3,06
Óxido de Hierro	Fe ₂ O ₃	%	3,80
Óxido de Sodio	Na ₂ O	%	1,25
Óxido de Calcio	CaO	%	40,35
Óxido de Magnesio	MgO	%	0,66
Óxido de Potasio	K ₂ O	%	0,51
Óxido de Titanio	TiO ₂	%	0,16
Óxido de Manganeso	MnO	%	0,15
Óxido de Bario	BaO	%	0,00
Anhidrido fosfórico	P ₂ O ₅	%	0,07
Anhidrido Sulfúrico	SO ₃	%	2,70
Óxido de Zinc	ZnO	%	0,01
Óxido de Cromo	Cr ₂ O ₃	%	0,00
Pérdidas por Calcinación (L.O.I. 950°C)			28,32

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

La información presentada en la tabla 4-3 muestra la presencia y las proporciones de diferentes óxidos en la muestra analizada. Destacan el dióxido de silicio (SiO₂) y el óxido de calcio (CaO) como los componentes más prominentes. En un estudio realizado por Miramira et al. (2016, pp. 91-

96) en la laguna Yantac, se encontró una alta concentración de CaO y SiO₂. Los autores sugieren que estos componentes son característicos del entorno de la laguna.

También se encuentran otros óxidos como el óxido de aluminio (Al₂O₃), óxido de hierro (Fe₂O₃) y óxido de sodio (Na₂O) en cantidades menores. Además, se observan trazas de óxidos como el óxido de magnesio (MgO), óxido de potasio (K₂O), óxido de titanio (TiO₂) y otros. Estos datos proporcionan una visión general de la composición mineralógica de la muestra y su relevancia en la caracterización de las propiedades físicas y químicas.

4.1.2. Sedimentos de la laguna Amarilla

4.1.2.1. Características físicas

En la tabla 4-4 se presentan las características físicas obtenidas in situ para cada muestra, las cuales consistieron en muestras individuales de 1 kg cada una. Es relevante destacar que las condiciones de presión atmosférica se mantuvieron constantes a 1 atm, mientras que la temperatura de las muestras varió en un rango de 11,6 °C a 17,8 °C.

Tabla 4-4: Características físicas de los sedimentos de la laguna Amarilla

Nombre	Color	Olor	Textura	Consistencia
AN1	Marrón	Característico del suelo	Gruesa	Mojado
AN2	Casi negro	Característico del suelo	Gruesa	Mojado
AN3	Casi negro	Característico del suelo	Gruesa	Mojado
AN4	Casi negro	Característico del suelo	Gruesa	Mojado
AN5	Casi negro	Característico del suelo	Gruesa	Mojado
AN6	Casi negro	Característico del suelo	Gruesa	Mojado
AN7	Casi negro	Característico del suelo	Gruesa	Mojado
AN8	Casi negro	Característico del suelo	Gruesa	Mojado

AN= Amarilla Número.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

En primer lugar, se destaca que el color de los sedimentos en todas las muestras es casi negro o marrón. Esto sugiere la presencia de materia orgánica y minerales en los sedimentos, lo cual es común en ambientes acuáticos como lagos o lagunas. En cuanto al olor, se menciona que es característico del suelo. Aunque no se proporciona una descripción específica del olor, esta característica indica que los sedimentos tienen un olor similar al suelo natural. Esto es consistente con la presencia de materia orgánica y procesos de descomposición biológica en los sedimentos.

La textura de los sedimentos se describe como gruesa en todas las muestras. Esto implica que los sedimentos están compuestos por partículas de mayor tamaño. Esta textura gruesa puede influir en la capacidad de retención de agua y nutrientes en los sedimentos, así como en la permeabilidad del sustrato.

Respecto a la consistencia, se menciona que los sedimentos están mojados en todas las muestras. Esto indica que los sedimentos tienen una alta humedad al momento de la recolección. La presencia de humedad en los sedimentos puede ser importante para procesos biogeoquímicos y la disponibilidad de nutrientes para los organismos presentes en el ecosistema acuático

4.1.2.2. Características fisicoquímicas

Al igual que en el caso de la laguna Quilotoa, se llevó a cabo un análisis de las características fisicoquímicas utilizando una muestra compuesta que combinó las 8 muestras individuales recolectadas. Este método se empleó principalmente con el propósito de obtener una evaluación precisa y representativa de la composición química de la muestra.

Tabla 4-5: Características químicas de los sedimentos de la laguna Amarilla

Parámetro	Valores de referencia	Unidades
Conductividad	55,81	μS/cm
Salinidad	62,28	ppm
pH	8,36	-
Sólidos totales disueltos	33,89	ppm
Sulfatos	6	mg/L SO ₄ ²⁻
Fosfatos	0,26	mg/L PO ₄ ³⁻
Amonios	0,03	mg/L N-NH ₃
Cloruros	2,84	mg/L Cl ⁻
Magnesio	9,14	ppm
DBO5	67	mg/L
DQO	100	mg/L
Calcio	8,48	ppm
Dureza	80	ppm

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

En la tabla 4-5 se presentan los valores obtenidos para los parámetros evaluados de los sedimentos de la laguna Amarilla. Al analizar los datos, se observa que la conductividad registrada es de 55,81 $\mu\text{S}/\text{cm}$, este valor es inferior a los rangos reportados en diversas áreas de alta montaña en Ecuador y otras partes del mundo, que suelen oscilar entre 280 y 337 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Escobar et al., 2021, pp. 76-81). Sin embargo, según el estudio realizado por Moreno en 2017 sobre la laguna Amarilla, se reportó una conductividad de 147 $\mu\text{S}/\text{cm}$, lo que indica una baja cantidad de sales en esta laguna (Moreno, 2017, p. 42). En cuanto al valor de salinidad, se obtuvo un valor de 62,28. Siguiendo la clasificación propuesta por Chavira y Castellanos (1987, citado en Vásquez, 2021, pp. 86-87), se determinó que el sedimento periférico de la laguna Amarilla se clasifica como "no salino" dentro del rango de 0-3000 ppm.

El pH de los sedimentos de la laguna Amarilla, con un valor de 8,36, se considera ligeramente básico. Este valor es mayor al reportado por Moreno (2017, p. 42), quien mencionó que el pH de la laguna Amarilla fue de 6,30, clasificado como ligeramente ácido. Es importante destacar que varios autores han señalado que las aguas en ecosistemas lacustres similares suelen presentar valores de pH entre 6 y 9, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio (González et al., 2020, pp. 71-83).

En este estudio, se registró un valor de 33,89 mg/L para los sólidos totales disueltos en los sedimentos de la laguna Amarilla, lo cual es menor al valor de 78 mg/L reportado por Moreno (2017, p. 42). Las concentraciones de sólidos totales disueltos en fuentes naturales pueden variar desde 30 mg/L hasta 6000 mg/L, dependiendo de la solubilidad de los minerales presentes en la zona geológica (WHO, 2023, p.1). Según Vásquez (2021, pp. 86-87), las aguas muy oligotróficas, como aquellas encontradas en la mayoría de las provincias de la Amazonía y la región andina, pueden registrar valores superiores a 10 ppm o mg/L en términos de sólidos totales disueltos.

En relación a los componentes químicos, se encontró que el sulfato presentaba un valor de 6 mg/L, el cual se encuentra dentro del rango establecido por Roldán y Ramírez (2008), que varía entre 2 y 10 mg/L. Por otro lado, la concentración de fosfato registrada fue de 0,26 mg/L, la cual se encuentra en el rango de valores definidos por Borul (2012, pp. 163-177) en su estudio "Study of water quality of Lonar lake", que oscila entre 0,08 mg/L y 0,82 mg/L.

En cuanto al calcio, se encontró un valor de 8,48 mg/L en los sedimentos de la laguna Amarilla. La presencia de calcio en aguas naturales varía dependiendo de la cercanía a la fuente natural, siendo típicamente encontrado en concentraciones inferiores a 15 mg/L, según Acuña (2021, pp. 58-98). En relación al magnesio, se registró un valor de 9,14 mg/L, el cual se encuentra dentro del

rango de concentraciones naturales que pueden variar entre 1 y 100 mg/L, dependiendo del tipo de roca de origen (Acuña, 2021, pp. 58-98). Además, el resultado obtenido de 80 mg/L para la dureza indica que el grado de dureza se considera moderadamente alta, ya que se encuentra dentro del rango de valores establecido por Roldán y Ramírez (2008) de 75 mg/L a 150 mg/L.

En relación al parámetro DBO5, el valor de 67 mg/L se encuentra dentro del rango de contaminación baja establecido por Benjumea y Álvarez (2017, pp. 131-146), el cual varía entre 20 y 100 mg/L. Por otro lado, el valor de 100 mg/L para DQO indica una baja concentración de contaminantes orgánicos en el agua.

4.2. Caracterización fenotípica

4.2.1. Caracterización macroscópica

Se registró el crecimiento de las bacterias a las 48 horas, teniendo en cuenta una temperatura ambiente que varió entre 13 °C y 20 °C. Con el fin de verificar si las bacterias sembradas eran extremófilas, se sometieron a condiciones de refrigeración en un rango de 4 °C a 10 °C. Estas condiciones se aplicaron a cada muestra, tanto las provenientes de la laguna Quilotoa como de la laguna Amarilla.

4.2.1.1. Cuantificación y morfología de colonias pertenecientes a la laguna Quilotoa

Cuantificación de colonias contables

A continuación, se presentan las tablas que muestran los resultados de la cuantificación de las colonias microbianas en las diferentes muestras recolectadas en la laguna Quilotoa. Estos datos ofrecen información detallada sobre la cantidad de microorganismos presentes en cada muestra, considerando diferentes diluciones.

Tabla 4-6: Número de colonias contables por cada dilución de la muestra QN1

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10 °C
QN1-10 ⁻¹	Incontables	850
QN1-10 ⁻²	Incontables	900
QN1-10 ⁻³	300	234
QN1-10 ⁻⁴	268	150

QN1-10 ⁻⁵	40	35
TOTAL	608	2169

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-7: Número de colonias por cada dilución de la muestra QN2

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10°C
QN2-10 ⁻¹	Incontables	Incontables
QN2-10 ⁻²	890	878
QN2-10 ⁻³	987	980
QN2-10 ⁻⁴	500	467
QN2-10 ⁻⁵	208	200
TOTAL	2585	2525

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-8: Número de colonias por cada dilución de la muestra QN3

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10°C
QN3-10 ⁻¹	500	476
QN3-10 ⁻²	200	150
QN3-10 ⁻³	54	40
QN3-10 ⁻⁴	20	11
QN3-10 ⁻⁵	No presenta crecimiento bacteriano	No presenta crecimiento bacteriano
TOTAL	774	677

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-9: Número de colonias por cada dilución de la muestra QN4

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10°C
QN4-10 ⁻¹	200	176
QN4-10 ⁻²	100	60
QN4-10 ⁻³	120	94
QN4-10 ⁻⁴	30	26
QN4-10 ⁻⁵	No presenta crecimiento bacteriano	No presenta crecimiento bacteriano
TOTAL	450	356

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-10: Número de colonias por cada dilución de la muestra QN5

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10°C
QN5-10 ⁻¹	100	103
QN5-10 ⁻²	50	43
QN5-10 ⁻³	15	11
QN5-10 ⁻⁴	5	4
QN5-10 ⁻⁵	No presenta crecimiento bacteriano	No presenta crecimiento bacteriano
TOTAL	170	161

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-11: Número de colonias por cada dilución de la muestra QN6

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10°C
QN6-10 ⁻¹	600	573
QN6-10 ⁻²	70	64
QN6-10 ⁻³	40	35
QN6-10 ⁻⁴	15	11
QN6-10 ⁻⁵	1	1
TOTAL	726	684

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-12: Número de colonias por cada dilución de la muestra QN7

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10°C
QN7-10 ⁻¹	900	855
QN7-10 ⁻²	5	5
QN7-10 ⁻³	3	3
QN7-10 ⁻⁴	4	4
QN7-10 ⁻⁵	No presenta crecimiento bacteriano	No presenta crecimiento bacteriano
TOTAL	912	867

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-13: Número de colonias por cada dilución de la muestra QN8

Diluciones de la muestras	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10°C
QN8-10 ⁻¹	Incontable	Incontable
QN8-10 ⁻²	780	797
QN8-10 ⁻³	360	354
QN8-10 ⁻⁴	50	48
QN8-10 ⁻⁵	15	12
TOTAL	1205	1211

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-14: Número promedio de colonias por cada dilución de la muestra de la laguna Quilotoa

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10°C
QN-10 ⁻¹	287,5	379,125
QN-10 ⁻²	261,875	362,125
QN-10 ⁻³	234,875	218,875
QN-10 ⁻⁴	111,5	90,125
QN-10 ⁻⁵	33	31
TOTAL, PROMEDIO	928,75	1081,25

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

La Tabla 4-14 proporciona información sobre el número promedio de colonias contables para cada dilución de la muestra de la laguna Quilotoa, teniendo en cuenta dos rangos de temperatura: 13 a 20 °C y 4 a 10 °C. Al analizar las diluciones, se observa que al someter las colonias a una temperatura más baja, el número de colonias contables disminuye. Es importante destacar que para las diluciones QN-10-1 y QN-10-2 se registró una cantidad incontable de colonias en diferentes muestras individuales, lo cual sugiere una alta abundancia microbiana en esas diluciones específicas y puede indicar una diversidad microbiana significativa en ese rango de temperatura.

Al analizar el promedio de colonias contables, se observa que a temperaturas de 13 a 20 °C se obtuvo un promedio de 928,75 colonias, mientras que a temperaturas de 4 a 10 °C se registró un promedio de 1081,25 colonias. Esto sugiere la presencia significativa de microorganismos

extremófilos adaptados a bajas temperaturas en la muestra de la laguna Quilotoa, lo cual demuestra una notable diversidad y abundancia de este tipo de microorganismos en ese entorno.

Características morfológicas

Después de llevar a cabo la siembra en agar PCA de las diluciones de cada muestra, se obtuvo el aislamiento de bacterias con características notables y distintivas, lo que permitió la identificación de 12 tipos diferentes de bacterias. En la Tabla 4-15 se presentan descripciones exhaustivas de las características principales de cada uno de los tipos de bacterias identificadas.

Tabla 4-15: Características morfológicas de los 12 tipos de bacterias

Colonias laguna Quilotoa	Formas de colonias enteras	Borde marginal	Forma de la superficie	Consistencia	Color
QN14- 10 ⁻⁵	Circular	Entero	Plana	Gelatinosas	Blancas
QN15- 10 ⁻⁴	Circulares e irregulares	Entero	Plana	Seca	Rojas con bordes blancos
QN21- 10 ⁻³	Irregular	Rizado	Plana	Viscosa	Rosada
QN22- 10 ⁻²	Circulares	Entero	Convexa	Seca	Blancas
QN37- 10 ⁻¹	Irregulares	Rizado	Convexa	Gelatinosa	Naranja
QN38- 10 ⁻⁵	Circulares	Entero	Elevada	Viscosa	Amarilla
QN61- 10 ⁻⁵	Irregulares	Rizado	Elevada	Viscosa	Café
QN71- 10 ⁻³	Irregular	Lobulado	Elevada	Viscosa	Transparentes
QN86- 10 ⁻⁴	Circular	Rizado	Elevada	Viscosa	Blancas
QN89- 10 ⁻³	Irregular	Ondulado	Plana	Seca	Naranja
QN89- 10 ⁻⁴	Circular	Enteros	Convexa	Viscosa	Naranja
QN89- 10 ⁻⁵	Irregular	Rizada	Convexa	Viscosa	Naranja

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

4.2.1.2. Cuantificación y morfología de las colonias pertenecientes a la laguna Amarilla

Cuantificación de colonias contables

En las tablas siguientes se presentan los resultados de la cuantificación de las colonias microbianas en las muestras recolectadas en la laguna Amarilla. Estos datos proporcionan una

visión detallada de la cantidad de microorganismos presentes en cada muestra, teniendo en cuenta distintas diluciones.

Tabla 4-16: Número de colonias por cada dilución de la muestra AN1

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10 °C
AN1-10 ⁻¹	Incontables	Incontables
AN1-10 ⁻²	364	330
AN1-10 ⁻³	89	80
AN1-10 ⁻⁴	41	40
AN1-10 ⁻⁵	12	10
TOTAL	506	460

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-17: Número de colonias por cada dilución de la muestra AN2

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10 °C
AN2-10 ⁻¹	Incontables	Incontables
AN2-10 ⁻²	469	400
AN2-10 ⁻³	230	230
AN2-10 ⁻⁴	109	100
AN2-10 ⁻⁵	98	86
TOTAL	906	816

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-18: Número de colonias por cada dilución de la muestra AN3

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10 °C
AN3-10 ⁻¹	Incontables	Incontables
AN3-10 ⁻²	190	170
AN3-10 ⁻³	57	40
AN3-10 ⁻⁴	9	9
AN3-10 ⁻⁵	5	5
TOTAL	261	224

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-19: Número de colonias por cada dilución de la muestra AN4

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10°C
AN4-10 ⁻¹	Incontables	Incontables
AN4-10 ⁻²	840	836
AN4-10 ⁻³	110	100
AN4-10 ⁻⁴	1	1
AN4-10 ⁻⁵	No presenta crecimiento bacteriano	No presenta crecimiento bacteriano
TOTAL	951	937

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-20: Número de colonias por cada dilución de la muestra AN5

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10°C
AN5-10-1	Incontables	Incontables
AN5-10-2	218	216
AN5-10-3	78	70
AN5-10-4	12	10
AN5-10-5	1	1
TOTAL	309	297

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-21: Número de colonias por cada dilución de la muestra AN6

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10°C
AN6-10 ⁻¹	Incontables	Incontables
AN6-10 ⁻²	406	398
AN6-10 ⁻³	102	100
AN6-10 ⁻⁴	12	11
AN6-10 ⁻⁵	4	4
TOTAL	524	513

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-22: Número de colonias por cada dilución de la muestra AN7

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4-10°C
AN7-10 ⁻¹	Incontables	Incontables
AN7-10 ⁻²	Incontables	Incontables
AN7-10 ⁻³	210	208
AN7-10 ⁻⁴	65	60
AN7-10 ⁻⁵	No presenta crecimiento bacteriano	No presenta crecimiento bacteriano
TOTAL	275	268

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-23: Número de colonias por cada dilución de la muestra AN8

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4-10°C
AN8-10 ⁻¹	Incontables	Incontables
AN8-10 ⁻²	116	111
AN8-10 ⁻³	21	20
AN8-10 ⁻⁴	5	5
AN8-10 ⁻⁵	2	2
TOTAL	144	138

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-24: Número promedio de colonias por cada dilución de la muestra de la laguna Amarilla

Diluciones de la muestra	Medio PCA	
	13 a 20 °C	4 a 10 °C
AN-10 ⁻¹	Incontables	Incontables
AN-10 ⁻²	2603	2461
AN-10 ⁻³	897	848
AN-10 ⁻⁴	254	236
AN-10 ⁻⁵	122	108
TOTAL	3876	3653
PROMEDIO		

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

La Tabla 4-24 presenta el número promedio de colonias por cada dilución de la muestra de la laguna Amarilla en dos rangos de temperatura: 13 a 20 °C y 4 a 10 °C. En primer lugar, es notable que la dilución AN-10⁻¹ exhibe una abundancia tan elevada que su conteo resulta incontable en ambas temperaturas. Al analizar las diluciones restantes y comparar los dos rangos de temperatura, se observa que, en general, el número promedio de colonias es ligeramente mayor a temperaturas más altas en comparación con las temperaturas más bajas.

En cuanto al promedio total de colonias obtenidas en ambas temperaturas, se registraron 3876 colonias a temperaturas de 13 a 20 °C, mientras que a temperaturas de 4 a 10 °C se obtuvieron 3653 colonias. Estos datos sugieren una mayor abundancia microbiana a temperaturas más altas. Sin embargo, es relevante destacar que esta diferencia no es significativamente alta, lo que indica la presencia de una gran cantidad de microorganismos extremófilos en la muestra de la laguna Amarilla.

Caracterización morfológica

Tras el aislamiento de las bacterias en agar PCA a través de una siembra en superficie, se procedió a la selección de aquellas bacterias que exhibían una característica destacada y específica para su posterior identificación, siguiendo un proceso similar al llevado a cabo en el caso de la laguna Quilotoa. Como resultado de este análisis, se logró identificar un total de 10 tipos distintos de bacterias. La Tabla 4-25 proporciona información detallada acerca de las principales características de cada tipo de bacteria identificada.

Tabla 4-25: Características morfológicas de los 10 tipos de bacterias

Colonias laguna Amarilla	Formas de colonias enteras	Borde marginal	Forma de la superficie	Consistencia	Color
AN31 10 ⁻³	Irregular	Entero	Plana	Seca	Naranja transparente
AN41 10 ⁻³	Circular	Ondulada	Elevada	Seca	Morada
AN51 10 ⁻³	Circular	Ondulada	Convexa	Viscosa	Amarilla
AN52 10 ⁻³	Irregular	Rizado	Plana	Gelatinosa	Transparente
AN71 10 ⁻⁴	Circular	Entero	Umbonada	Viscosa	Morada
AN81 10 ⁻³	Irregular	Ondulada	Elevada	Gelatinosa	Naranja
AN81 10 ⁻⁴	Irregular	Rizado	Plana	Seca	Blanca

AN82 10 ⁻⁴	Circular	Entero	Elevada	Gelatinosa	Blanca lechosa
AN83 10 ⁻³	Irregular	Rizado	Convexa	Viscosa	Blanca
AN84 10 ⁻³	Circular	Entero	Elevada	Viscosa	Blanca lechosa

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

4.2.2. Caracterización microscópica

4.2.2.1. Resultados de la tinción Gram de las colonias de bacterias aisladas de la laguna Quilotoa

Tabla 4-26: Características microscópicas las colonias de bacterias de la laguna Quilotoa

Colonias laguna Quilotoa	Tinción Gram	Forma
QN14- 10 ⁻⁵	Gram positivo	Cocos
QN15- 10 ⁻⁴	Gram negativo	Bacilos
QN21- 10 ⁻³	Gram negativo	Bacilos
QN22- 10 ⁻²	Gram positivo	Bacilos
QN37- 10 ⁻¹	Gram negativo	Bacilos
QN38- 10 ⁻⁵	Gram negativo	Bacilos
QN61- 10 ⁻⁵	Gram negativo	Bacilos
QN71- 10 ⁻³	Gram negativo	Bacilos
QN86- 10 ⁻⁴	Gram negativo	Bacilos
QN89- 10 ⁻³	Gram negativo	Bacilos
QN89- 10 ⁻⁴	Gram positivo	Bacilos
QN89- 10 ⁻⁵	Gram negativo	Bacilos

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

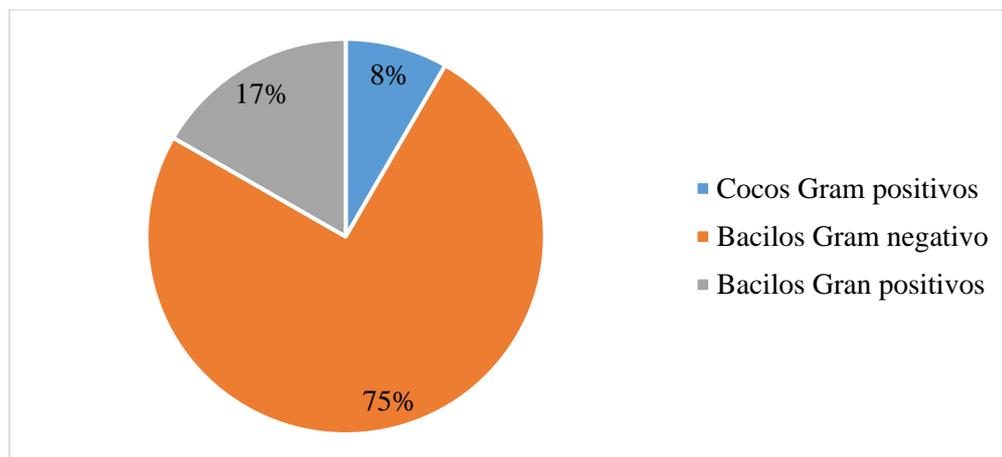


Ilustración 4-1: Porcentaje de cocos y bacilos obtenidos de la laguna Quilotoa

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

En la ilustración 4-1, se puede observar que los bacilos Gram negativos son predominantes en la composición bacteriana, representando un 75% del total. En segundo lugar, se encuentran los bacilos Gram positivos con un 17%, mientras que el 8% restante corresponde a cocos Gram positivos. Estos resultados de tinción Gram son consistentes con los informados por Acuña (2021, pp. 58-98) y Meneses (2013), quienes realizaron estudios en la laguna Quillota y en tres lagunas de alta montaña en Colombia, respectivamente.

La comparación de estos resultados con los estudios previos mencionados revela una concordancia en la proporción de los diferentes tipos de bacterias encontradas. En todos los casos, se encontró una mayor presencia de bacilos Gram negativos, seguidos por bacilos Gram positivos, y una menor prevalencia de cocos Gram positivos y Gram negativos. Hoover y Pikuta (2010, pp. 2-4) han señalado que en ambientes fríos, como lagos de alta montaña, nieve, hielo y escombros antárticos, las bacterias predominantes son en su mayoría bacilos Gram negativos, seguidos de los Gram positivos. Esto se debe a que estas bacterias exhiben una mayor diversidad enzimática, lo que les permite sobrevivir en condiciones oligotróficas (Farías, 2020, pp. 5-20).

4.2.2.2. Resultados de la tinción Gram de las colonias de bacterias aisladas de la laguna del Amarilla

Tabla 4-27: Características microscópicas las colonias de bacterias de la laguna Amarilla

Colonias laguna Amarilla	Tinción Gram	Forma
AN31 10 ⁻³	Gram negativo	Bacilos
AN41 10 ⁻³	Gram negativo	Bacilos

AN51 10 ⁻³	Gram negativo	Bacilos
AN52 10 ⁻³	Gram negativo	Bacilos
AN71 10 ⁻⁴	Gram negativo	Bacilos
AN81 10 ⁻³	Gram positivo	Cocos
AN81 10 ⁻⁴	Gram positivo	Cocos
AN82 10 ⁻⁴	Gram negativo	Bacilos
AN83 10 ⁻³	Gram negativo	Bacilos
AN84 10 ⁻³	Gram negativo	Bacilos

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

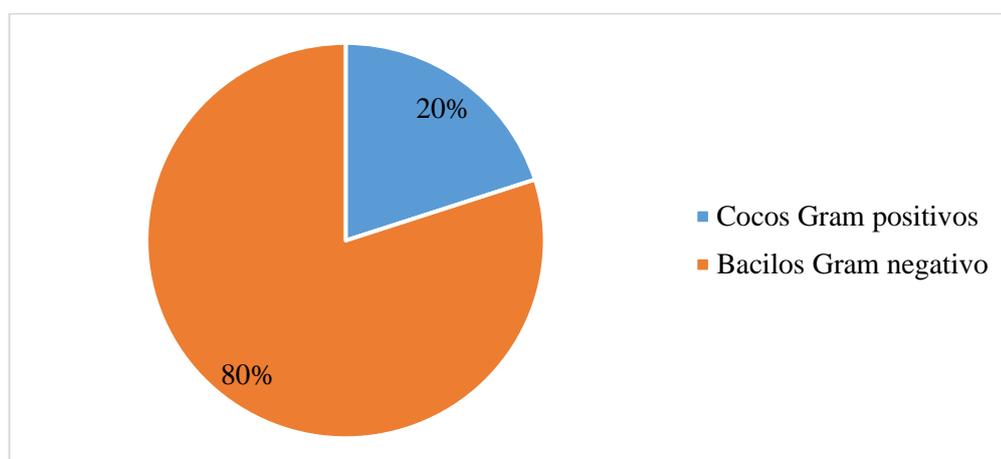


Ilustración 4-2: Porcentaje de cocos y bacilos obtenidos de la laguna Amarilla

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

A partir de la ilustración 4-2, se puede observar una clara predominancia de bacilos Gram negativos en la composición bacteriana, representando aproximadamente el 80% del total. El 20% restante corresponde a cocos Gram positivos. Estos resultados son consistentes con los hallazgos reportados por Moreno (2017, p. 47), quien encontró que el 94,74% de los 19 clones analizados eran bacilos Gram negativos, mientras que el 5,26% eran cocos Gram positivos, lo que indica una marcada predominancia de los bacilos Gram negativos en esta laguna.

En ambientes fríos, como la nieve, el hielo y los escombros antárticos, es común encontrar una predominancia de bacilos Gram negativos que tienen la capacidad de formar esporas (Hoover y Pikuta, 2008, pp. 2-4). Esta predominancia de los bacilos Gram negativos se debe posiblemente a su menor vulnerabilidad a la depredación. De acuerdo con estudios realizados por González et al. (1990, pp. 583-589) y Meneses y Herrera (2015, pp. 1-10) en lagunas oligotróficas, la presencia de ciliados bacterívoros puede reducir la cantidad de bacterias Gram positivas, ya que estos

organismos prefieren alimentarse de bacterias con estructuras de pared celular característicamente Gram positivas.

4.3. Caracterización Bioquímica

Tabla 4-28: Caracterización bioquímica de muestras de la laguna Quilotoa

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE MUESTRAS DE LA LAGUNA QUILOTOA													
MUESTRA	CATALASA	OXIDASA	TSI				SIM			CITRATO	UREA	MANITOL	MC CONKEY
			GLUCOSA	LACTOSA	H ₂ S	GAS	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD				
QN14 10 ⁻⁵	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
QN15 10 ⁻⁴	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
QN21 10 ⁻³	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
QN22 10 ⁻²	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QN37 10 ⁻¹	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
QN38 10 ⁻⁵	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
QN61 10 ⁻⁵	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
QN71 10 ⁻³	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
QN86 10 ⁻⁴	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
QN89 10 ⁻³	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
QN 89 10 ⁻⁴	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
QN89 10 ⁻⁵	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

La presencia de resultados positivos en la prueba de oxidasa sugiere la posible presencia de géneros bacterianos psicrotróficos en las muestras analizadas. Al considerar en conjunto los resultados de todas las pruebas bioquímicas realizadas a los microorganismos aislados de la Laguna Quilotoa (Tabla 4-28), se pueden identificar posibles géneros a los cuales pertenecen estas bacterias. Entre los géneros que podrían estar presentes se encuentran *Staphylococcus*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Shewanella*, *E. coli*, *Serratia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Lysinibacillus* y *Citrobacter*. La literatura científica ha señalado la presencia de los microorganismos mencionados en muestras de agua de lagos de alta montaña y lagos volcánicos (Demergasso et al., 2010; Barranco et al., 2011; Bravo et al., 2014). Sin embargo, según las investigaciones de González et al. (2021, pp. 2710-3609), existe una falta de datos suficientes sobre la microbiota

de los lagos de alta montaña, lo que dificulta hacer afirmaciones definitivas sobre los géneros que se encuentran en estos entornos. Es importante destacar que los géneros mencionados suelen estar presentes en ambientes fríos con presencia de salinidad.

Tabla 4-29: Caracterización bioquímica de muestras de la laguna Amarilla

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE MUESTRAS DE LA LAGUNA AMARILLA													
MUESTRA	CATALASA	OXIDASA	TSI				SIM			CITRATO	UREA	MANITOL	MCCONKEY
			GLUCOSA	LACTOSA	H2S	GAS	H2S	INDOL	MOVILIDAD				
AN31 10 ⁻³	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AN41 10 ⁻³	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
AN51 10 ⁻³	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AN52 10 ⁻³	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
AN71 10 ⁻⁴	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
AN81 10 ⁻³	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
AN81 10 ⁻⁴	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
AN82 10 ⁻⁴	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
AN83 10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
AN84 10 ⁻³	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Los resultados obtenidos en la tabla 4-29 sugieren que los clones aislados podrían pertenecer a varios géneros bacterianos, como *Psychobacter*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Janthinobacter*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Shigella* o *Serratia*. Estos géneros son similares a los identificados por Moreno (2017, p. 47-48). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el interior de los lagos oligotróficos de agua dulce es un área poco explorada y es raro encontrar estudios que describan la diversidad genética en estos ambientes debido a la versatilidad de los microorganismos. Además, los factores ambientales tienen un impacto significativo en las comunidades microbianas, ya que los microorganismos deben adaptarse a estos cambios o pueden experimentar alteraciones pronunciadas. Esto se debe al alto potencial genómico de los microorganismos, que les permite almacenar cambios en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Moreno, 2017, p. 47-48).

4.4. Configuración de las Celdas de Combustible Microbiana

4.4.1. Beneficios de usar CCM

Las CCM se destacan en comparación con otros sistemas de generación de energía debido a varias razones. En primer lugar, poseen la capacidad de funcionar de manera eficiente tanto a temperatura ambiente como a bajas temperaturas, lo cual es una ventaja significativa. Además, estas celdas generan una menor cantidad de CO₂, lo que las convierte en una opción más sostenible desde una perspectiva medioambiental.

El potencial de estos dispositivos es enorme y ha generado grandes expectativas en la comunidad científica. Diversas investigaciones han demostrado su efectividad en la producción de energía limpia al aprovechar la biomasa presente en aguas residuales, tanto domésticas como industriales (Revelo et al., 2013, pp. 17-28).

Las aplicaciones de las CCM son extremadamente diversas. Por ejemplo, se han utilizado exitosamente para la eliminación de contaminantes en diversas fuentes naturales, como lagos, sedimentos marinos y efluentes de aguas residuales. Esto ejemplifica la versatilidad de las CCM, ya que son capaces de operar en diferentes entornos y presentan ventajas funcionales y operativas en comparación con otras tecnologías disponibles (Cárdenas et al., 2022, pp. 3-10).

4.4.2. Funcionamiento

Las celdas de combustible microbiana son dispositivos en los que los microorganismos se encargan de convertir la energía química de un sustrato en energía eléctrica. Algunos investigadores han explorado combinaciones específicas de diferentes factores que afectan el rendimiento eléctrico de una celda de combustible microbiana (CCM) y han analizado el comportamiento de las variables involucradas. Sin embargo, lograr una condición óptima que produzca los mejores resultados es extremadamente desafiante y complicado (Revelo et al., 2013, pp. 17-28).

El funcionamiento de las celdas de combustible microbiana es simple. En estas celdas, los microorganismos electroquímicamente activos se adhieren al ánodo, que es el electrodo principal. Allí, estos microorganismos degradan la materia orgánica y transfieren electrones al ánodo. Los electrones viajan desde el ánodo al cátodo, otro electrodo, a través de un circuito eléctrico, lo que genera un flujo de electrones y, por ende, energía eléctrica (Cárdenas et al., 2022, pp. 3-10).

Simultáneamente, los microorganismos liberan protones, partículas con carga eléctrica positiva. Estos protones migran desde la cámara anódica hacia la cámara catódica a través de una membrana selectiva. En la cámara catódica, los electrones, protones y oxígeno se combinan para formar agua. Es importante mencionar que las celdas de combustible microbiana pueden clasificarse según su configuración y la separación entre los electrodos, ya sea como celdas de una o dos cámaras (Palanisamy et al., 2019, pp. 598-561).

El proceso involucrado es altamente complejo, ya que implica una secuencia de reacciones de oxidación de la materia orgánica presente en el sustrato, llevadas a cabo por los microorganismos. Durante este proceso, se generan electrones y protones en proporciones proporcionales. A través de la biopelícula presente en el circuito eléctrico de la cámara, los electrones son extraídos mientras que los protones se desplazan fuera de la biopelícula en dirección al cátodo. Por lo tanto, los electrones producidos se encuentran en la superficie celular externa, a la espera de un aceptor final (Guambo et al., 2021, pp. 1-24).

4.4.3. Configuración de las CCM

A lo largo del tiempo, se han desarrollado diversas configuraciones de celdas de combustible microbiana (CCM), que incluyen celdas de doble cámara, celdas de cámara única, celdas tubulares, celdas de placa y celdas apiladas (Vidal y Zambrano, 2021, pp. 42-43).

En las celdas de combustible microbiana de una sola cámara, el ánodo y el cátodo se encuentran ubicados en un único compartimento, típicamente separados por una membrana de intercambio de protones. Esta configuración permite una proximidad entre los componentes de la celda, lo cual conduce a una disminución en la resistencia óhmica y un incremento en la densidad de potencia (Sengodan y Hays, 2012, pp. 1-19).

En este estudio, se utilizó la configuración de una sola cámara, que es ampliamente empleada debido a su mayor eficiencia energética y su menor costo. Esta configuración elimina la necesidad de sumergir el cátodo en agua y no requiere la separación de los compartimentos anódico y catódico cuando se utiliza oxígeno como aceptor de electrones. En cambio, el compartimento del cátodo puede estar en contacto directo con el aire, lo cual simplifica el diseño y reduce la complejidad del sistema (Ramírez et al., 2010, pp. 65-71).

4.4.4. Estructura de las CCM

Según Castro (2019, pp. 1-98), las celdas de combustible microbiana (CCM) pueden construirse utilizando acrílico o vidrio, ya que ambos materiales actúan como aislantes con baja movilidad de cargas eléctricas. En este estudio, se optó por utilizar vidrio debido a su menor costo. Se construyó una celda de combustión microbiana sedimentaria (CCSM), también conocida como celda bentónica, con el propósito de degradar los sustratos o sedimentos presentes en el suelo o en los sedimentos para generar electricidad (Farias, 2016, pp. 1-124).

De acuerdo con Rivas (2022, pp. 3-77), es importante considerar las distancias entre los electrodos en celdas de mayor volumen, ya que esto puede limitar el flujo de electrones entre los compartimentos y afectar la generación de bioelectricidad. Para evitar este problema, se construyeron seis celdas de menor tamaño con forma redonda. Cada celda tenía un área de 176.71 cm² y una altura de 6.5 cm, con un volumen de 250 ml. Se introdujeron 400 gramos de muestra sedimentaria de las lagunas en cada celda. En la parte superior de cada celda, se utilizó una membrana de captación de electrones hecha de fibra de tejido de carbono. Esta membrana se colocó de manera expuesta al aire, siguiendo las recomendaciones propuestas por Guambo et al. (2021, pp. 1-24).

Durante la construcción de las celdas bentónicas, estas se sumergen en agua, en nuestro caso, utilizamos agua destilada. La celda se colocó dentro de un recipiente de plástico con dimensiones de 10 cm x10 cm y una altura de 13 cm, con el objetivo de asegurar que la celda quedara completamente cubierta por el agua introducida.

4.4.5. Electrodo

Los electrodos son componentes esenciales que influyen en el rendimiento y el costo de las celdas de combustible microbiana (CCM). Independientemente del tipo de electrodo, es fundamental que el material base sea un buen conductor eléctrico, posea una alta estabilidad química y preferentemente sea de bajo costo y resistente a esfuerzos mecánicos. Entre los materiales más comúnmente utilizados se encuentran el carbón y ciertos metales no corrosivos como el acero inoxidable, ya que cumplen con estas características (Castro, 2019, pp. 2-98).

4.4.6. Ánodo

El carbono se destaca como el material preferido para el ánodo en las celdas de combustible microbiana debido a su excelente conductividad eléctrica, biocompatibilidad, estabilidad química y costo reducido en comparación con otros tipos de ánodos (Farias, 2016, pp. 1-124). Con el objetivo de mejorar la producción de energía, se han realizado modificaciones tanto físicas como químicas en el ánodo. En el contexto de esta tesis, se aplicó un tratamiento químico específico al ánodo, el cual se detalla en el Capítulo II.

4.4.7. Cátodo

En general, muchos de los materiales utilizados como ánodos también se emplean como base para los electrodos catódicos (Farias, 2016, pp. 1-124). Es importante destacar que el material del cátodo tiene un impacto significativo en el rendimiento de la producción de energía, por lo que debe cumplir con características similares al ánodo. Asimismo, el material del cátodo debe promover la reacción energética adecuada. Por esta razón, se han realizado numerosos estudios y modificaciones en materiales como el carbón y el carbón vítreo (Montenegro et al., 2019).

4.4.8. Inoculo

Para el inoculante de las celdas de combustible microbiana (CCM), se puede optar por utilizar cultivos puros de una sola especie microbiana o cultivos mixtos, conocidos como consorcios microbianos. En este caso, se eligió utilizar un cultivo mixto debido a su amplia aplicación y beneficios, como la generación de altos potenciales y un manejo más económico y menos exigente en comparación con los cultivos puros (Farias, 2016, pp. 1-124). Se recolectaron sedimentos de diferentes ubicaciones tanto en la laguna Quilotoa como en la laguna Amarilla para su utilización en las CCM.

4.5. Potencial bioenergético

4.5.1. Registro de voltaje

Se realizaron pruebas de ensayo utilizando un total de 6 celdas de combustible microbiana (CCM), divididas en 3 con cultivo mixto de la laguna Quilotoa y 3 con cultivo mixto de la laguna Amarilla. Durante un periodo de 22 días, se registraron automáticamente valores de voltaje cada minuto, generando un total de 30,241 datos por cada CCM. Estos datos fueron agrupados y se calculó el

promedio en ciclos de 24 horas. En las tablas 4-30 y 4-31 se presentan los datos obtenidos en detalle.

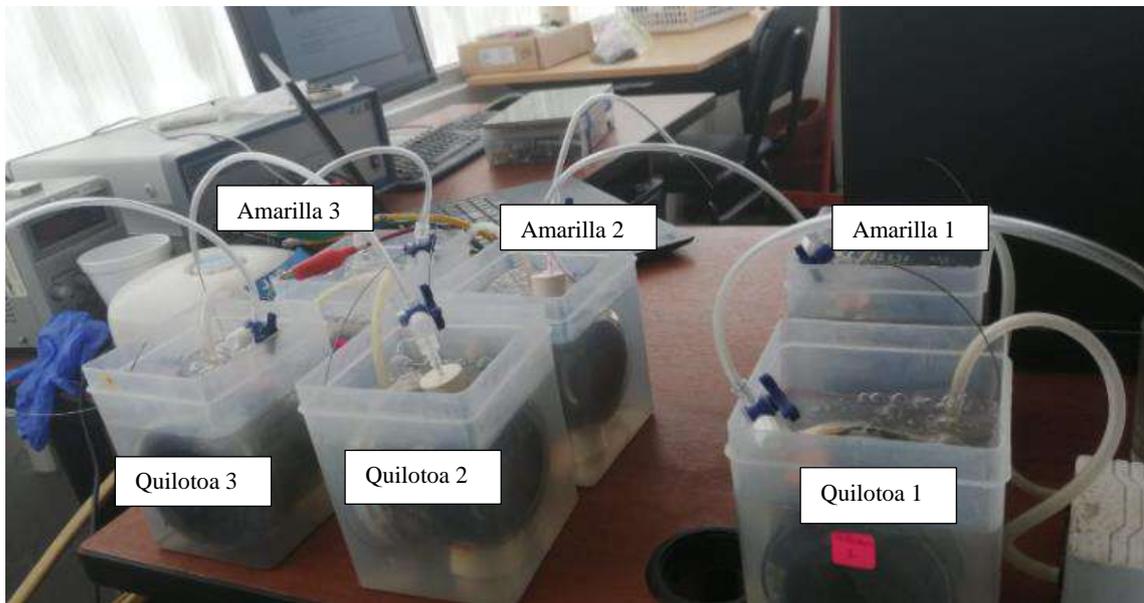


Ilustración 4-3: CCM con sedimentos de la laguna Quilotoa y Amarilla

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-30: Promedio de voltaje por día para CCM laguna de Quilotoa

Día de monitoreo	Quilotoa 1 (Q1)	Quilotoa 2 (Q2)	Quilotoa 3 (Q3)
1	0,497	0,505	0,500
2	0,502	0,500	0,499
3	0,503	0,501	0,502
4	0,500	0,500	0,498
5	0,498	0,501	0,498
6	0,499	0,501	0,501
7	0,497	0,497	0,501
8	0,503	0,499	0,500
9	0,498	0,499	0,500
10	0,500	0,501	0,502
11	0,500	0,499	0,501
12	0,500	0,499	0,500
13	0,501	0,501	0,501
14	0,500	0,497	0,501
15	0,499	0,499	0,498

16	0,501	0,500	0,500
17	0,498	0,500	0,500
18	0,499	0,502	0,500
19	0,500	0,498	0,501
20	0,500	0,499	0,500
21	0,498	0,499	0,502
22	0,504	0,498	0,499

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

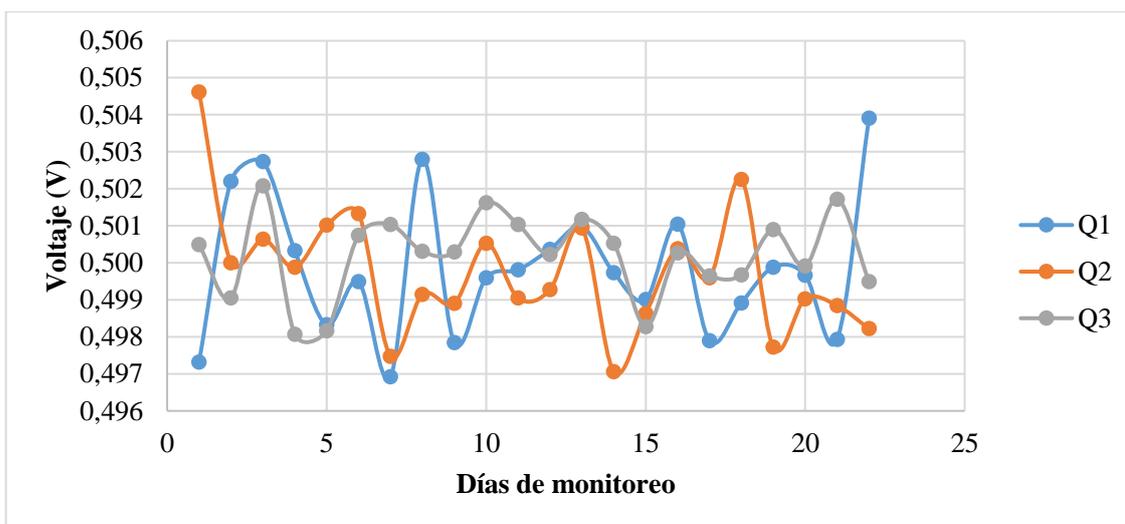


Ilustración 4-4: Voltaje generados por las CCM con sedimentos de la laguna Quilotoa

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

La ilustración 4-4 muestra que la celda Q1 alcanzó un pico máximo de voltaje de 0,504 V en el día 22, mientras que el pico mínimo de voltaje de esta celda se registró en el día 7 con un valor de 0,497 V. En cuanto a la celda Q2, se observó que alcanzó su pico máximo de voltaje de 0,505 V en el primer día de monitoreo, mientras que el pico más bajo de voltaje se registró en el día 14 con 0,497 V. Por su parte, la celda Q3 mostró su pico máximo de voltaje en el día 3 con un valor de 0,502 V, y el valor mínimo de voltaje se obtuvo en el día 4 con 0,498 V. A lo largo del período de monitoreo, las tres celdas presentaron fluctuaciones en el voltaje, con valores que variaron entre 0,497 y 0,505 V. Estas fluctuaciones de voltaje, según Guamán (2022, p. 46), podrían estar relacionadas con la actividad microbiana en la biopelícula anódica, donde intervienen tanto las bacterias electrogénicas como las bacterias nativas del sustrato utilizado.

Tabla 4-31: Promedio de voltaje por día para CCM de laguna Amarilla

Día de monitoreo	Amarilla 1 (A1)	Amarilla 2 (A2)	Amarilla 3 (A3)
1	0,295	0,295	0,295
2	0,295	0,293	0,293
3	0,290	0,269	0,289
4	0,286	0,285	0,275
5	0,284	0,281	0,281
6	0,285	0,296	0,276
7	0,275	0,282	0,262
8	0,251	0,278	0,277
9	0,277	0,254	0,253
10	0,253	0,289	0,259
11	0,250	0,275	0,245
12	0,246	0,271	0,261
13	0,232	0,247	0,246
14	0,258	0,253	0,232
15	0,234	0,248	0,238
16	0,201	0,244	0,213
17	0,197	0,240	0,229
18	0,193	0,196	0,205
19	0,179	0,201	0,181
20	0,195	0,197	0,196
21	0,152	0,161	0,182
22	0,142	0,163	0,162

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

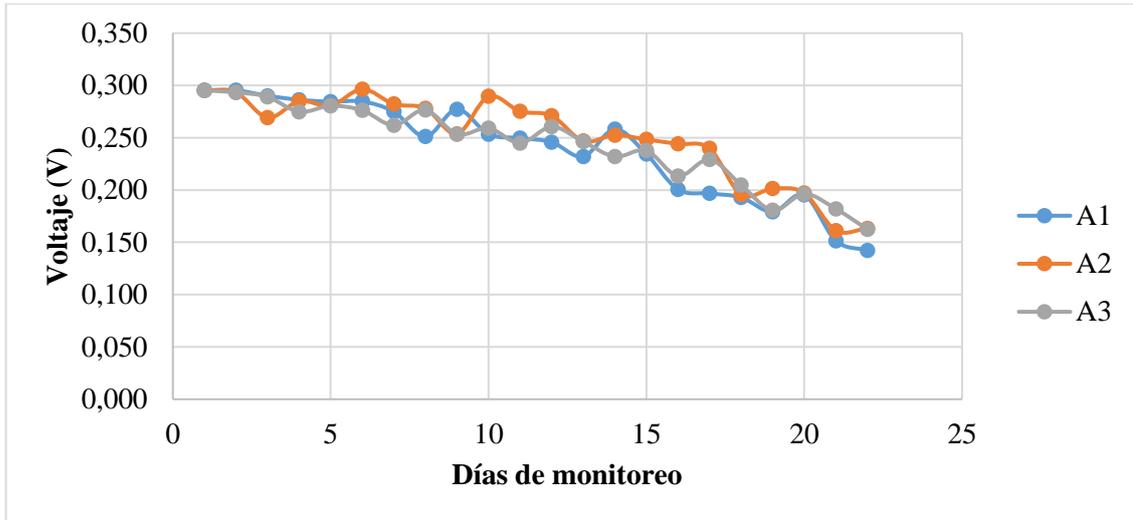


Ilustración 4-5: Voltaje generados por las CCM con sedimentos de la laguna Amarilla

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

A partir de la Ilustración 4-5, se puede observar que todas las celdas (A1, A2 y A3) alcanzaron su pico máximo de voltaje en el primer día de monitoreo, con un valor de 0,295 V. Por otro lado, el pico mínimo de voltaje se registró en diferentes días para cada celda. Para las celdas A1 y A3, el día 22 fue cuando se obtuvo el valor más bajo de voltaje, con 0,142 V y 0,162 V respectivamente. En cambio, la celda A2 mostró su pico mínimo de voltaje en el día 21, con un valor de 0,161 V.

4.5.1.1. Comparación de las CCM

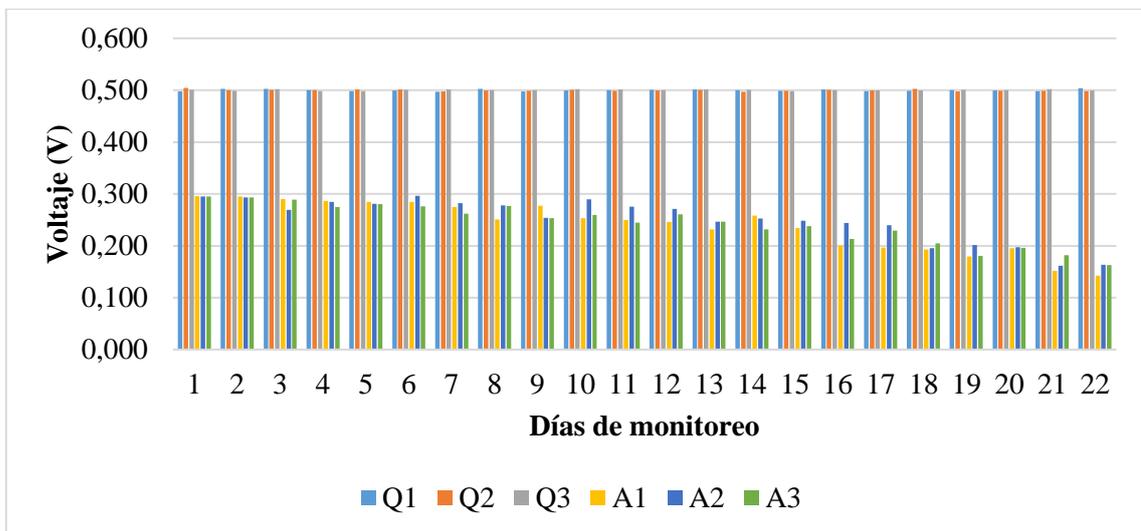


Ilustración 4-6: Comparación de los voltajes generados por las CCM con sedimentos de la laguna Quilotoa y Amarilla

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Al realizar la comparación de todas las celdas de estudio según se muestra en la Ilustración 4-6, se puede observar una clara diferencia en los valores de voltaje obtenidos. Las celdas microbianas de combustión con inóculo proveniente de la laguna Quilotoa exhibieron un valor máximo de voltaje significativamente más alto, alcanzando 0,500 V. Por otro lado, las celdas microbianas de combustión con inóculo proveniente de la laguna Amarilla mostraron un valor máximo de voltaje mucho más bajo, con tan solo 0,295 V. Esta disparidad en los resultados destaca la influencia del origen del inóculo en el rendimiento de las celdas de combustible microbiana.

Las celdas de combustión microbiana son sistemas termodinámicos abiertos que interactúan con su entorno y operan mediante reacciones electroquímicas, utilizando reactivos provenientes de una fuente externa (Alvarado et al, 2019, pp. 242-259). Estas celdas pueden funcionar a diferentes temperaturas, como altas, medias y bajas, y se ha observado que las celdas de baja temperatura ofrecen ventajas significativas en el proceso de generación de electricidad (De la Torre Valdés et al., 2016, pp. 228-238). La temperatura desempeña un papel crucial en el rendimiento de las celdas, ya que influye en la cinética de las reacciones y en la conductividad del sistema. Es importante destacar que las bacterias presentes en estas celdas son adaptadas a bajas temperaturas, siendo capaces de crecer y producir energía de manera óptima en un rango de temperatura de 4 a 20 °C. Esta adaptación a temperaturas más frías favorece una mayor eficiencia en la producción de energía y estabilización de las reacciones cinéticas.

4.5.2. *Curvas de polarización*

Para la realización de la curva de polarización se empleó un potenciómetro, el cual es un dispositivo que permite medir la diferencia de potencial eléctrico, es decir, el voltaje, entre dos terminales. El potenciómetro está compuesto por una resistencia variable en sus extremos y un control deslizante que se desplaza a lo largo de esta resistencia.

Tabla 4-32: Parámetro del instrumento

Potencial del circuito abierto	Q1	0,051457 V
	Q2	0,004063 V
	Q3	0.13317 V
	A1	0,051457 V
	A2	-0,038999 V
	A3	0.1148 V
Alcance actual		200µA
V. Rango		± 2.5 V

Modo de polarización	Potenciostática
Modo tierra	Virtual
Datos fluidos	Abierto

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

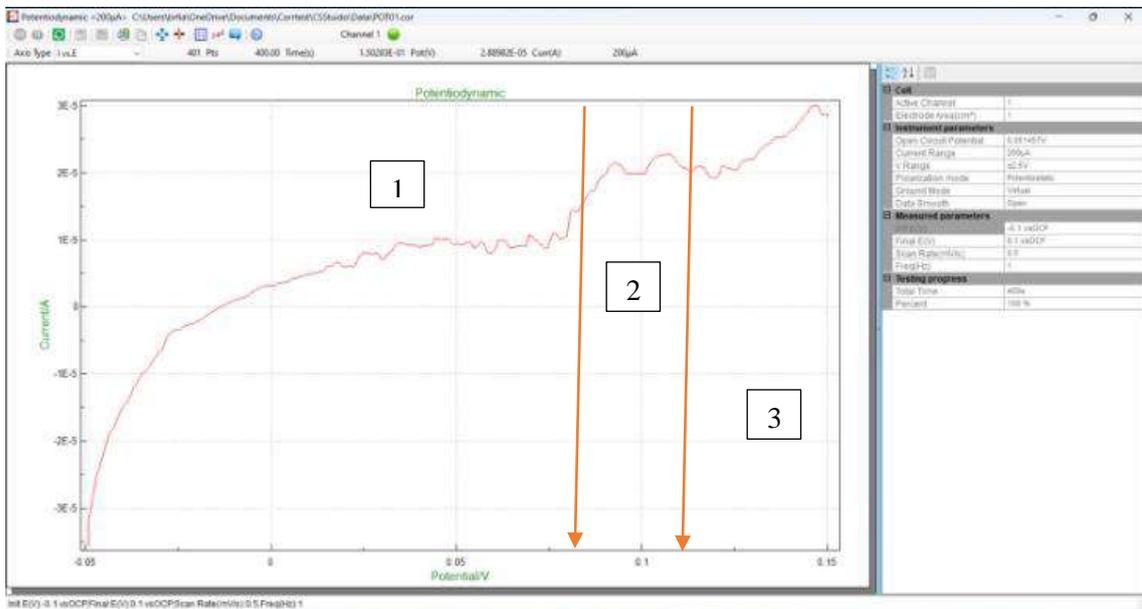


Ilustración 4-7: Polarización de la CCM Quilotoa 1

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

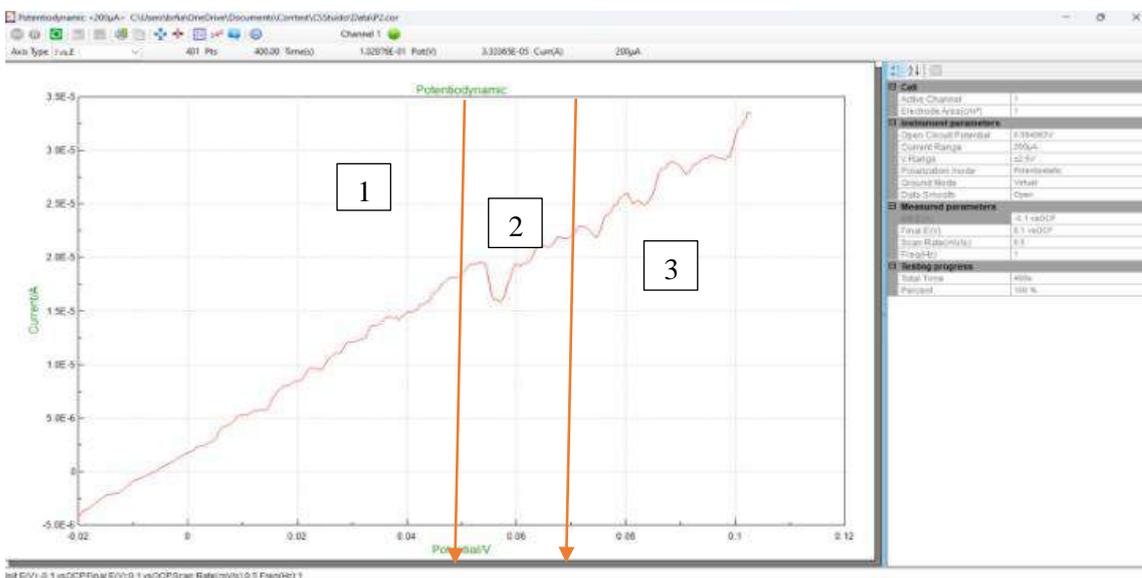


Ilustración 4-8: Polarización de la CCM Quilotoa 2

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

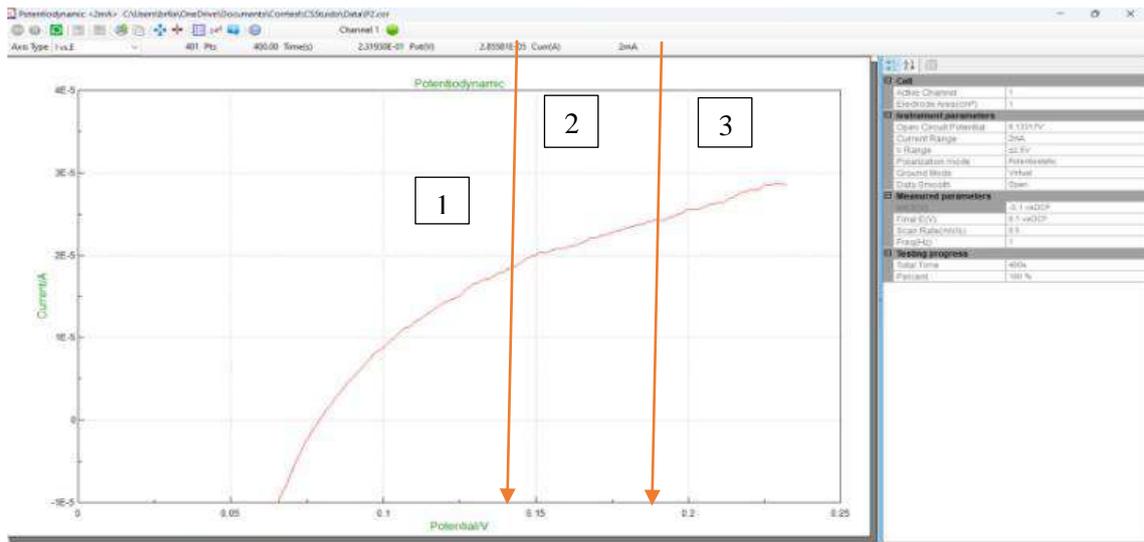


Ilustración 4-9: Polarización de la CCM Quiltoa 3

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

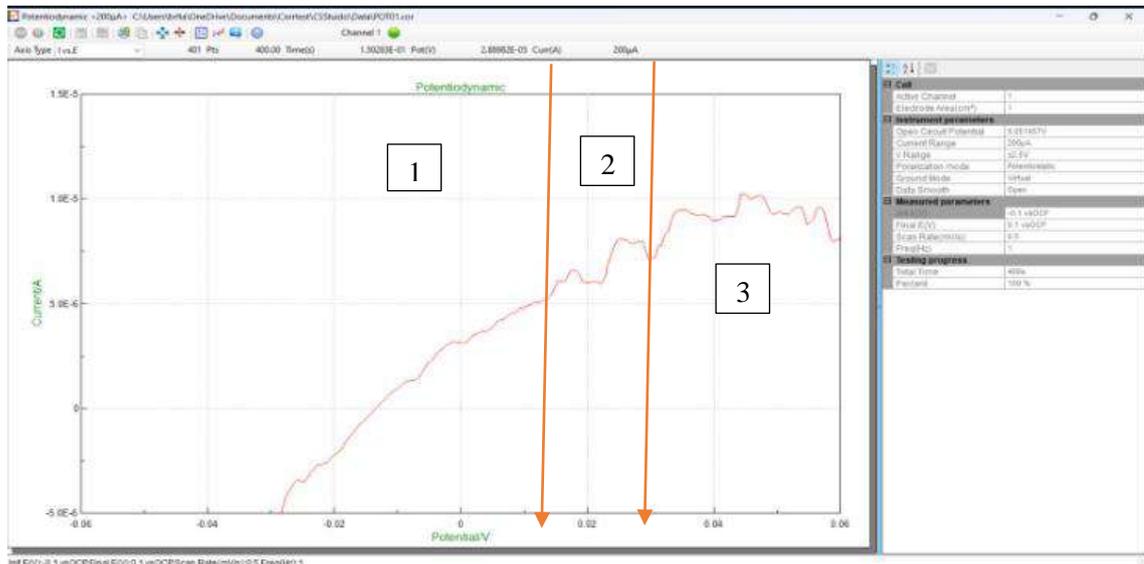


Ilustración 4-10: Polarización de la CCM Amarilla 1

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

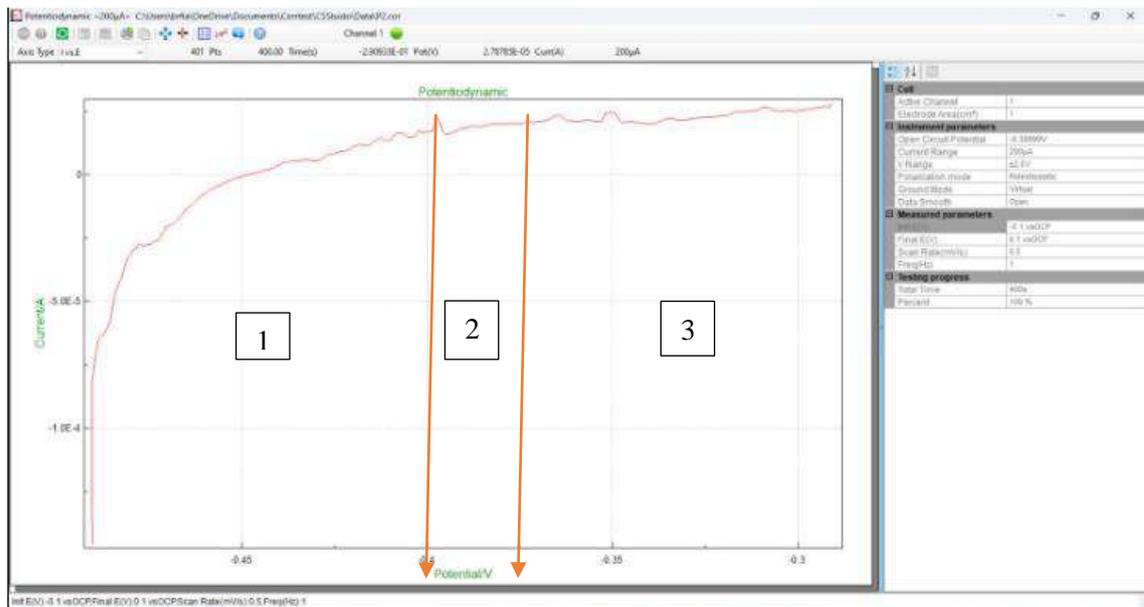


Ilustración 4-11: Polarización de la CCM Amarilla 2

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.



Ilustración 4-12: Polarización de la CCM Amarilla 3

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Las ilustraciones generadas por el potenciómetro muestran tres zonas distintas, las cuales se han asociado con las fases de crecimiento de las bacterias. La zona 1, también conocida como zona óhmica, se caracteriza por seguir la ley de Ohm, que establece que la corriente eléctrica es directamente proporcional a la diferencia de potencial aplicada e inversamente proporcional a la resistencia. En otras palabras, a medida que aumenta el potencial aplicado, se incrementa el flujo de corriente a través de las membranas de intercambio (Torres Rodríguez et al. 2019, p.6; Macías García et al. 2018, pp. 1-6).

La zona 2, conocida también como pseudomeseta, se puede identificar en las gráficas del potenciómetro debido a que en esta región la corriente eléctrica se vuelve independiente del potencial aplicado. Esta particularidad se debe a que cerca de la membrana de intercambio, los iones comienzan a agotarse, lo que provoca un incremento notable en la resistencia. A pesar de ello, la corriente continúa aumentando en conjunto con el potencial debido a la presencia de iones generados por procesos como la descomposición del agua, que produce iones H^+ y OH^- , y también debido a fenómenos como la convección gravitacional y la electroconvección. Estos mecanismos compensan la ausencia de portadores de carga y permiten que la corriente siga fluyendo a pesar del incremento en la resistencia (Torres Rodríguez et al., 2019, p.6).

La zona 3, también conocida como región de electroconvección, se refiere a un proceso complejo de transporte de iones que está dominado por fuerzas coulombicas generadas por las cargas eléctricas locales. En esta región, se observa una relación lineal entre la corriente y el potencial aplicado. Durante este proceso, los electrones atraviesan los poros de la membrana, moviéndose no solo de manera perpendicular a la superficie de la membrana, sino también tangencialmente. Esto se debe a que la superficie de la membrana presenta una textura rugosa y heterogénea, lo que conlleva a la destrucción y regeneración de la capa de difusión de los iones en la membrana (Grinbank, sf.) (Torres Rodríguez et al. 2019, p.6).

4.5.3. Bacterias electrogénicas

Después de llevar a cabo los ensayos en las celdas de combustible microbiana, se procedió a realizar la siembra de los microorganismos resistentes presentes en dichas celdas. Posteriormente, se llevó a cabo una comparación morfológica y fenotípica de las bacterias obtenidas. Como resultado de este análisis, se identificaron posibles géneros bacterianos pertenecientes a los sedimentos de las lagunas Quilotoa y Amarilla, los cuales demostraron la capacidad de generar energía eléctrica a partir de energía química. Algunos de los géneros identificados incluyen *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Proteus*. Estos hallazgos sugieren el potencial de estas bacterias como agentes productores de energía en sistemas de combustible microbiano.

Según Argoti (2019, p. 55), se ha observado en el contexto de una Célula de Combustible Microbiana (CCM) que emplear cultivos mixtos puede resultar beneficioso debido a una menor exigencia de requisitos, lo cual puede llevar a la generación de altos potenciales bioeléctricos. Entre los géneros bacterianos más frecuentes se encuentran *Shewanella*, *Geobacter*, *Proteobacter*

y *Pseudomonas*, siendo notable la presencia de la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Específicamente, los mediadores redox producidos por esta bacteria pueden ser utilizados para facilitar la transferencia de electrones hacia el ánodo. Vidal y Zambrano (2021, pp. 28-29), resaltan la importancia primordial de las bacterias electroactivas pertenecientes al género *Pseudomonas* en la creación de biopelículas en la superficie del ánodo. Estas biopelículas desempeñan un papel fundamental al contribuir significativamente tanto en la generación de bioelectricidad como en la transferencia de electrones.

En contraste, Redondo (2018, pp.19-21) destaca que entre las bacterias investigadas por su capacidad de generar electricidad mediante procesos biológicos, los géneros más destacados son *Shewanella*, debido a su diversidad de aceptores finales de electrones. Además, otros estudios respaldan que los géneros bacterianos más comúnmente utilizados en celdas de combustible microbianas (MFCs, por sus siglas en inglés) son *Geobacter* spp y *Shewanella* spp (Rea, et al., 2021, p.94).

En lo que respecta a los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Proteus*, no se dispone de una cantidad significativa de información específica sobre su potencial bioeléctrico. No obstante, es importante destacar que la capacidad electrogénica puede variar entre especies e incluso dentro del mismo género.

Aunque la mayoría de los estudios sobre electrogénesis microbiana se han centrado en otros géneros bacterianos, como *Geobacter* y *Shewanella*, es posible que *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Proteus* también presenten cierto grado de capacidad electrogénica. Estos géneros pertenecen a la categoría de bacterias Gram-positivas y han sido ampliamente estudiados en otros contextos, como patógenos humanos y ambientales.

4.6. Análisis estadístico

4.6.1. Prueba de ANOVA

Una vez se verificó la normalidad de los datos, se procedió a aplicar la prueba ANOVA para determinar si al menos una de las Celdas de Combustión Microbiana (CCMs) difiere significativamente de las demás CCMs. Se estableció un nivel de significancia de 0,05 y se formularon las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula (H0): $Q1 = Q2 = Q3$

Hipótesis alternativa (H1): $Q1 \neq Q2 \neq Q3$

Hipótesis nula (H0): $A1 = A2 = A3$

Hipótesis alternativa (H1): $A1 \neq A2 \neq A3$

Hipótesis nula (H0): $Q1 = Q2 = Q3 = A1 = A2 = A3$

Hipótesis alternativa (H1): $Q1 \neq Q2 \neq Q3 \neq A1 \neq A2 \neq A3$

Para aceptar la hipótesis nula (H0), el valor de probabilidad debe ser mayor que el nivel de significancia. En caso contrario, se rechaza la hipótesis nula (H0) y se acepta la hipótesis alternativa (H1).

Tabla 4-33: Prueba ANOVA para CCM Quilotoa

ANOVA de un factor

Quilotoa

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,000	2	,000	,368	,694
Intra-grupos	,000	63	,000		
Total	,000	65			

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Tabla 4-34: Prueba ANOVA para CCM Amarilla

ANOVA de un factor

Amarilla

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,001	2	,001	,397	,674
Intra-grupos	,116	63	,002		
Total	,117	65			

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Los resultados obtenidos de las tablas 4-33 y 4-34 indican que la hipótesis nula es aceptada tanto para las Celdas de Combustión Microbiana (CCM) con sedimentos de la laguna de Quilotoa como para aquellas con sedimentos de la Laguna Amarilla. Esto implica que, al presentar un valor de

significancia superior a 0,05, se concluye que no hay una diferencia significativa entre las medias de las variables analizadas.

4.6.1.1. ANOVA CCM Quilotoa vs Amarilla

Dado que no se encontraron disparidades significativas entre los grupos de la laguna de Quilotoa (Q1, Q2, Q3) y la laguna Amarilla (A1, A2, A3), se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar si existía una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de estos dos tipos de Celdas de Combustión Microbiana (CCM).

Tabla 4-35: Prueba ANOVA para CCM Quilotoa y Amarilla

ANOVA de un factor

Quilotoa_Amarilla

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,154	5	,431	469,132	,000
Intra-grupos	,116	126	,001		
Total	2,270	131			

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Al examinar la tabla 4-35, se evidencia que el valor de significancia (Sig.) es menor a 0,05. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, lo cual indica que al menos uno de los grupos difiere de los demás. Por lo tanto, se puede afirmar que existe una diferencia significativa entre los grupos analizados.

4.6.2. Prueba de Tukey

Tabla 4-36: Prueba Tukey para CCM Quilotoa y Amarilla

Tukey Quilotoa_Amarilla

HSD de Tukey^a

Quilotoa	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
A1	22	,23955	
A3	22	,24318	

A2	22	,25082	
Q2	22		,49977
Q1	22		,49986
Q3	22		,50018
Sig.		,820	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 22,000.

Realizado por: Freire, T.; Gallo, M., 2023.

Al analizar los resultados de la prueba de Tukey (tabla 4-36), se puede confirmar que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las Celdas de Combustión Microbiana (CCM) de la laguna de Quilotoa y la laguna Amarilla. Sin embargo, al comparar las CCM de Quilotoa con las de Amarilla, se observa una diferencia significativa. Es importante resaltar que todos los grupos de CCM de Quilotoa difieren de los grupos de CCM de Amarilla.

Adicionalmente, se encontró que los valores de voltaje en las CCM de Amarilla son inferiores en comparación con las de Quilotoa. Específicamente, la CCM A1 tiene el valor más bajo con una media de 0,23955 V, mientras que la CCM Q3 tiene el valor más alto de voltaje con una media de 0,50018 V.

CONCLUSIONES

El análisis fisicoquímico de los sedimentos en las lagunas Quilotoa y Amarilla, reveló una amplia variedad de características y propiedades distintivas. En el caso de la laguna Quilotoa, se observó una diversidad en las tonalidades y texturas de los sedimentos, además de obtener valores específicos para diferentes parámetros. Entre ellos, se registraron una conductividad eléctrica de 333,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$, una salinidad de 316,5 ppm, un pH de 8,43 y diversos componentes químicos. Por otro lado, en la laguna Amarilla se destacó la presencia de sedimentos de color oscuro y textura gruesa, y se obtuvieron valores específicos de conductividad eléctrica de 55,81 $\mu\text{S}/\text{cm}$, salinidad de 62,28 ppm, pH de 8,36 y otros componentes químicos.

Mediante las pruebas fenotípicas realizadas en las muestras de sedimentos de las lagunas Quilotoa y Amarilla, se logró caracterizar diversas cepas bacterianas, revelando una destacada diversidad biológica en ambos ecosistemas. En la laguna Quilotoa, se encontró una mayor presencia de microorganismos extremófilos adaptados a bajas temperaturas, mientras que en la laguna Amarilla se observó una mayor diversidad y abundancia microbiana a temperaturas más altas. Además, se identificaron distintos tipos de bacterias con características morfológicas únicas en ambas lagunas, indicando una diversidad bacteriana significativa en los sedimentos. Estos resultados proveen información valiosa sobre la estructura y diversidad biológica del microbiota en estos entornos acuáticos, contribuyendo al conocimiento de la microbiología ambiental y su adaptación a diferentes condiciones medioambientales.

Tras llevar a cabo una exhaustiva revisión bibliográfica, se determinó que la elección de una configuración redonda de una sola cámara para las celdas microbianas de combustible fue la más adecuada. Esta configuración se caracterizó por evitar la entrada de aire en la cámara catódica y reducir las pérdidas óhmicas, lo que permitió optimizar el rendimiento del sistema.

Los resultados obtenidos revelaron que las celdas con cultivo mixto de la laguna Quilotoa alcanzaron un valor máximo de voltaje de 0,505 V, mientras que las celdas con cultivo mixto de la laguna Amarilla obtuvieron un valor máximo de voltaje de 0,295 V. Estas diferencias significativas en los valores de voltaje indican un mayor rendimiento bioenergético en las bacterias provenientes de la laguna Quilotoa. Los hallazgos de este estudio respaldan la importancia del origen del inóculo bacteriano en la generación de energía eléctrica en celdas de combustible microbiana y destacan el potencial de las bacterias identificadas en los sedimentos de ambas lagunas como agentes productores de energía.

RECOMENDACIONES

Se sugiere proseguir con la investigación y aislamiento de microorganismos en áreas previamente no exploradas, con el propósito de descubrir especies novedosas que complementen los estudios existentes.

Se recomienda realizar pruebas de identificación bacteriana utilizando métodos moleculares, ya que esto permitirá obtener resultados más precisos y detallados. Estos métodos, como la secuenciación de genes específicos o la amplificación de ADN, ofrecen una mayor resolución en la identificación de bacterias, lo que contribuirá a una mejor caracterización y comprensión de la diversidad microbiana en las muestras analizadas.

Se sugiere explorar nuevas configuraciones de celdas de combustible que optimicen la captación de electrones en la cámara anódica, con el objetivo de aumentar la generación de bioelectricidad.

Se recomienda explorar la utilización de diferentes sustratos, como aguas residuales o residuos sintéticos, como fuente de alimentación para las celdas de combustible microbianas (CCM). Estos sustratos son atractivos debido a su alto contenido de materia orgánica, la cual puede ser aprovechada por las CCM para la generación de energía bioquímica.

BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, A. Evaluación limnológica y microbiológica de la Laguna del Quilotoa, provincia de Cotopaxi – Ecuador [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Universidad Central del Ecuador, Carrera de Ingeniería, Quito, Ecuador. 2022. pp. 1-158. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/25227>

ALVARADO FLORES, J.J.; et al. *Celdas De Combustible Como Elementos Potenciadores Para Un Desarrollo Energético Sustentable*. Volumen Ii De La Colección: Regiones, Desplazamientos Y Geopolítica. Agenda Pública Para El Desarrollo Territorial. 2019. pp. 242-259.

ARGOTI, Ana. Identificación de microorganismos de suelo de páramo alto andino potencialmente electrogénicos para producir bioelectricidad [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador. 2019. pp. 1-94. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/13273>

BAIRES. Los parámetros más importantes en la caracterización del agua. [en línea]. 2023. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <https://www.bairesanalitica.com/los-parametros-mas-importantes-en-la-caracterizacion-del-agua--news--5-11>

BARRANCO, C.; et al. “Bacterias heterótrofas del agua de lagunas de alta montaña de los Andes Venezolanos”. *Revista portuguesa de Farmacia, Suplemento especial*, LII, n°5(2011), p.40.

BASAK B.; et al. “Enhanced biodegradation of 4-chlorophenol by *Candida tropicalis* PHB5 via optimization of physicochemical parameters using Taguchi orthogonal array approach”. *Int Biodeter Biodegrad* [en línea], 2013;78(1), pp.17–23. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: doi: 10.1016/j.ibiod.2012.12.005.

BENJUMEA, C.; & ÁLVAREZ, G. “Demanda de oxígeno por sedimentos en diferentes tramos del río Negro Rionegro, Antioquia, Colombia”. *Producción + Limpia* [en línea], 2017, 12(2), pp. 131-146. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: DOI: 10.22507/pml.v12n2a11

BISANG, R.; et al. *Biotecnología y desarrollo* [en línea]. Chile: CEPAL. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en:

https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/3650/S2009064_es.pdf?sequence=1&isAllowed=y

BRAVO, D.; et al. “Microbiota bacteriana viable cultivable del agua de lagunas de alta montaña en los Andes Venezolanos”. *Revista Hechos en Microbiología*, Vol. 5, n°2 (2014), p. 80.

CÁRDENAS, A.; et al. “Celdas de combustible microbiano como alternativa para el tratamiento de aguas residuales”. *Ciencia y Tecnología* [en línea], 26(76), 2022, pp. 3-10. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas76/T76_E01_celdas_combustible_microbiano_aguas_residuales.pdf

CASTRO, F. Determinación del efecto del tipo de electrodo sobre las características de funcionamiento de una celda de combustible microbiana para la producción de energía eléctrica [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Ecuador. 2019. pp. 1-98. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/17287>

CHACÓN, Q. Tratamiento de aguas residuales y producción de hidrógeno con un sistema bioelectroquímico asistido con dos diferentes membranas [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Centro de Investigación en Materiales Avanzados Departamento de Estudios de Posgrado. Chihuahua, México. 2018. pp. 1-83. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/2132/1/TESIS%20FINAL.pdf>

CONDORI, A.; & TORRES, G. Biodegradación de la materia orgánica y producción de Bioelectricidad en Celdas de Combustible Microbiano (CCM) a partir del agua residual doméstica – Lima [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Universidad Peruana Unión, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Lima. 2019. pp. 1-305. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: https://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12840/1655/Aracel_Tesis_Licenciatura_2019.pdf?sequence=4&isAllowed=y

DECRETO EJECUTIVO 3516. *Texto Unificado De Legislación Secundaria De Medio Ambiente.*

DECRETO EJECUTIVO 752. *Reglamento Al Código Orgánico Del Ambiente.*

DE LA TORRE VALDÉS, R.; et al. "Análisis de los parámetros de funcionamiento de una celda Operating parameters analysis of a solid oxide regenerative fuel cell using modeling techniques". *Ingeniería Energética*, vol. 38, no. 3(2016), pp. 228-238.

DEMERGASSO, C.; et al. "Prokaryotic diversity pattern in high-altitude ecosystems of the Chilean Altiplano". *J. Geophy. Res*, Vol. 115, n°1(2010), pp 2-14.

ESCOBAR, S.; et al. "Calidad fisicoquímica del agua de la laguna Colta. Chimborazo, Ecuador". *FIGEMPA Investigación y Desarrollo* [En línea], 2021, 1(1), pp. 76-81. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: doi: 10.29166/revfig.v1i1.3135

EZGI, H. Pilas de combustible microbianas. *Libretexts* [en línea]. 2017. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: [https://espanol.libretexts.org/Ingenieria/Ingeniería_Biológica/Combustibles_alternativos_a_partir_de_fuentes_de_biomasa_\(Toraman\)/12%3A_Procesos_Adicionales_para_Combustibles_a_partir_de_Biomasa/12.03%3A_Pilas_de_combustible_microbianas](https://espanol.libretexts.org/Ingenieria/Ingeniería_Biológica/Combustibles_alternativos_a_partir_de_fuentes_de_biomasa_(Toraman)/12%3A_Procesos_Adicionales_para_Combustibles_a_partir_de_Biomasa/12.03%3A_Pilas_de_combustible_microbianas)

FARÍAS, M. "Microbial ecosystem in central Andes, extreme environments". *Springer. Switzerland*. Vol. 1, n°1 (2020). pp. 5-20.

GONZÁLEZ, M.; et al. "Physicochemical quality of the water of the Quilotoa volcanic crateric lake. Cotopaxi. Ecuador". *Rev. Perspectiva* [en línea], 2020, 21(1), pp. 71-83. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/350131491_Physicochemical_quality_of_the_water_of_the_Quilotoa_volcanic_crateric_lake_Cotopaxi_Ecuador

GONZÁLEZ, M; et al. "Calidad microbiológica del agua del lago volcánico Quilotoa". *Biological Science* [en línea], 2021, 9(1), pp. 2710-3609. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/354208026_Calidad_microbiologica_del_agua_del_lago_volcanico_Quilotoa_Cotopaxi-Ecuador_Microbiological_quality_of_water_of_the_Quilotoa_volcanic_lake_Cotopaxi-Ecuador

GRINBANK, S.G. DEL TRANSPORTE IÓNICO. S.l.: s.n. [sin fecha].

GUAMÁN, E. Caracterización molecular de cultivos axénicos para una aplicación electrogénica en celdas de combustible microbianas [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador. 2022. pp. 1-87. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/17635/1/236T0628.pdf>

GUAMBO, A. “Evaluación de grafeno y magnetita como membranas de intercambio de electrones en celdas de combustible microbianas con sustratos orgánicos para producir bioelectricidad”. *Ingeniería* [en línea], 2021, 13(1), pp. 1-24. [Consulta: 24 marzo 2023]. Disponible en: <https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/article/view/1942/2438>

GUERRERO, A. Pilas de combustible microbianas de agua residual. Un poco de historia. *Madrid* [en línea]. 2018. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://www.madrimasd.org/blogs/remtavares/2012/12/19/131838>

HOOVER, R.; & PIKUTA, E. “Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments”. *NASA*, Vol. 1, n° 1 (2008), pp. 1–42.

IDEAM. *Instructivo de toma y preservación de muestras sedimentos y agua superficial para la red de monitoreo de calidad del IDEAM* [en línea]. 2020. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://sgi.ideam.gov.co/documents/412030/35488871/M-S-LC-I004+INSTRUCTIVO+DE+TOMA+Y+PRESERVACIÓN+DE+MUESTRAS+SEDIMENTOS+Y+AGUA+SUPERFICIAL+PARA+LA+RED+DE+MONITOREO+DE+CALIDAD+DEL+IDEAM+v3.pdf/477bbe4a-5825-49c8-9961-10805a3c2288?version=1.0>

KRIKORIAN, A. D. *Propagación clonal in vitro. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones.* Cali, Colombia: CIAT, 1993, pp. 95 – 125.

LOGROÑO, W. Producción de bioelectricidad microbiana utilizando residuos orgánicos como sustrato, para dos casos de estudio: andes- amazonia, Ecuador [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador. 2015. pp. 1-148. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/3156>

LOGROÑO, W.; et al. Terrestrial Single Chamber Microbial Fuel Cell-based Biosensor for Biochemical Oxygen Demand of Synthetic Rice Washed Wastewater. *Sensors* [en línea], 2016,

16(1), pp. 101. [Consulta: 8 julio 2018]. 2016. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8220/16/1/101>

LÓPEZ, E. Caracterización de bacterias aisladas de la laguna negra en la provincia de Chimborazo [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador. 2016. pp. 1-78. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/14617/1/236T0525.pdf>

MACÍAS GARCÍA, M.E.; et al. *Ley de Ohm* [en línea], 2018, pp. 1-6. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <https://www.tecnologiaypedagogia.net/2019/09/ley-de-ohm.html%0Ahttp://hdl.handle.net/11285/631150>.

MALDONADO, Y. Sedimentos. *Geologiaweb* [en línea]. 2021. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <https://geologiaweb.com/rocas/sedimentos/>

MAZO, Marjorie. Identificación molecular de bacterias electrogénicas a partir de la biopelícula anódica de celdas de combustible microbiana para la producción de bioelectricidad [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador. 2019. pp. 1-81. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/14069>

MENESES, L.; & HERRERA, Y. “Bacterioplancton de tres humedales altoandinos de la cordillera Oriental de Colombia Biota Colombiana”. *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos* [en línea], 2015, 16(1), pp. 1-10. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49142418001>

MERCK. Types of Media in Microbiology. *Sigmaaldrich* [en línea]. 2020. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/technical-documents/technical-article/microbiological-testing/microbial-culture-media-preparation/types-of-media-in-microbiology>

MIRAMIRA, B.; et al. “Caracterización mineralógica y elemental de sedimentos sólidos de la laguna de Yantac, departamento de Junín, provincia de Yauli, distrito de Marcapomacocha, por difracción y fluorescencia de rayos X”. *Revistas de investigación UNMSM* [en línea], 2016, 19(38), pp. 91-96. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/view/13573/11984>

MONTENEGRO, K.; et al. “Humedales artificiales y celdas de combustibles microbianas como sistemas individuales y combinados para el tratamiento de aguas residuales”. *Info Analítica* [en línea], 2019, 7(2), pp. 15-37. [Consulta: 24 marzo 2023]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7113298>

MORENO, L. Caracterización de cepas bacterianas de la laguna amarilla perteneciente al nevado el Altar en la provincia de Chimborazo [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador. 2017. pp. 1-66. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/7877/1/236T0302.pdf>

NACIONES UNIDAS. Energías renovables: energías para un futuro más seguro. *UN* [en línea]. 2020. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://www.un.org/es/climatechange/raising-ambition/renewable-energy>

NTE INEN 2169:2013. *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras.*

NTE INEN 2176. *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo.*

OLIART-ROS, R. “Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico”. *Biotecnología y Ciencias Agropecuarias* [en línea], 2016, 2(1), pp. 79-90. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v11n1/2007-7858-cuat-11-01-00079.pdf>

PALANISAMY, G.; et al. “A comprehensive review on microbial fuel cell technologies: Processes, utilization, and advanced developments in electrodes and membranes”. *Journal of Cleaner Production*. n°221(2019), pp. 598–621.

PERALTA, C. Generación de bioelectricidad en celdas de combustible microbianas con depuración simultánea de agua residual industrial alimenticia (Trabajo de Titulación) (pregrado) Universidad Agraria del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrarias, Guayaquil, Ecuador. 2018. pp. 1-115.

PÉREZ, M.; & MOTA, M. “Morfología y estructura bacteriana”. *Revista de Actualización Clínica Investiga* [en línea], 2010, 49(1), pp. 1–9. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>

PÉREZ, S.; et al. “Revisión bibliográfica EL AGUACATERO (Persea americana Mill)”. *INCA* [en línea], 2015, 36(2), pp. 111-123. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193239249016.pdf>

RAMÍREZ, E. Potencial de Generación Eléctrica en Celdas de Combustible Microbianas con Plantas como Fuente de Energía Renovable bioelectricidad [En línea] (Trabajo de Titulación) (maestría) Universidad de la Costa, Departamento de Civil y Ambiental, Barranquilla, Colombia. 2023. pp. 1-162. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/11323/9985>

RAMÍREZ, N., A.; et al. “Espectroscopia de impedancia electroquímica, herramienta eficaz para el diagnóstico rápido microbiológico”. *Biotecnología Aplicada*, Vol.26, n°1(2009), pp. 65-71.

REA, S.; et al. “construcción y evaluación de una celda de combustible microbiana con materiales de bajo costo”. *InfoANALÍTICA NÚMERO ESPECIAL*, 2021, 1(1), pp. 91-104. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/24439/1/21%20ZURITA-CEVALLOS-BAHAMONTE%20CONSTRUCCION%20Y%20EVALUACION.pdf>

REDONDO, J. Microorganismos electrogénicos: células de combustible microbianas [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Universidad de Alcalá, Facultad de Ciencias, España. 2018. pp. 5-38. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/37227/TFG-Redondo-%20Iriarte-2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

REDONDO, J. Microorganismos electrogénicos: Células de Combustible Microbianas [en línea] (Trabajo de titulación) (Pregrado) Universidad de Alcalá, Madrid-España. 2018. pp. 12-30 [Consulta: 24 marzo 2023]. Disponible en: <https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/37227/TFG-Redondo-Iriarte2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

REGISTRO OFICIAL SUPLEMENTO 418. *Ley Orgánica Del Servicio Publico De Energía Eléctrica.*

REID, W.; et al. “The future of bioenergy”. *Global Change Biology* [en línea], 2019, 26(1), pp. 274-286. . [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/gcb.14883>

REVELO, D.; et al. “Celdas de Combustible Microbianas (CCMs): Un Reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica”. *Información Tecnológica* [en línea], 2013, 24(6), pp. 17-28. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/infotec/v24n6/art04.pdf>

RIVAS, J. Caracterización molecular de cultivos axénicos para el tratamiento de lixiviados mediante celdas de combustible microbianas [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador. 2016. pp. 1-78. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/17615>

RODRÍGUEZ, P.; & ARENAS, R. “Hans Christian Gram y su tinción”. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* [en línea], 2018, 16(2), pp. 166-167. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>

ROLDÁN, G.; & J. Ramírez. *Fundamentos de limnología neotropical*. 2da edición. Antioquía, Colombia. Editorial Universidad de Antioquía. 2008.

ROMÁN, D. Verificación de una cepa microbiana del sedimento de la laguna de San Antonio, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4914/1/236T0191.pdf>

ROMERO, A.; et al. “Bacterias, fuente de energía para el futuro”. *Tecnura* [en línea], 2012, 16(32), pp. 118-143. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/tecn/v16n32/v16n32a11.pdf>

ROTHSCHUH, U. Célula procariota: características, partes y funciones. *Ecología verde* [en línea]. 2022. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://www.ecologiaverde.com/celula-procariota-caracteristicas-partes-y-funciones-4050.html>

ROTHSCHUH, U. Extremófilos: qué son, características y ejemplos. *Ecología verde* [en línea]. 2022. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://www.ecologiaverde.com/extremofilos-que-son-caracteristicas-y-ejemplos-3768.html>

SENGODON, P.;& HAYS, D. B. “Microbial Fuel Cells, Future Fuel Technologies, National Petroleum Council (NPC) Study”. *National Petroleum Council (NPC) Study* [en línea]. 2012. [Consulta: 24 marzo 2023]. Disponible en: https://www.npc.org/FTF_Topic_papers/13-Microbial_Fuel_Cells.pdf

TORRES RODRÍGUEZ, L.M.; et al. "Uso de curvas de polarización para entender el transporte de iones a través de una membrana de intercambio iónico". *Educación Química*, vol. 30, no. 4 (2019), pp. 6. ISSN 0187-893X. DOI 10.22201/fq.18708404e.2019.4.67333.

UNIVERSIDAD DE GRANADA. Variedad de medios de cultivo. [en línea]. 2020. [Consulta: 5 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-i/pb-i-2-variedad.htm>

VÁSQUEZ, P. Análisis fisicoquímico, químico y microbiológico del agua y sedimento periférico de la Laguna Cuicocha, provincia de Imbabura – [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/28413/1/UCE-FIGEMPA-CIA-VASQUEZ%20PAOLA.pdf>

VIDAL, L.;& ZAMBRANO, L. Desempeño de un sistema de celdas de combustible microbiano para el tratamiento y generación de bioelectricidad a partir de efluentes de una industria de curtiembre ubicada en el municipio de Villapinzón, Cundinamarca [En línea] (Trabajo de Titulación) (pregrado) Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia. 2021. pp. 1-114. [Consulta: 5 de Junio de 2022]. Disponible en: https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/7262/Vidal_Morales_Luisa_Valeria_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y



1786-DBRA-UPT-2023

ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCIÓN DE MUESTRAS EN LA LAGUNA QUILOTOA



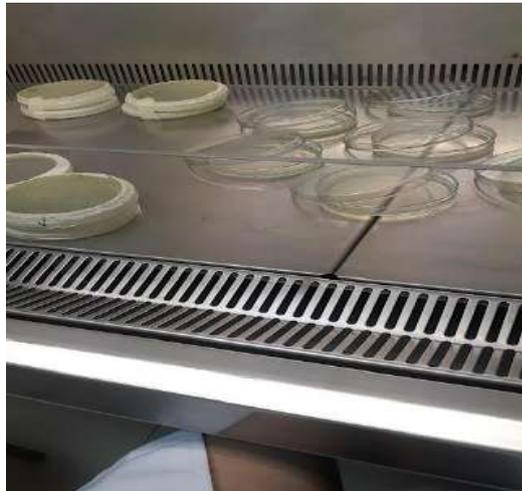
ANEXO B: RECOLECCIÓN DE MUESTRAS EN LA LAGUNA AMARILLA



ANEXO C: ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS DE LOS SEDIMENTOS



ANEXO E: PREPARACIÓN Y PLAQUEO DE AGAR PCA



ANEXO F: PREPARACIÓN DE DILUCIONES Y SIEMBRA EN SUPERFICIE DE LAS MUESTRAS



Diluciones de laguna Quilotoa



Diluciones de laguna Amarilla



**ANEXO G: INCUBACIÓN DE LOS PRIMEROS 7 DÍAS A TEMPERATURA AMBIENTE
LAGUNA QUILOTOA**



ANEXO H: RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS DESPUÉS DE 7 DÍAS EN TEMPERATURAS AMBIENTE LAGUNA AMARILLA



ANEXO I: RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS DESPUÉS DE 7 DÍAS EN TEMPERATURAS DE 5 A 10 °C



ANEXO J: AISLAMIENTOS DE BACTERIAS

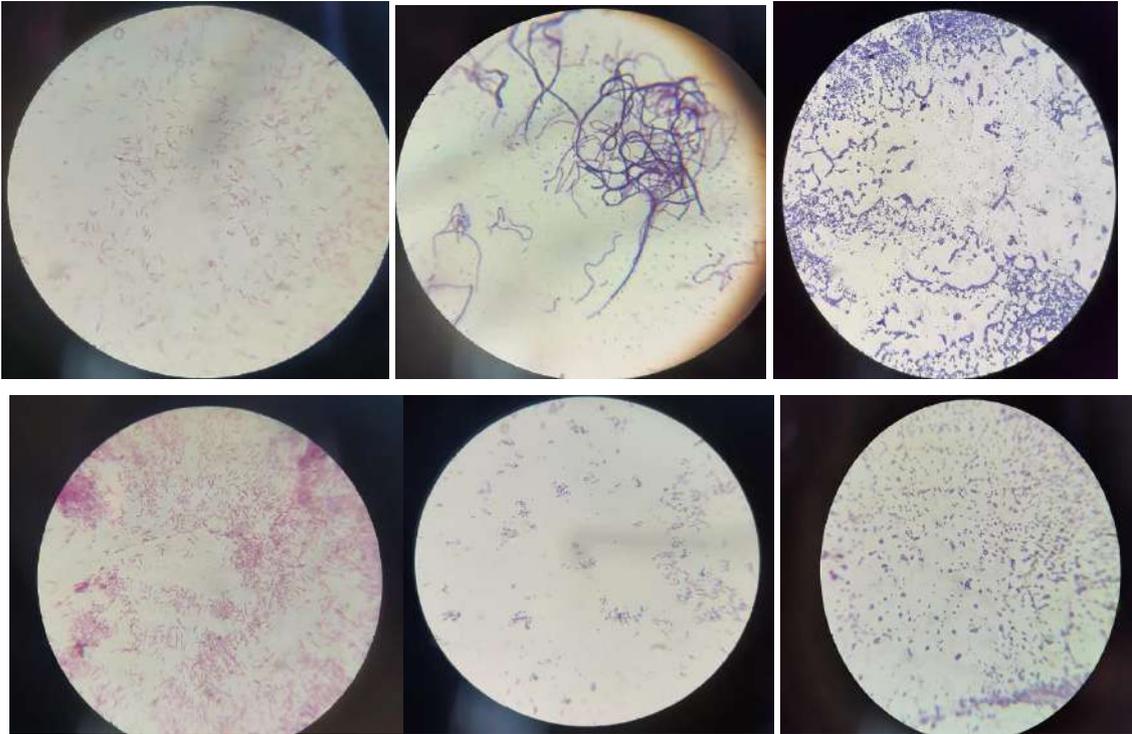


ANEXO K: BACTERIAS AISLADAS DESPUÉS DE 7 DÍAS A TEMPERATURA AMBIENTE

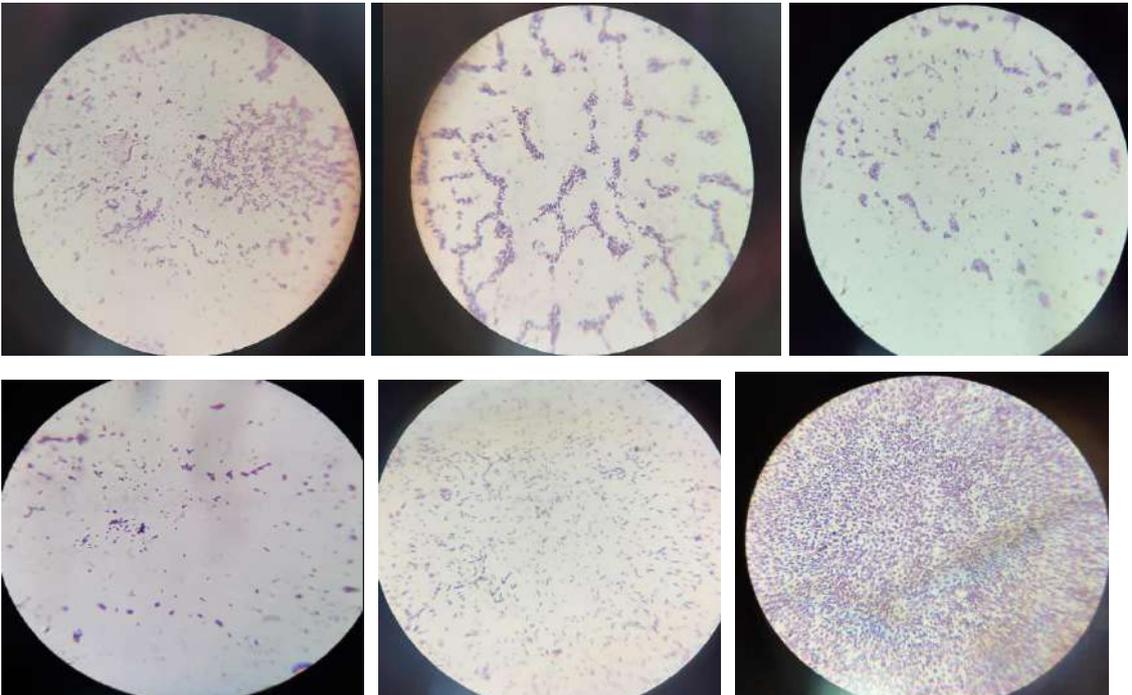


ANEXO L: TINCIÓN GRAM DE LAS BACTERIAS

Quilotoa



Amarilla



ANEXO M: PRUEBAS BIOQUÍMICAS

SIM



TSI





UREA



CITRATO



MC Conkey



Manitol



ANEXO N: ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LAS CELDAS DE COMBUSTIÓN



ANEXO Ñ: TRATAMIENTO DE LA FIBRA DE CARBONO



ANEXO O: CONSTRUCCIÓN DE LAS CELDAS DE COMBUSTIÓN MICROBIANA





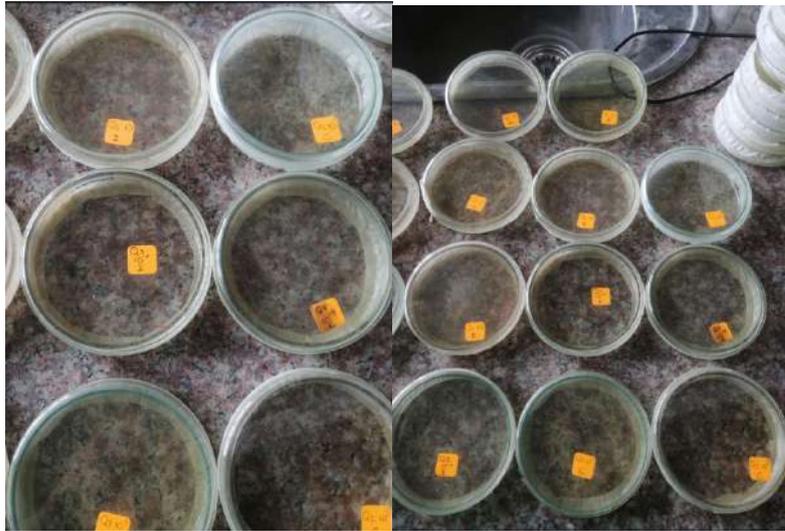
ANEXO P: INSTALACIÓN DE LAS CELDAS DE COMBUSTIÓN MICROBIANA



ANEXO Q: SIEMBRA DE LA FIBRA DE CARBONO DE LAS CELDAS



ANEXO R: SIEMBRA FINAL DE LAS DILUCIONES





epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 27 / 10 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Tannia Lisbeth Freire Guevara y María José Gallo Alvear
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Ingeniería en Biotecnología Ambiental
Título a optar: Ingeniera en Biotecnología Ambiental
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo, MSc.

1786-DBRA-UPT-2023