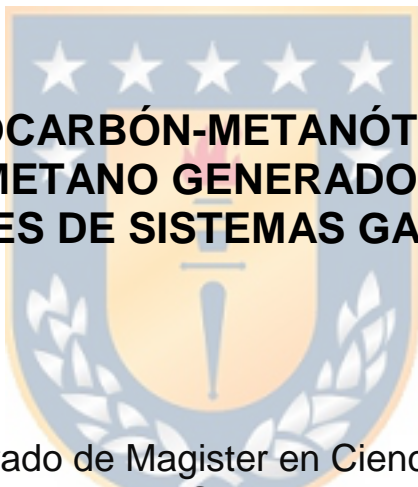




Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Agronomía -Programa de Magister en Ciencias Agronómicas



**COMPLEJO BIOCARBÓN-METANÓTROFO PARA LA  
MITIGACIÓN DE METANO GENERADO POR EL MANEJO  
DE PURINES DE SISTEMAS GANADEROS**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agronómicas con  
Mención en Ciencias del Suelo y Recursos Naturales

VALENTINA BELÉN GARCÍA AMBIADO  
CHILLÁN-CHILE  
2019

Profesor Guía: Cristina Muñoz Vargas  
Dpto. de Suelos y Recursos Naturales  
Facultad de Agronomía  
Universidad de Concepción



# COMPLEJO BIOCARBÓN-METANÓTROFO PARA LA MITIGACIÓN DE METANO GENERADO POR EL MANEJO DE PURINES DE SISTEMAS GANADEROS

Aprobada por:

Cristina Muñoz Vargas  
Ing. Agrónomo, Dr.

---

Profesora Guía

Erick Zagal Venegas  
Ing. Agrónomo, Ph. D.

---

Evaluador Interno

Homero Urrutia Briones  
Licenciado en biología, Dr.

---

Evaluador Externo

Macarena Gerding González  
Ing. Agrónomo, Ph. D.

---

Directora de Programa



## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDECYT N°1160795

Agradezco a mi esposo, por su apoyo, paciencia y ayuda, siendo fundamental durante el desarrollo de esta etapa. A mis padres y hermanas que me alentaron y aconsejaron durante todo el periodo de estudios de postgrado.

A mi profesora guía, Dr. Cristina Muñoz Vargas, por darme la oportunidad de trabajar con ella, apoyar una investigación en el área de biotecnología, y permitir ampliar mis conocimientos en biología molecular fuera del campus, por su apoyo en lo académico y personal, permitiendo asistencias a congresos nacionales e internacionales y la constante preocupación por su equipo de trabajo.

A mis profesores asesores, Dr. Erick Zagal Venegas, por sus acertadas contribuciones y sugerencias en el trayecto de realización de la tesis, y Dr. Homero Urrutia Briones, por recibirme en su laboratorio y brindar su apoyo en la parte de biología molecular del trabajo, sobretodo animándome cuando los ensayos no resultaban como esperaba.

Al equipo del Laboratorio de materiales carbonosos y agricultura, por su apoyo y amistad, a Katherine Rebolledo del Laboratorio de investigación por toda su ayuda en el GC y cálculos, y a Natalia Padilla, del Laboratorio de biopelículas y microbiología ambiental, por su tiempo y disposición en todos los análisis realizados, siendo fundamental su conocimiento en DGGE.

## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
Resumen .....	vii
Summary .....	viii
Introducción .....	1
Hipótesis.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
Diseño general de investigación.....	4
Materiales y métodos .....	5
Etapa I: Selección de metanótrofos desde purines.....	5
Etapa II: Formación de complejo biocarbón-metanótrofo.....	8
Etapa III. Determinación y caracterización de las cepas bacterianas.....	9
Resultados y Discusión .....	12
Caracterización bioquímica de purines y selección de bacterias metanótrofas.....	12
Viabilidad de microorganismos y prueba de consumo de metano a aislados.....	14
Biocarbón y complejo biocarbón metanótrofo.....	20
Disminución de metano.....	20
Determinación y caracterización de consorcios bacterianos.....	23
Conclusiones .....	26
Literatura citada.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	<b>Página</b>
Figura 1 Consumo de metano de purines.....	14
Figura 2 Metanótrofos aislados.....	16
Figura 3 Consumo de CH <sub>4</sub> de consorcios metanótrofos en 6 días...	17
Figura 4 Visualización de biocarbón.....	18
Figura 5 Visualización complejo biocarbón-metanótrofos.....	19
Figura 6 Variación de CH <sub>4</sub> al día 6.....	21
Figura 7 Patrones DGGE de productos de PCR de la región V3 del gen ribosomal 16S obtenidos de consorcios aislados.....	22
Figura 8 Dendrograma realizado mediante análisis de clúster según posición de las bandas visualizadas en DGGE de las comunidades bacterianas presentes obtenidas de consorcios aislados.....	24
Tabla 1 Partidores utilizados en PCR.....	11
Tabla 2 Resultado pruebas bioquímicas a muestras de purines....	13
Tabla 3 Diversidad microbiana calculados a partir de los patrones de bandas de DGGE.....	23
Tabla 4 Resultados de la determinación de bandas DGGE seleccionadas a partir de la huella dactilar de consorcios metanótrofos.....	25

## COMPLEJO BIOCARBÓN-METANÓTROFO PARA LA MITIGACIÓN DE METANO GENERADO POR EL MANEJO DE PURINES DE SISTEMAS GANADEROS

BIOCHAR-METHANOTROPHIC COMPLEX FOR THE MITIGATION OF METHANE GENERATED BY THE MANAGEMENT OF MANURE OF LIVESTOCK SYSTEMS

**Palabras Claves:** metano, purín, microorganismos metanótrofos, biocarbón.

### RESUMEN

El cambio climático se produce por un aumento progresivo de las emisiones de gases de efecto invernadero. Metano ( $\text{CH}_4$ ) es el segundo gas más relevante, permanece en la atmósfera aproximadamente de 9 a 15 años, con un poder de retención de calor 28 - 36 veces mayor que el de  $\text{CO}_2$ . Las bacterias metanótrofas se presentan como una alternativa de mitigación de  $\text{CH}_4$  ya que utilizan este compuesto como fuente de energía. En este trabajo se evaluó la oxidación de  $\text{CH}_4$  por parte de consorcios metanótrofos aislados desde purín de lechería y su potencial de mitigación de emisiones formando un complejo biocarbón-metanótrofos. Se logró aislar dos consorcios bacterianos aeróbicos (B y T) que oxidan  $\text{CH}_4$ , sin embargo, al formar el complejo biocarbón-metanótrofo no se observaron diferencias significativas con el control absoluto durante el ensayo de consumo de  $\text{CH}_4$ . Mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) y posterior secuenciación de las bandas más intensas, se logró determinar bacterias del género *Flavobacterium* en el consorcio B, y *Flavobacterium* y *Pseudomonas* en el consorcio T, microorganismos heterótrofos que causan un efecto positivo sobre el crecimiento de metanótrofos y la oxidación de  $\text{CH}_4$ . Los resultados obtenidos en este estudio no son concluyentes para afirmar que la matriz de biocarbón amplifica el efecto metanótrofo de éstos, por lo que se proponen mejoras en el protocolo de formación del complejo para futuras investigaciones.

## SUMMARY

Climate change is produced by a progressive increase in greenhouse gas emissions. Methane (CH<sub>4</sub>) is the second most relevant greenhouse gas, it stays on the atmosphere around 9 to 15 years and whose power of heat retention is 28 – 36 times more powerful than CO<sub>2</sub>. Methanotrophic bacteria are an alternative for mitigating CH<sub>4</sub>, because they use this gas as a source of energy. This study evaluates the oxidation of CH<sub>4</sub> by the methanotrophic consortiums isolated from dairy manure and its potential to mitigate emissions, forming a biochar-methanotrophic complex. Two aerobic bacterial consortia (B and T) that oxidize CH<sub>4</sub> were isolated, however, when forming the biochar-methanotrophic complex, significant differences were not observed with the absolute control during the CH<sub>4</sub> consumption test. By denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and subsequent sequencing of the most intense bands, it was possible to determine bacteria of the genus *Flavobacterium* in the B consortium, and genus *Flavobacterium* and *Pseudomonas* in the T consortium, heterotrophic microorganisms that cause a positive effect on the growth of methanotrophic bacteria and the oxidation of CH<sub>4</sub>. The results obtained in this study are not conclusive to affirm that the biocarbon amplifies the methanotrophic effect, therefore, improvements are proposed in the protocol of formation of the complex for future research.



## INTRODUCCIÓN

Se conoce como efecto invernadero al fenómeno que ocasiona una retención de la radiación infrarroja que emite la Tierra, producto de la composición de los gases que conforman la atmósfera (Prendez y Lara-Gonzalez, 2008), principalmente dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O). Estos gases cumplen un papel importante para la vida en la tierra, ya que se ha calculado que su temperatura promedio, que actualmente es 15°C, sería de -15°C o -18°C si los gases de efecto invernadero (GEI) no estuvieran presentes (Seinfeld, 2011; Serrano-Silva *et al.*, 2014). Sin embargo, las emisiones antropogénicas de GEI han aumentado desde la era preindustrial; entre 1750 y 2011 las emisiones acumuladas fueron de 2040 ± 310 GtCO<sub>2</sub> de los cuales cerca de 50% se han producido en los últimos 40 años, siendo la causa dominante del calentamiento observado a partir de la segunda mitad del siglo XX (IPCC, 2014). Dicho fenómeno, es responsable del cambio climático que afecta el planeta (Doménech, 2007), perjudicando la actividad agropecuaria, la cual tiene elevada importancia económica para Chile (Cifuentes y Meza, 2008), y que corresponde a un 3% del producto interno bruto (ODEPA, s.f.).

Chile, a nivel mundial, no es un gran emisor de gases de efecto invernadero (GEI) (IEA, 2018), pero su desarrollo ha provocado un aumento progresivo de estas emisiones, siendo la agricultura el segundo sector productivo que más contribuye para la producción de GEI en el país, con un 45,3% de emisiones correspondientes a CH<sub>4</sub>, producto de la fermentación entérica, manejo de estiércol y cultivo de arroz (MMA, 2014). En este sector se han desarrollado varias prácticas y tecnologías de gestión que ayudan a mitigar las emisiones de CO<sub>2</sub> procedentes de los suelos, como la conservación de suelos mediante la reducción de superficie destinada al cultivo, protección de la superficie del suelo con residuos de cosecha y el aumento de la eficiencia en el uso de nitrógeno por los cultivos (Hobbs *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2011).

Después del CO<sub>2</sub>, el CH<sub>4</sub> es el gas de efecto invernadero más importante, su emisión permanece en la atmósfera aproximadamente 12 años (Forster *et al.*, 2007), siendo su potencial de calentamiento global 28–36 veces mayor que el de

CO<sub>2</sub> bajo un horizonte de 100 años, además tiene algunos efectos indirectos, como el hecho de que es un precursor del ozono, y el ozono es en sí mismo un GEI (EPA, 2017). Se origina de forma natural por un grupo de microorganismos (metanógenos) pertenecientes al dominio *Archae*, en ambientes carentes de oxígeno, y su origen antropogénico es el resultado de la agricultura, la energía, los residuos y la producción industrial (Serrano-Silva et al., 2014), principalmente la industria ganadera, por procesos de fermentación entérica y manejo de estiércol (Steinfeld *et al.*, 2009). El purín, mezcla de fecas, orina y aguas residuales producto de lavados y aguas lluvia en la industria lechera, por su composición química (alto en nitrógeno, óxido de potasio y óxido de fósforo) es usado ampliamente como fertilizante orgánico, pero en su manejo y principalmente durante su almacenamiento, en pozos purineros, se restringe la aireación lo que conduce a productos como el CH<sub>4</sub> (Finch *et al.*, 2014), ya que se favorece un ambiente reductor y ocurren reacciones de fermentación de la materia orgánica por arqueas anaeróbicas obligadas, por ejemplo metilótrofas ( $4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $4\text{CH}_3\text{NH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+$ ) e hidrogenotróficas ( $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Serrano-Silva et al., 2014). De acuerdo a información generada en lecherías del Sur de Chile, una vaca en ordeña produce en promedio 105 litros de purín al día, variando de 34 a 260 litros de purín al día por vaca (Salazar, 2012a), generando aproximadamente 2148000 de m<sup>3</sup> de CH<sub>4</sub> por año (Chamy y Vivanco, 2007).

Actualmente, algunos estudios presentan como una alternativa a la mitigación de emisiones de CH<sub>4</sub> el uso de biocarbón (Rondon *et al.*, 2006), un producto de la pirolisis de biomasa (como madera, estiércol u hojas) por sobre 250 °C en ausencia o limitación de O<sub>2</sub>, cuyo proceso es conocido como carbonización. La adición de este producto en el suelo mejora las condiciones físicas de éste reduciendo la densidad aparente y mejorando su porosidad, lo que permite una mayor ventilación/oxigenación (Thies y Rillig, 2015) disminuyendo la producción de CH<sub>4</sub> por parte de microorganismos anaerobios (metanógenos) (Van Zwieten *et al.*, 2015) y favoreciendo el consumo de CH<sub>4</sub> por parte de microorganismos aerobios (metanótrofos) (Sadasivam y Reddy, 2015). Debido a la estructura

porosa del biocarbón, su alta superficie interna y su capacidad para absorber la materia orgánica soluble, gases y nutrientes inorgánicos, proporciona un hábitat adecuada para el crecimiento de microorganismos, especialmente bacterias, actinobacterias y micorrizas arbusculares (Thies y Rillig, 2015); sin embargo, debido a las complejas interacciones entre el biocarbón, nutrientes inorgánicos, enzimas, minerales y microorganismos, aún se estudian los mecanismos que rigen los efectos directos del biocarbón en los organismos del suelo, como interacciones superficiales a las paredes celulares o formación de biopelículas (Thies *et al.*, 2015). Se le ha utilizado como portador, por ejemplo, para distribuir rizobacterias promotoras del crecimiento, *Enterobacter cloacae*, en cultivos de pepino (Hale *et al.*, 2014) y generando un complejo biocarbón-microorganismo que mejoró en un 93% la biosorción de un compuesto contaminante como el polibromodifenil ésteres (Du *et al.*, 2016).

Los microorganismos metanótrofos son bacterias oxidantes de CH<sub>4</sub>, aeróbicas y consorcios de arqueas anaeróbicas asociadas a bacterias anaeróbicas (oxidación anaeróbica de CH<sub>4</sub>) (Serrano-Silva *et al.*, 2014), metilotróficas, que utilizan este compuesto como fuente de carbono y energía (Hanson y Hanson, 1996; Murrell, 1994; Reyes, 2014). Se pueden encontrar en una variedad de entornos en los que existe una interfaz entre procesos aeróbicos y anaeróbicos como suelos, campos de arroz, turberas, humedales, lodos de aguas residuales y aguas subterráneas, entre otros (Serrano-Silva *et al.*, 2014). Estos microorganismos presentan la enzima metano monooxigenasa (MMO), que genera metanol como intermediario en la oxidación aeróbica del CH<sub>4</sub> (Hanson y Hanson, 1996). Se clasifican en tres grupos, tipo I y tipo X que oxidan el CH<sub>4</sub> por la vía de la ribulosa monofosfato y el tipo II que lo hace por la ruta de las serinas, además de ser recientemente agrupados, según el gen 16S rRNA, dentro de *Gammaproteobacteria* los metanótrofos tipo I, mientras que el Tipo II se agrupa dentro de *Alphaproteobacteria* (Serrano-Silva *et al.*, 2014).

Estas bacterias son una alternativa biotecnológica frente a la mitigación de CH<sub>4</sub>. Stepniewska y Kuzniar (2014) describen una comunidad de bacterias a partir de cepas presentes en pantanos, que consume este gas, lo que podría ser una

alternativa de bajo costo y amigable con el medio ambiente (Lopez *et al.*, 2013). Encontrar microorganismos metanótrofos en el purín y favorecer su actividad al unirlos al biocarbón podría disminuir considerablemente las emisiones de CH<sub>4</sub> anual en la agricultura.

## **HIPOTESIS**

La matriz de biocarbón amplifica la actividad metanótrofa de bacterias como una alternativa de mitigación de emisiones de metano en purines de sistemas ganaderos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Investigar el potencial de mitigación de emisiones de gas metano de un complejo biocarbón-metanótrofos a partir de purines de sistemas ganaderos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar la actividad de microorganismos metanótrofos aislados desde purines de lechería para consumir gas metano.
- Analizar el efecto del complejo biocarbón-metanótrofos sobre la emisión de gas metano en un sistema in vitro, para su potencial implementación en un sistema in vivo.
- Determinar y caracterizar los microorganismos seleccionados que forman el complejo biocarbón-metanótrofo.

## **DISEÑO GENERAL DE INVESTIGACIÓN**

La parte experimental de la investigación se dividió en tres etapas. Etapa I, correspondió a la toma de muestra y aislamiento de consorcios, donde en un inicio se evaluó el consumo de CH<sub>4</sub> de dos muestras de purín que presentan diferentes tecnologías de almacenamiento, con el objetivo de aislar consorcios desde el purín con mejor resultado. Posteriormente se obtuvo dos aislados a los que se le realizó una prueba de consumo de metano, para asegurar que éstos presentaran actividad metanótrofa. En la Etapa II se realizó la formación del

complejo biocarbón-metanótrofo y se realizó una nueva prueba de consumo de CH<sub>4</sub> con el fin de comparar los tratamientos con y sin biocarbón. La Etapa III, consistió en la determinación y caracterización de los consorcios utilizando técnicas moleculares: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) y secuenciación.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Etapa I: Selección de metanótrofos desde purines**

**Toma de muestra.** Las muestras fueron tomadas desde dos pozos purineros de diferentes tecnologías de almacenamiento correspondientes a la provincia de Osorno en la región de Los Lagos. La muestra 1 (P1) corresponde a un pozo purinero comercial, perteneciente a INIA Remehue (Osorno), con 350 vacas en ordeña, 60.000 a 90.000 litros de purín al año. Su temperatura al momento de muestreo fue de 14,5°C. La muestra 2 (P2) es de un pozo purinero de mediano productor, de la localidad de La Unión, con 270 a 300 vacas en ordeña. La temperatura al momento de muestreo fue 18,5°C. Las muestras de cada pozo fueron colectadas en el mes de septiembre tomando 100 mL desde cuatro puntos diferentes (norte, sur, este y oeste) y se homogenizaron en un recipiente plástico herméticamente cerrado, dejando un espacio libre de a lo menos 10 cm para evitar que por la formación de gas el envase derrame su contenido (Salazar, 2012b). Se tomaron 3 repeticiones de 150 mL de cada muestra y se almacenaron a 4°C para su traslado; posteriormente en laboratorio, a -80°C para extracción de ADN y 5°C para análisis microbiológicos.

**Caracterización bioquímica de purines.** Demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) y demanda química de oxígeno (DQO) fueron analizados según las normas NCH 2315/5 OF96 y NCH 2313/24 OF97, respectivamente, en el Laboratorio Control de Calidad del Departamento de Agroindustrias de la Facultad de Ingeniería Agrícola, Universidad de Concepción, campus Chillán. Mediciones de nitrato (N-NO<sub>3</sub>) y amonio (N-NH<sub>4</sub>), nitrógeno (N) total, fósforo (P) total y determinación de sulfatos (SO<sub>4</sub>) se realizaron de acuerdo a métodos de análisis de purines (Peters *et al.*, 2003) por el Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas,



del Depto. de Suelos y Recursos Naturales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Campus Chillán. La actividad de la biomasa microbiana se determinó por el método de hidrólisis de la fluoresceína diacetato (FDA) (Alef, 1995; Green, V. *et al.*, 2006). A 0,5 mL de purín, en tubos de ensayo con tapa rosca, se agregó 4,95 mL de tampón de fosfato sódico y 0,05 mL de FDA, se mezcló e incubó en un baño termorregulado WSB-45 (WiseBath WSB, Korea) a 25°C por 1 h. Posteriormente las muestras se dejaron en hielo para dar un golpe de frío, se añadió 5 mL de acetona, se agitó y se filtró. Las muestras se analizaron en triplicado y se incluyó un blanco. Se midió absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Genesys 5 (Thermo Spectronic, USA).

**Ensayo de consumo de metano.** Se realizó con el objetivo de seleccionar uno de los purines y desde ahí aislar los consorcios bacterianos. Los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL equipado con un tapón de goma herméticamente cerrado que permite el intercambio gaseoso mediante el uso de jeringas. Los purines se evaluaron en 3 réplicas, cada una se mezcló con una solución tampón anaeróbica (Whitehead *et al.*, 2013) para lograr una concentración de 10% v/v. Se incubaron a 20°C y 200 rpm en un agitador recíproco 3016 (GFL, Alemania) durante 6 días. El crecimiento de bacterias metanótrofas se estimuló mediante el suministro de CH<sub>4</sub>, asegurando una concentración de 2% v/v (20000 ppmv) en el espacio aéreo de los frascos. La proporción entre la muestra cultivada y el espacio gaseoso siempre fue 1:5. Se realizaron mediciones de CH<sub>4</sub> los días 0, 6 y 12 recolectando mediante jeringas herméticas 25 mL de gas de los matraces y almacenándolos en viales al vacío de 12 mL (Exatainer, Labco Ltd., England), sustituyendo lo extraído con 25 mL de helio (He) para que no existan diferencias de presión en el experimento, para su posterior análisis instrumental en cromatógrafo de gases Clarus 600 (Perkin Elmer, USA), equipado con una columna Porapak Q. La concentración de CH<sub>4</sub> fue determinada a través de un detector de ionización en flama (FID). Se utilizó nitrógeno como gas portador y las temperaturas del inyector, horno y detector fueron 120, 40 y 350°C respectivamente. La selección del purín se realizó de acuerdo al criterio de las muestras de purín que mayor consumo de metano

generó bajo las condiciones de este ensayo.

**Aislamiento de microorganismos.** Se realizaron diluciones seriadas del purín elegido y se sembraron en medio de cultivo sólido sales minerales de nitrato (NMS) un medio ampliamente utilizado para el cultivo de bacterias metanótrofas. Se utilizaron placas Petri que fueron herméticamente cerradas y adecuadas con una llave de tres pasos que facilita la incorporación de CH<sub>4</sub> al medio. Se incubaron a 20°C durante 4 días, con CH<sub>4</sub> 2% v/v y posteriormente se escogieron dos colonias visualmente diferentes para obtener colonias aisladas mediante siembra en estrías. Las colonias aisladas se inocularon en viales con medio NMS líquido e incubadas a 200 rpm, 20°C y CH<sub>4</sub> 2% v/v. Estos cultivos fueron los “tubos madre” para ensayos bacterianos posteriores, cuya concentración fue 6,63 x 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> para B y 5,59 x 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> para T).

Se realizó una prueba de consumo de CH<sub>4</sub> a los consorcios aislados para comprobar que éstos oxidan el gas; para ello, se incubaron 100 µL de los tubos madres en matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio NMS líquido en las mismas condiciones que el ensayo a purines, donde se incluyó un tercer consorcio “M” que corresponde a la mezcla de B y T (50 µL de B + 50 µL de T). Se evaluó el contenido de CH<sub>4</sub> los días 0 y 6 mediante cromatografía de gases, como se ha descrito previamente. Todas las muestras se evaluaron en triplicados.

**Ensayo de viabilidad.** Se realizó un ensayo de viabilidad para observar el estado de las poblaciones bacterianas presentes en las muestras. Para ello se centrifugó 3 mL de suspensión bacteriana con 73 días de incubación, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo en 500 µL de tampón fosfato salino. Se aplicó el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD®, según directrices de manufacturación, método que emplea dos fluorocromos, SYTO 9 (tinción verde, marca células viables) y yoduro de propidio (tinción roja, marca células lisadas), las células se excitan a una longitud de onda de 470 nm y se emiten en un rango de 490–700 nm. Se observó mediante un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX51. Para determinar el recuento celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento} \left( \frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{N^{\circ} \text{ células} \times Vc \times Fm (40284,45) \times 1000}{Vo \times Vi}$$

Donde:

**Vc:** Volumen de la suspensión en solución tampón.

**Fm:** Factor de microscopio correspondiente al área del filtro/Área de campo de observación.

**Vo:** Volumen alicuotado para tinción con solución de kit BacLight.

**Vi:** Volumen inicial de la muestra elegida para tinción con solución de kit BacLight.

## **Etapa II: Formación de complejo biocarbón-metanótrofo**

**Obtención de matriz de biocarbón.** Se utilizó como materia prima residuos lignocelulósicos (aserrín de pino, *Pinus radiata*), previamente tamizado a 5 mm y secado a 65°C. Se utilizó un equipo pirolizador de la Universidad de Concepción localizado en la Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT); realizándose una pirólisis lenta con incremento gradual de temperatura llegando a la máxima temperatura de 550°C, manteniéndose a esta temperatura durante 2 horas. Se analizó su composición elemental C/N/H/S con un analizador elemental Hanau (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany).

**Inmovilización de cepas bacterianas en biocarbón.** La inmovilización de cepas se llevó a cabo de forma pasiva, donde se mezclaron 100 µL de suspensión bacteriana y 0,1 g de biocarbón (Du et al., 2016) en 20 mL de medio NMS durante 10 días (Xie et al., 2018), con un 2% de CH<sub>4</sub>. Las unidades experimentales sin biocarbón (control) se preincubaron con las mismas características. La formación del complejo biocarbón-metanótrofo se observó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

**Visualización del complejo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).** Mediante microscopía electrónica de barrido se observó a los cultivos metanótrofos adheridos al biocarbón. Las muestras fueron visualizadas posterior al ensayo de consumo de metano (día 16), se eliminó el contenido de agua mediante secado de las muestras a 60°C y se visualizó en un Microscopio Electrónico de Barrido JSM-6380 LV (JEOL, Japón).

**Consumo de metano del complejo biocarbón-metanótrofo.** El consumo de metano del complejo se realizó bajo las mismas condiciones que el ensayo



realizado a las colonias aisladas. Se identificaron los tratamientos de acuerdo a su aspecto, siendo: consorcio de color blanco (B), consorcio traslúcido (T), consorcio mixto (M), complejo de consorcio blanco + biocarbón (B+BC), complejo de consorcio traslúcido + biocarbón (T+BC) y complejo de consorcio mixto + biocarbón (M+BC). Se utilizaron dos controles, siendo control absoluto solo medio NMS sin suspensión bacteriana y control de biocarbón (sin suspensión bacteriana). Se evaluó el contenido de CH<sub>4</sub> los días 0 y 6, mediante cromatografía de gases (descrito en etapa I).

### **Etapa III. Determinación y caracterización de las cepas bacterianas.**

**Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN).** La extracción de ADN se realizó utilizando un procedimiento de golpe térmico, para lo cual se realizó una suspensión bacteriana en tampón fosfato salino en tubo Eppendorf de 2 mL que se centrifugó, utilizando una centrífuga miniSpin (Eppendorf, Alemania), durante 5 min a 13.400 rpm para hacer dos lavados de las células. El material se resuspendió en 3 tubos con 100 µL del tampón y se llevaron a -80 °C durante 10 min e inmediatamente a 100 °C por 10 min más. Luego se agregó tampón de lisis y se incubó por 30 min a 65 °C. Se centrifugó por 5 min a 10.000 rpm y se recuperó el sobrenadante (fase acuosa) al que se le agregaron 500 µL de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en la proporción 25:24:1 durante 10 min a temperatura ambiente. Se vuelve a recuperar el sobrenadante y se mezcló con 800 µL de isopropanol frío y 120 µL de NaCl 5M. Se incubó a -20 °C durante 24 horas. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 13.500 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante para lavar el pellet con 800 µL de etanol 100% frío, se volvió a centrifugar a 13.500 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante para dejar secar el pellet. Finalmente, el ADN extraído se almacenó a -20°C suspendido en tampón TE. Para comprobar la integridad del ADN se realizó una electroforesis con gel de agarosa 1,2%, tampón TAE 1X y bromuro de etidio para la visualización.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) - Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).** Se amplificó el gen ribosomal 16S con

los partidores F341 y R907 (Tabla 1) y el producto de PCR se utilizó como templado para realizar una PCR anidada con el partidor F341 unido a la cola de GC y el partidor reverse R534 (Tabla 1) obteniendo fragmentos de ADN correspondientes a la región V3 del gen ADNr 16S. La primera reacción de PCR se realizó para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , conteniendo 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, 0,5 mM de cada partidor, 1X de tampón de reacción PCR, 0,025 U/ $\mu\text{L}$  de taq DNA polimerasa y 1,5  $\mu\text{L}$  de templado de ADN. Las condiciones para el programa de amplificación del par de partidores F341-R907 fue una denaturación inicial a 95°C durante 5 min, 35 ciclos consistentes en 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 2 min a 72°C y finalmente una extensión a 72°C durante 10 min. La PCR anidada, correspondiente al par de partidores F341GC-R534, se realizó para un volumen final de 30,5  $\mu\text{L}$ , conteniendo 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, 0,5 mM de cada partidor, 1X de tampón de reacción PCR, 0,025 U/ $\mu\text{L}$  de taq DNA polimerasa y 2,5  $\mu\text{L}$  de templado de ADN (PCR 1). El programa de amplificación fue de una etapa inicial de denaturación a 95°C durante 2 min, 28 ciclos consistentes en 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C, con una etapa de extensión final a 72°C durante 3 min. La integridad del producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa 1,2% (p/v) con bromuro de etidio 0,008% (v/v) bajo luz UV. Los productos de PCR anidado fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 7,5% con un gradiente de denaturación de 40 – 65% de urea – formamida (Hanson y Hanson, 1996; Jiang *et al.*, 2010). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 60 V a 60°C durante 16 h. La visualización de las bandas en el gel de poliacrilamada se realizó con una tinción de nitrato de plata (Muyzer *et al.*, 1998).

**Secuenciación de bandas DGGE.** Para la secuenciación de las bandas en el gel, se realizó una tinción con bromuro de etidio (0,01% v/v) del gel de poliacrilamida, desde donde se recuperaron las bandas más intensas y se amplificaron nuevamente con los partidores F341 y R534, cuyo producto de PCR se purificó y secuenció a través del servicio de secuenciación de la Facultad Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Tabla 1. Partidores utilizados en PCR

Partidor <sup>a</sup>	Blanco de gen		Referencia
	16Sr DNA (posición <sup>b</sup> )	Secuencia nucleotídica	
<b>F341</b>	Bacteria (341 – 357)	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	Muyzer et al. 1993
<b>R907</b>	Bacteria (907–926)	5'-CCCCGTCAATTCCTTTGAGTT-3'	Muyzer et al. 1998
<b>F341GC</b>	Bacteria (341 – 357)	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGG CGGGGGCACGGGGGCCTACGGGAGGC AGCAG-3'	Muyzer et al. 1993
<b>R534</b>	Bacteria (518 – 534)	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	Muyzer et al. 1993

<sup>a</sup> F, partidor *forward*; R; partidor *reverse*; GC, secuencia de G+C unido a terminal 5'.

<sup>b</sup> Numeración en *E. coli*.

Fuente: Elaboración propia

**Análisis de datos.** Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico InfoStat 2018e, realizando análisis de varianza para cada etapa (se usó nivel de significación estadística  $\alpha$ : 0,05), y pruebas de separación de medias con el fin de escoger los mejores tratamientos. Las imágenes obtenidas del gel de poliacrilamida fueron analizadas con el programa Bionumerics versión 7.6. Se evaluó la riqueza (R) de unidades taxonómicas operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés), índice de diversidad general de Shannon (H) y se utilizó el coeficiente Simpson para determinar la diversidad (D) de los consorcios (Lv *et al.*, 2012). El análisis de conglomerados se realizó utilizando el coeficiente de similitud DICE (Núñez-Colín y Escobedo-López, 2011) con una optimización de un 0,5%, una tolerancia de un 0,5% y el algoritmo de agrupación UPGMA. También se realizó un análisis de varianza para determinar diferencias significativas entre los consorcios aislados. Se utilizó la herramienta de búsqueda NCBI BLAST para comparar las secuencias de ADN obtenidas con secuencias de nucleótidos de la base de datos NCBI GenBank (Cantera *et al.*, 2016; McGinnis y Madden, 2004).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización bioquímica de purines y selección de bacterias metanótrofas.

De acuerdo a la forma de obtención de los purines y su almacenamiento, se obtuvieron purines con diferentes características; es así que P1 es un material fluido con  $9.540 \text{ mg L}^{-1}$  de materia seca (MS), que fue obtenido de un predio lechero donde se utiliza aplicaciones de agua a presión para el lavado de pisos en sala de ordeña y corrales; por lo que los desechos orgánicos de los vacunos se encuentran en gran medida diluidos en agua. Por el contrario, en el predio lechero donde se obtuvo la muestra P2 se realiza la limpieza de pisos utilizando un tractor con pala de goma reversible, que produce el arrastre de los desechos sin la utilización de agua, siendo así el material colectado un material considerablemente más espeso, con  $60.500 \text{ mg L}^{-1}$  de MS. Los resultados de las pruebas bioquímicas se presentan en la Tabla 2; donde ambos purines tienen pH relativamente neutro (cerca de 7). El análisis de  $\text{DBO}_5$  resultó en  $3000 \text{ mg de O}_2 \text{ L}^{-1}$  y  $14000 \text{ mg de O}_2 \text{ L}^{-1}$  para P1 y P2 respectivamente, siendo P2 el purín que presenta un mayor consumo de oxígeno en la degradación de componentes orgánicos debido a una mayor actividad de la biomasa microbiana ( $72,359 \mu\text{g F mL}^{-1}$ ). Efectivamente, los purines contienen una amplia variedad de microorganismos, Green et al. (2004) encontraron 7 grupos filogenéticos en compost de purines vacunos: acidobacterias, actinobacterias, bacteroidetes, Chlorobi, Fibrobacteres, Firmicutes, y Proteobacteria y en residuos lecheros utilizados en la producción de gas, Alitalo et al. (2015), describen el filo Firmicutes como dominante (44%), seguido por los filos de Spirochaetes (10%), Deinococcus-Thermus (10%), Proteobacteria (10%) y Actinobacteria (2%). En general, los componentes de los purines producidos en el sur de Chile son muy variables entre los predios (Salazar, 2012b), lo que también se observa en el contenido de N total, mineral ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ ) y  $\text{SO}_4$ .

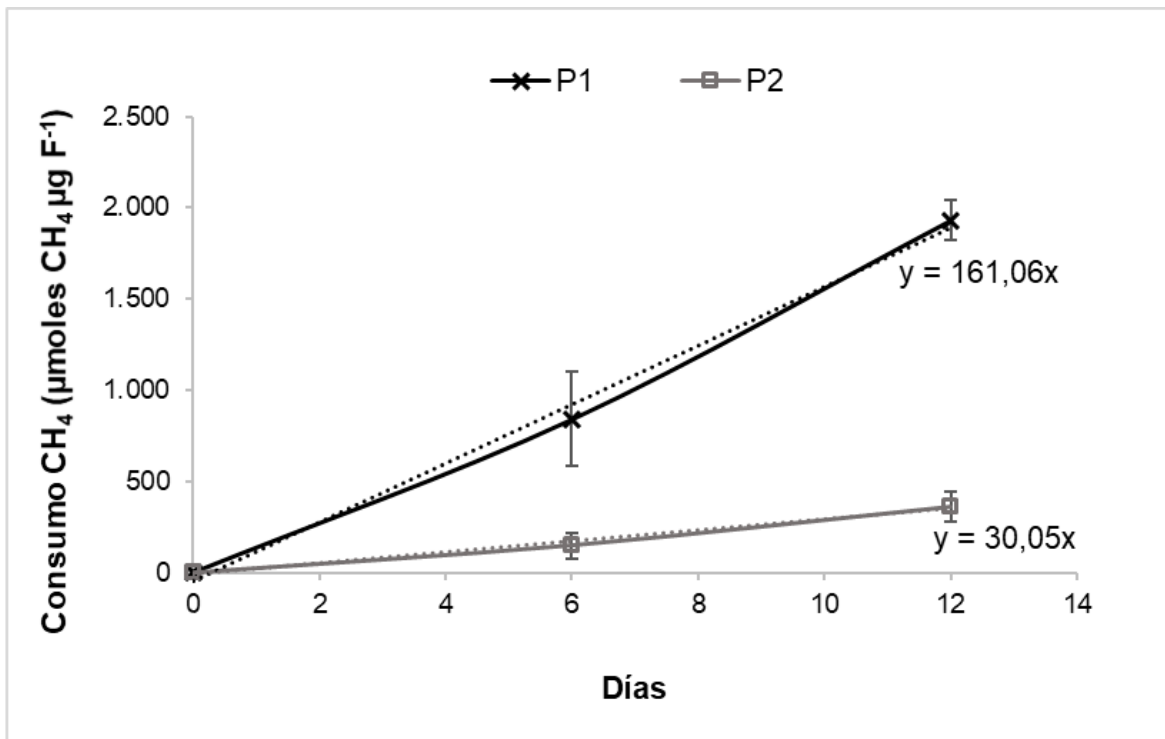
**Tabla 2. Resultado pruebas bioquímicas a muestras de purines.**

<b>Tipo de análisis</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>
<b>DBO<sub>5</sub></b>	3.000 mg de O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	14.000 mg de O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>
<b>DQO</b>	34.000 mg de O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	34.000 mg de O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>
<b>pH</b>	6,69	6,44
<b>Contenido de humedad</b>	100%	91%
<b>Materia seca</b>	9.540 mg L <sup>-1</sup>	60.500 mg L <sup>-1</sup>
<b>N total</b>	4,92 %	2,50 %
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	4,78 mg L <sup>-1</sup>	1,10 mg L <sup>-1</sup>
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	412,3 mg L <sup>-1</sup>	89,4 mg L <sup>-1</sup>
<b>P total</b>	4,72 mg L <sup>-1</sup>	1,26 mgL <sup>-1</sup>
<b>SO<sub>4</sub></b>	2,42 %	0,50 %
<b>Actividad biomasa microbiana</b>	27,26 µg F mL <sup>-1</sup>	72,36 µg F mL <sup>-1</sup>

*Fuente: Elaboración propia*

La mayoría de los metanótrofos aeróbicos crecen a un pH de ~ 6.0–8.0 (neutrófilos), a 20–40 °C (mesófilos) y baja salinidad (Le Mer y Roger, 2001; Nazaries *et al.*, 2013; Serrano-Silva *et al.*, 2014), condiciones dadas en ambas muestras de purines. Al realizar una prueba de consumo de metano, se obtiene un consumo de CH<sub>4</sub> de 161,06 µmol µg F<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en P1 y 34,05 µmol µg F<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> por parte de P2 (Figura 1), siendo P1 el purín con mayor consumo de este gas al día 6 (p<0.05), llegando a consumir el 96% al día 12 (331923 µmol µg F<sup>-1</sup>). Resultado obtenido a pesar del alto contenido de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en P1, lo que podría dificultar el proceso de oxidación de CH<sub>4</sub> pues la enzima MMO, que inicia la oxidación, es capaz de unirse a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y reaccionar, porque NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y CH<sub>4</sub> son similares en tamaño y estructura (Serrano-Silva *et al.*, 2014). El mayor porcentaje de SO<sub>4</sub> podría ser relacionado a favorecer la metanogénesis inversa en P1, proceso en el que ocurre la oxidación anaeróbica de CH<sub>4</sub> mediante bacterias reductoras de sulfatos (Serrano-Silva *et al.*, 2014), sin embargo, el realizar el ensayo en agitación, favorece un ambiente aeróbico en los matraces, pues se homogeniza el cultivo y se logra una distribución uniforme de oxígeno y nutrientes

(Rodwell, 1983). Estos resultados fueron concluyentes para decidir aislar bacterias metanótrofas desde P1.



**Figura 1: Consumo de metano de purines.** P1: Pozo purinero comercial. P2: Pozo purinero de mediano productor. *Fuente: Elaboración propia*

### **Viabilidad de microorganismos y prueba de consumo de metano a aislados.**

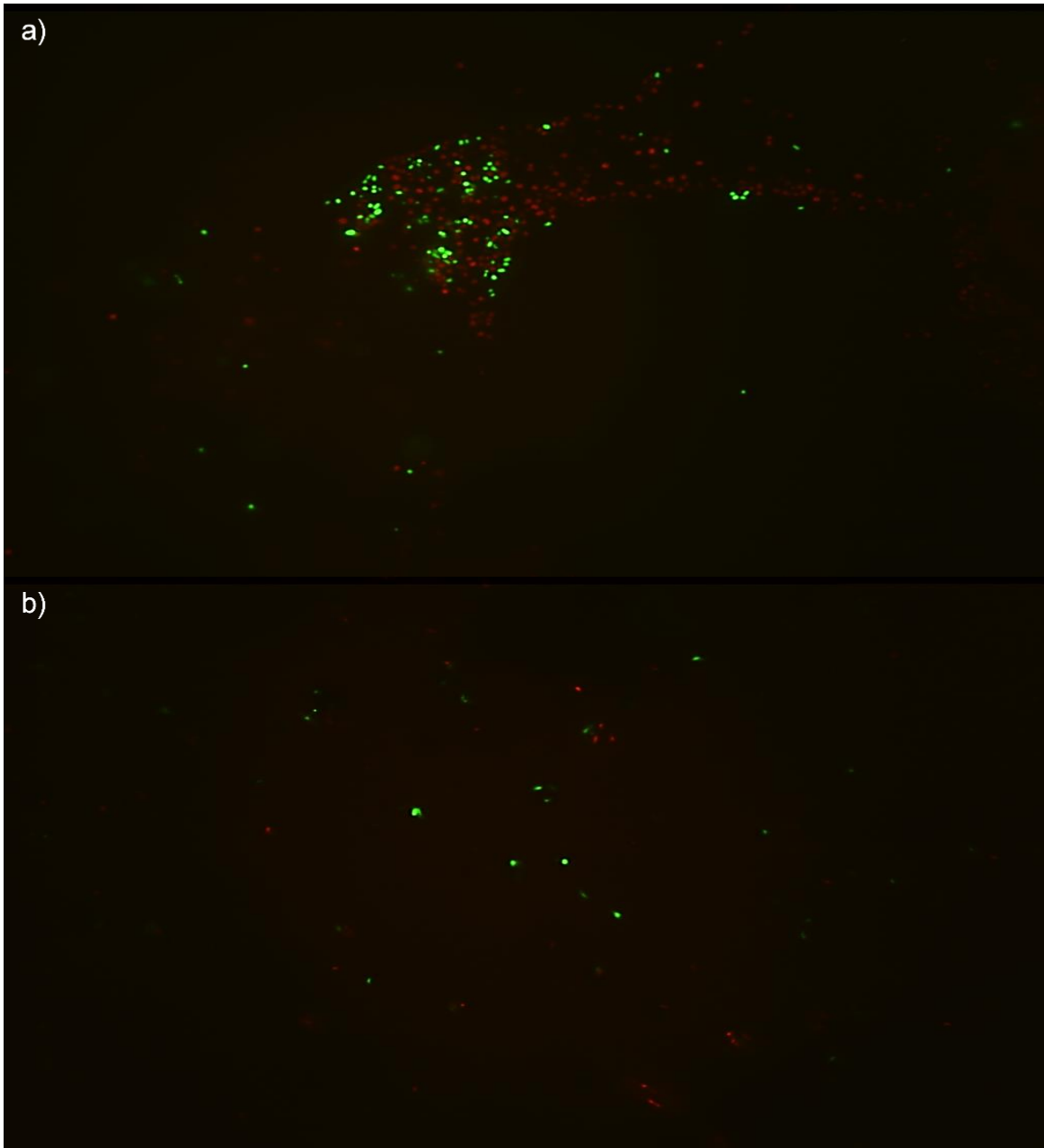
Se logró identificar dos consorcios bacterianos diferentes, de acuerdo a fenotipos macroscópicos de colonias aisladas: consorcios de color blanco (B) y traslúcidos (T). Al incubar los aislamientos en medio de cultivo líquido, no se observa turbidez en el medio, por lo que a los 73 días se realiza una prueba de viabilidad, para comprobar la presencia de células vivas en las muestras (Figura 2). El recuento total de células fue de  $1,27 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$  para el consorcio B, de las cuales un 20,48% corresponde a células vivas ( $2,60 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ ). El consorcio T presentó un recuento total de  $5,85 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$  al día 73 de incubación, con un 45,02% de células vivas ( $2,63 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ ), resultados que coinciden con autores que describen a las bacterias metanótrofas como microorganismos de lento crecimiento (Jiang et al., 2010; Xing et al., 2006), mencionando que su desarrollo se ve afectado por diferentes factores, como la concentración de  $\text{CO}_2$  atmosférico,



cambios de temperatura, contenido de agua en el medio, concentración de  $O_2$  y  $CH_4$ , pH, salinidad, contenido de amonio ( $NH_4^+$ ), entre otros (Serrano-Silva et al., 2014). Por ejemplo, generalmente, las altas relaciones de  $CH_4/O_2$  estimulan el crecimiento de metanótrofos de tipo II, mientras que las bajas relaciones de  $CH_4/O_2$  estimulan el crecimiento de metanótrofos de tipo I (Amaral y Knowles, 1995; Lopez et al., 2013). Sin embargo, al incubar metanótrofos con biocarbón en bajas concentraciones de  $CH_4$  (1 y 8%), Syed et al. (2016), obtienen el resultado contrario, aumentando la concentración de *alphaproteobacterias* (tipo II) en un 107% cuando las *gammaproteobacteria* (tipo I) lo hicieron en un 31%, por lo que dicho material influye en mayor medida en la conformación de la comunidad metanótrofa en comparación a las relaciones de  $CH_4/O_2$ . Por otro lado, Cantera et al. (2016) evidencian que la concentración de  $CH_4$  no implica diferencias significativas en la comunidad metanótrofa (metanótrofos de tipo I) mejorando sus tasas oxidación de  $CH_4$  al evaluar una mayor agitación. Dado que en la preparación de tubos madre con los consorcios aislados se realizó a bajas concentraciones de  $CH_4$  y con agitación, se puede inferir que en nuestro estudio encontraremos metanótrofos del tipo I.

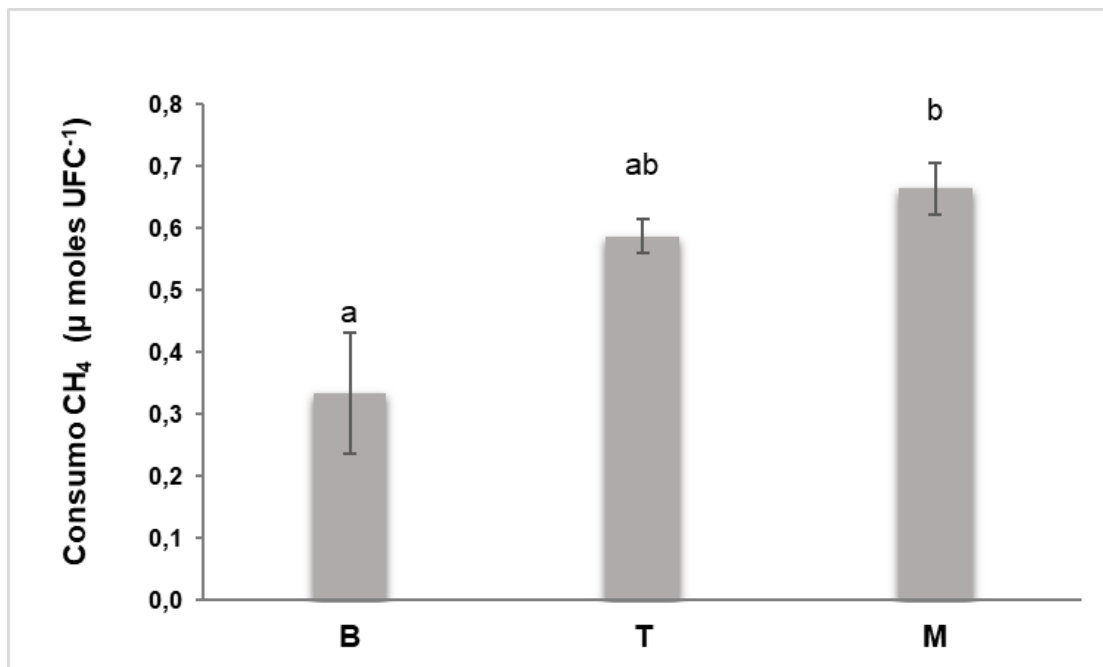
El consumo de  $CH_4$  de los consorcios se muestra en la Figura 3. Al comparar los aislamientos, el consorcio B presenta un consumo de  $CH_4$  de  $0,33 \mu \text{ moles UFC}^{-1}$  y T un  $0,59 \mu \text{ moles UFC}^{-1}$ , resultados que no presentan diferencia significativa, sin embargo, al unir ambos consorcios (M) se obtiene un consumo de  $0,67 \mu \text{ moles UFC}^{-1}$ , que lo diferencia del consorcio B ( $p < 0,05$ ), demostrando que la interacción de los consorcios puede mejorar la actividad metanótrofa. Iguchi et al. (2011) encontraron que tres cepas rizobiales estimulan fuertemente el crecimiento y la oxidación del metano por *Methylovulum myyakonense*. Ho et al. (2014) proporcionaron evidencia directa de cómo la riqueza de heterótrofos ejerce una respuesta en la interacción metanótrofo-heterótrofo que resulta en un aumento de la actividad metanótrofa. Jeong et al. (2014) evaluaron los efectos de *Sphingopyxis sp.* (una bacteria heterótrofa común del suelo) sobre el crecimiento y la actividad de *Methylocystis sp.* (tipo II), demostrando que *Sphingopyxis sp.* mejoró la actividad metanótrofa y el crecimiento de *Methylocystis sp.*, al

encontrarse en el cultivo a una proporción 9:1, superando los resultados obtenidos en proporción 1:1 y 1:9.



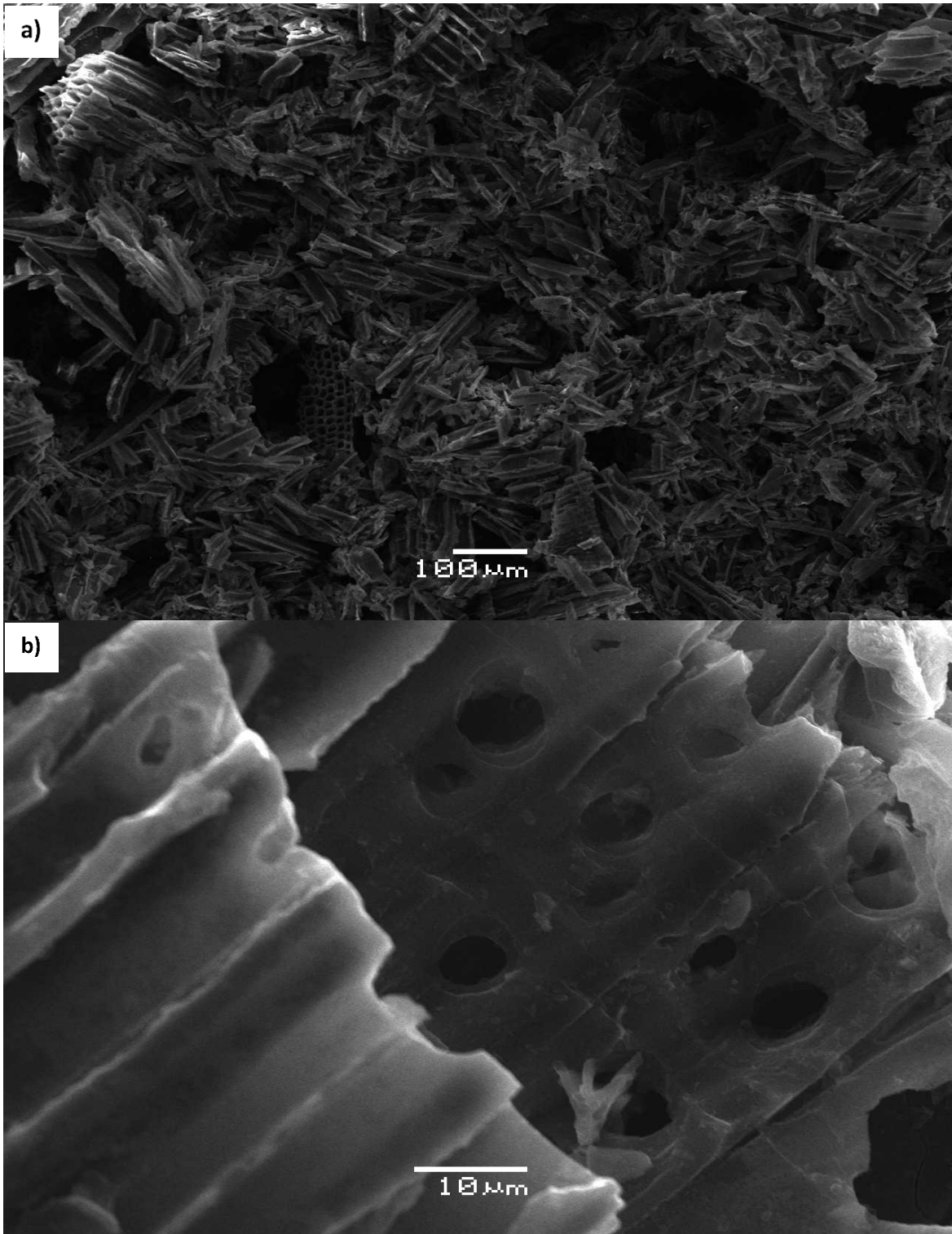
**Figura 2: Metanótrofos aislados.** Visualización en microscopía de fluorescencia 1000X. a) Consorcio B; b) Consorcio T. *Fuente: Elaboración propia*



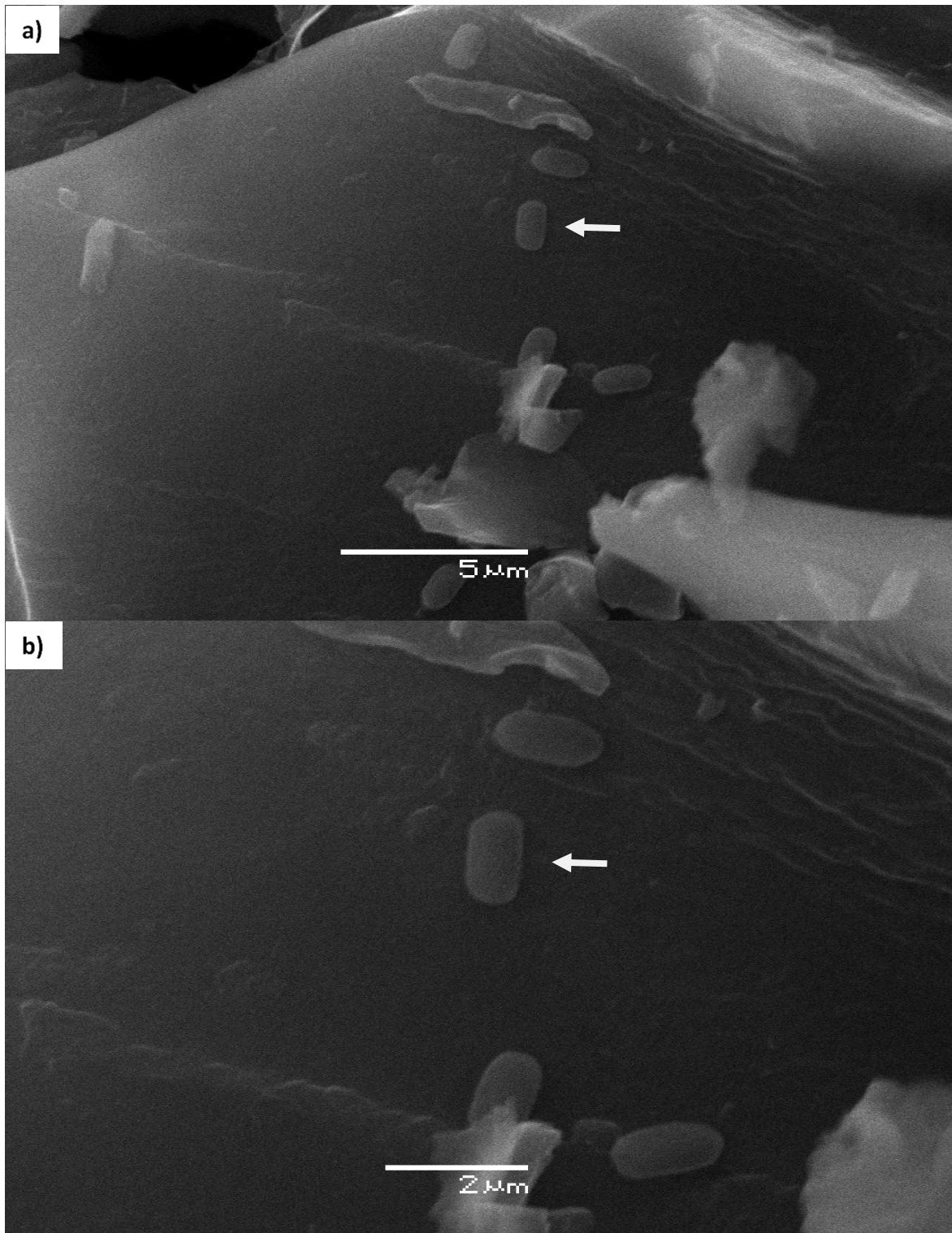


**Figura 3: Consumo de CH<sub>4</sub> de consorcios metanótrofos en 6 días.** B: cultivo células blancas, T: cultivo células transparentes y M: B+T. *Fuente: Elaboración propia*





**Figura 4: Visualización de biocarbón.** Microscopía electrónica de barrido a) Biocarbón visualizado a 100 µm. b) Poros en biocarbón (10 µm). *Fuente: Elaboración propia*



**Figura 5: Visualización complejo biocarbón-metanótrofos.** Microscopía electrónica de barrido: a) Consorcio B en biocarbón (5 µm). b) Consorcio B en biocarbón (2 µm). *Fuente: Elaboración propia*

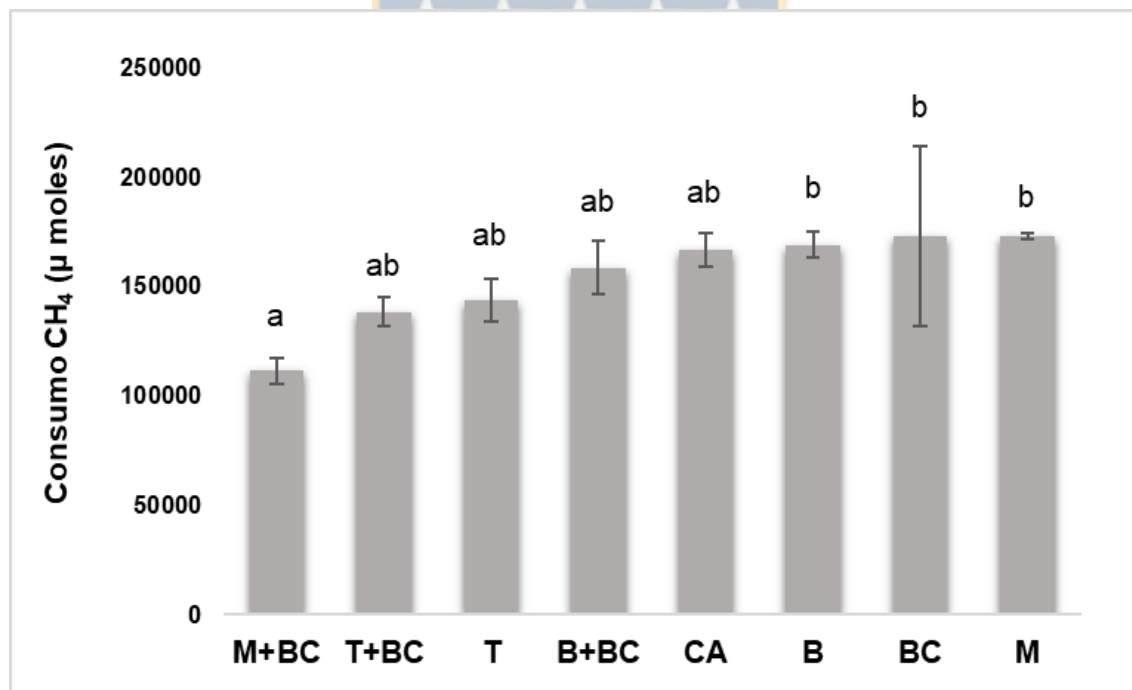
### **Biocarbón y complejo biocarbón metanótrofo**

El biocarbón cumple con los requerimientos establecidos por la certificación europea de biocarbón (EBC, 2012) para que un material carbonoso sea reconocido como biocarbón: N%: 0,26; C%: 73,97; H%: 3,46; S%:0,00. En la Figura 4 (a y b) se observa la matriz utilizada en el complejo biocarbón-metanótrofo, con poros cercanos a los 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. El biocarbón es un material poroso (microporos: poros menores a 2 nm de diámetro, mesoporos: entre 2 nm y 50 nm de diámetro, y macroporos: poros mayores a 50 nm de diámetro (Downie et al., 2015)), que conserva la estructura microscópica del material de origen, por lo que su porosidad está dada por traqueidas, vasos y rayos del material vegetal (Caguiat *et al.*, 2018). En la Figura 5 (a y b), se observan bacterias del consorcio B adheridas a la matriz, bacilos cortos cercanos a 1,5  $\mu\text{m}$  de largo.

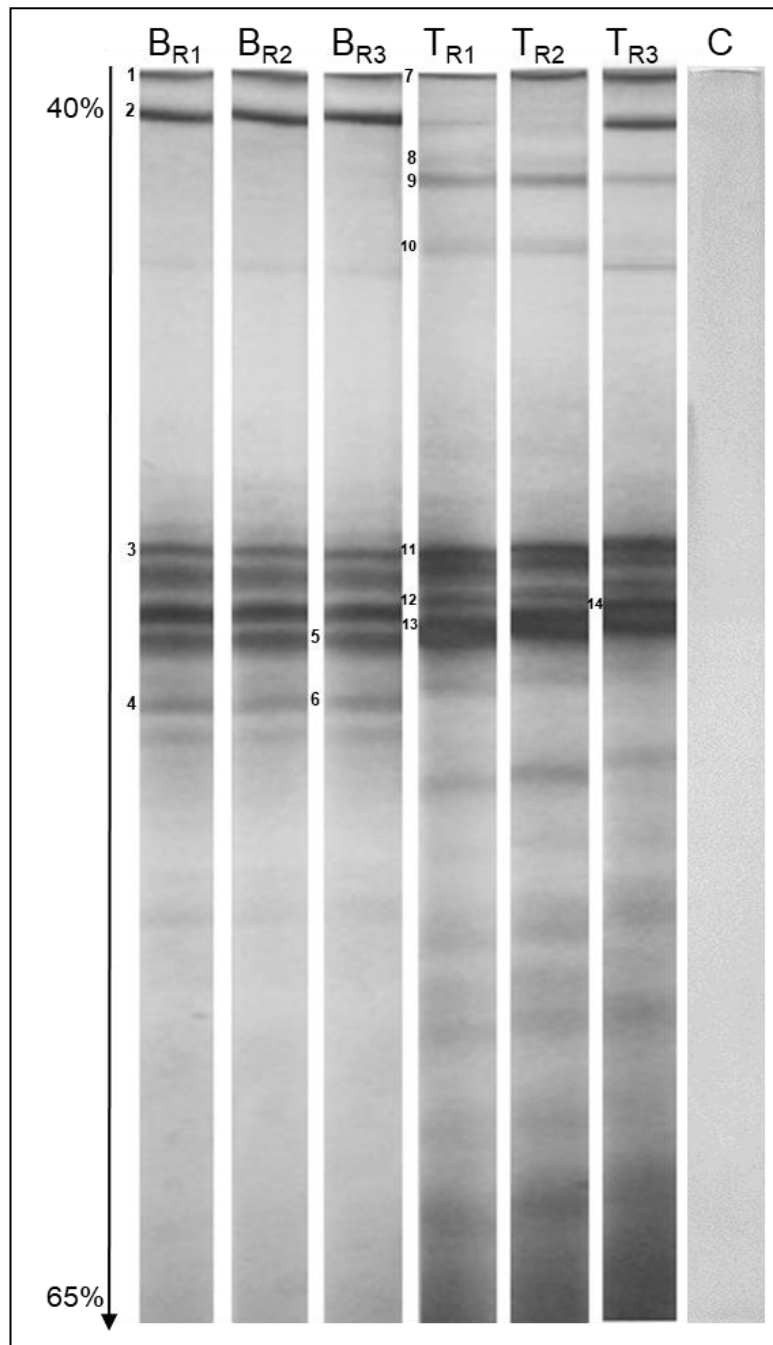
### **Disminución de metano**

El resultado del ensayo de consumo de  $\text{CH}_4$  (Fig. 6) muestra la disminución de la concentración del gas al día 6 de incubación. No se observaron diferencias entre los tratamientos y el control absoluto ( $p > 0,05$ ), sin embargo, la disminución de  $\text{CH}_4$  por el biocarbón (BC), consorcio B y la mezcla de los consorcios B y T (M), 169171  $\mu$  moles  $\text{CH}_4$ , 172995  $\mu$  moles  $\text{CH}_4$  y 173044  $\mu$  moles  $\text{CH}_4$  respectivamente, fue mayor al complejo biocarbón-mezcla (M+BC), que obtuvo una baja del 111496  $\mu$  moles de  $\text{CH}_4$  al día 6 ( $p < 0,05$ ). La disminución de  $\text{CH}_4$  por BC se explica por la estructura porosa del biocarbón que favorece la adsorción de gases (Billemont *et al.*, 2013), siendo un material destacado pues la adsorción incluso ocurre en altos niveles de humedad, lo que resulta en una mayor oxidación de  $\text{CH}_4$  pues entrega un ambiente adecuado para microorganismos metanótrofos (Sadasivam y Reddy, 2015), siendo la abundancia y diversidad de estos microorganismos el factor de mayor implicancia en la disminución de  $\text{CH}_4$ , frente a otros como porosidad, densidad aparente, contenido de humedad, pH, C total, nitrato y amonio (Syed et al., 2016). Sin embargo, M+BC fue el tratamiento con menor disminución de  $\text{CH}_4$ , lo que podría explicarse en el proceso de

formación del complejo biocarbón-metanótrofo, pues se realizaron inmobilizaciones pasivas durante 10 días, con el objetivo de obtener formación de biofilm joven, asegurando una mayor proporción de bacterias metanótrofas (Arcangeli y Arvin, 1999; Xie et al., 2018), sin embargo, como se mencionó anteriormente, los metanótrofos potencian su actividad al formar consorcios con otros microorganismos, ya sea metanótrofas de diferentes géneros y familias, o bacterias no metanótrofas (Ho et al., 2014; Hoefman et al., 2010; Iguchi et al., 2011; Jeong et al., 2014). Syed et al. (2016) al evaluar la disminución de  $\text{CH}_4$  por biocarbón, concluyeron que es necesario un tiempo de incubación de 58 días para que el material alcance una remoción eficiente del gas (superior al 80%), debido a que todos los materiales utilizados pasan por una fase nula de disminución atribuido a la competencia de los microorganismos.



**Figura 6: Variación de  $\text{CH}_4$  al día 6.** Disminución de  $\text{CH}_4$  de cultivos metanótrofos solos y cultivos metanótrofos unidos a biocarbón. **CA:** control absoluto (medio de cultivo NMS estéril), **BC:** biocarbón **B:** cultivo células blancas, **B+BC:** cultivo células blancas + biocarbón, **T:** cultivo células transparentes, **T+BC:** cultivo células transparentes + biocarbón, **M:** mezcla de cultivo B y T, y **M+BC:** Cultivo M + biocarbón. *Fuente: Elaboración propia*



**Figura 7: Patrones DGGE de productos de PCR de la región V3 del gen ribosomal 16S obtenidos de consorcios aislados.** Los carriles B y T corresponden a consorcios blancos y traslúcidos, respectivamente, siendo R cada una de sus repeticiones, C corresponde al control. Las bandas indicadas por los números se sometieron a secuenciación (resultados en Tabla 4). La flecha a la izquierda indica la dirección de la electroforesis DGGE y el número de porcentaje indica el gradiente de denaturación. *Fuente: Elaboración propia*

### Determinación y caracterización de consorcios bacterianos

Los perfiles de huellas dactilares DGGE de los consorcios metanótrofos obtenidos se muestran en la Fig. 7, donde se utilizó gradiente de denaturación de 40 - 65% de urea - formamida con el objetivo de detectar metanótrofos tipo I, ya que el contenido de G+C en su ADN, varía desde un 49% hasta 60% (Hanson y Hanson, 1996; Jiang et al., 2010).

En la Tabla 3 se muestra la riqueza de OTUs, según el número de bandas principales presentes en los perfiles de PCR-DGGE, los perfiles del consorcio T (TR<sub>1</sub> a TR<sub>3</sub>) mostraron un número mayor de bandas que B (BR<sub>1</sub> a BR<sub>3</sub>), diferencia que también se observa en los índices de diversidad, los que corroboran que el consorcio T presenta una mayor diversidad microbiana en relación a B. El análisis de cluster indica que ambos consorcios presentan un porcentaje de similitud de 41,1% (Figura 8).

**Tabla 3. Diversidad microbiana calculados a partir de los patrones de bandas de DGGE**

Consorcio	Riqueza de OTUs (R)	Índice de Shannon (H)	Índice de Simpson* (D <sub>si</sub> )	Diversidad (D) (1 - D <sub>si</sub> )	
<b>B</b>	R1	13	1,01	0,1117	0,8883
	R2	12	0,99	0,1216	0,8784
	R3	12	0,98	0,1164	0,8836
<b>T</b>	R1	17	1,12	0,0840	0,9160
	R2	17	1,15	0,0793	0,9207
	R3	15	1,07	0,0951	0,9049

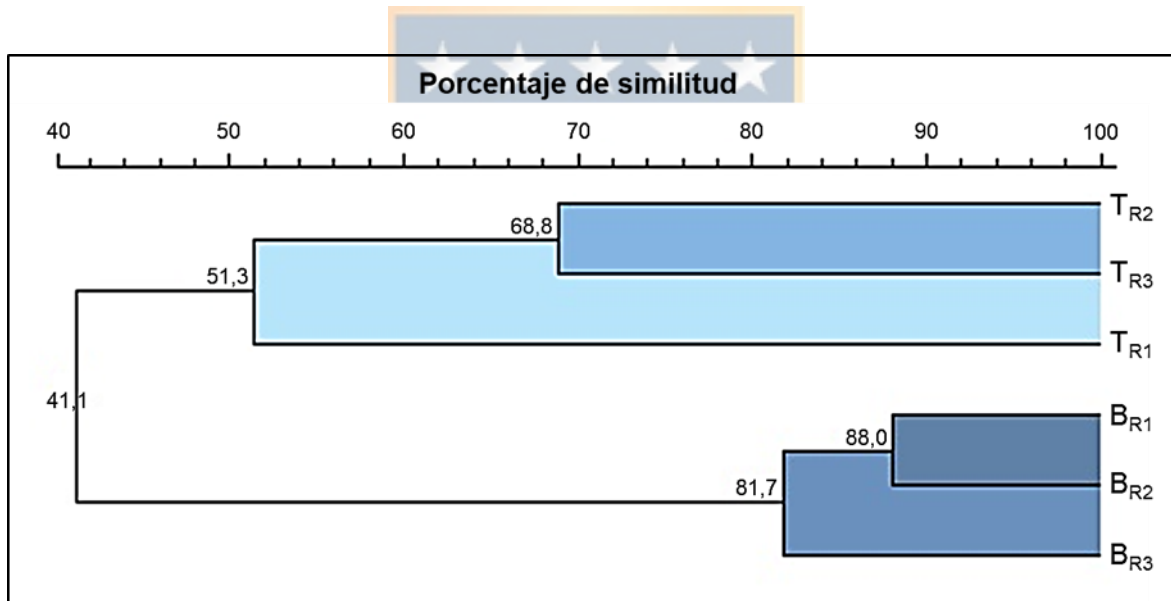
\*Los valores cercanos a cero corresponden a ecosistemas altamente diversos o heterogéneos y los valores cercanos a uno corresponden a ecosistemas más homogéneos (Lv et al., 2012).

Fuente: *Elaboración propia*

En la determinación de bandas DGGE, la similitud de todas las secuencias de bandas fue > 85% en comparación con las disponibles en la base de datos GenBank. El total de bandas secuenciadas correspondientes al consorcio B coinciden con secuencias del género *Flavobacterium*, mientras que el consorcio T



presentó secuencias coincidentes a los géneros *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Flavobacterium*. Los géneros determinados corresponden a bacterias heterótrofas que comúnmente cohabitan con metanótrofos. Chidambarampadmavathy *et al.* (2017) identificó en consorcios metanótrofos aislados desde biomasa de compost bacterias del género *Flavobacterium* como heterótrofas con mayor abundancia en el consorcio (30%) en bajas concentraciones de CH<sub>4</sub>, donde cohabitaban con el género *Pseudomonas* en una menor proporción (<10%). Iguchi *et al.* (2011) identifica a *Flavobacterium sp.* WG2 como una de las 5 cepas bacterianas que causa un efecto positivo sobre el crecimiento metanótrofo y la oxidación de metano de *M. miyakonense* HT12. Y en otro estudio se comprueba que *Pseudomonas putida* promueve el crecimiento de *Methylomonas spp.* (Ho *et al.*, 2014).



**Figura 8: Dendrograma realizado mediante análisis de clúster según posición de las bandas visualizadas en DGGE de las comunidades bacterianas presentes obtenidos de consorcios aislados.** Los carriles B y T corresponden a consorcios blancos y traslúcidos, respectivamente, siendo R cada una de sus repeticiones. Se utilizó coeficiente de similitud DICE con una optimización de un 0,5%, una tolerancia de un 0,5% y el algoritmo de agrupación UPGMA. *Fuente: Elaboración propia*



**Tabla 4. Resultados de la determinación de bandas DGGE seleccionadas a partir de la huella dactilar de consorcios metanótrofos.**

<b>No.<sup>a</sup></b>	<b>Secuencia más cercana (n. ° de acceso NCBI)</b>	<b>Identidad max. (%)<sup>b</sup></b>
1	Flavobacterium sp. clon BS01-1 no cultivada ( FJ416615.1)	95,83%
2	Flavobacterium sp. cepa PGS11 (MK602454.1)	98,94%
3	Flavobacterium johnsoniae cepa T2006 (MF737174.1)	97,39%
4	Flavobacterium sp. cepa PGS11 (MK602454.1)	93,26%
5	Flavobacterium sp. cepa S_471_P0 ( MK179195.1)	100,00%
6	Flavobacterium sp. no cultivado (JX270632.1)	94,74%
7	Pseudomonas fluorescens (AB927867.1)	88,24%
8	Pseudomonas sp. no cultivado (EU919222.1)	94,71%
	Shewanella sp. no cultivado ( EU919217.1)	92,61%
9	Pseudomonas sp. no cultivadas ( EU919222.1)	94,71%
10	Bacteria no cultivada clon gxw14 (GQ228543.1)	100,00%
	Pseudomonas fluorescens (EF408245.1)	96,77%
11	Pseudomonas stutzeri cepa ZGS6 ( KU318405.1)	97,56%
12	Flavobacterium sp. cepa TH167 ( KU569908.2)	92,47%
13	Flavobacterium sp. no cultivado clon ac-6 (KY857620.1)	93,06%
14	Pseudomonas fluorescens cepa MB102 (AB927867.1)	87,39%

a Las bandas están numeradas de acuerdo a la Fig. 7.

b La identidad representa el % de identidad compartida con las secuencias en las bases de datos GenBank

*Fuente: Elaboración propia*

¿Por qué no se encontraron bandas coincidentes con bacterias metanótrofas descritas en el consorcio? A partir del patrón de bandas de DGGE se recuperaron las bandas más intensas para amplificar y secuenciar, al evaluar concentraciones bajas de CH<sub>4</sub> aumenta la disponibilidad de O<sub>2</sub> potenciando el crecimiento de heterótrofos (Chidambarampadmavathy et al., 2017; Hršak y Begonja, 2000) y al utilizar partidores universales para bacteria, aumentó la probabilidad de recuperar bandas correspondientes a bacterias heterótrofas del consorcio. Recordemos el estudio realizado por Jeong et al. (2014), al evaluar diferentes proporciones de

metanótrofo y heterótrofos del consorcio, se mejoró la actividad metanótrofa en la proporción 9:1 (*Sphingopyxis sp* : *Methylocystis sp*), por lo que el no distinguir secuencias coincidentes con bacterias metanótrofas no significa que éstas no existan en los consorcios aislados. Para identificarlas se recomienda utilizar partidores que codifiquen para la enzima MMO, responsable del paso de conversión inicial de metano a metanol (Knief, 2015).

## CONCLUSIÓN

Los consorcios B y T aislados desde purín de lechería presentan actividad metanótrofa, sin embargo, el tiempo de formación del complejo biocarbón-metanótrofo no fue suficiente para rechazar la hipótesis de trabajo, por lo tanto, la matriz de biocarbón no amplifica la actividad metanótrofa de éstos, por lo que se recomienda aumentar el periodo de formación del complejo por un mínimo de 58 días para evitar la fase nula de disminución de CH<sub>4</sub> mientras los microorganismos se adaptan al nuevo medio. Las bacterias heterótrofas determinadas en los consorcios forman parte importante en la oxidación de CH<sub>4</sub>; determinar la totalidad de los microorganismos que conforman estos aislados permitiría mejorar las condiciones en estudios posteriores, potenciando la mitigación de este gas de efecto invernadero.

## LITERATURA CITADA

Alef, K. 1995. Estimation of the hydrolysis of fluorescein diacetate. En *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. pp.232-233. London: Alef, K. y Nannipieri, P. (Eds.).

Alitalo, A., Nikama, J. y Aura, E. 2015. Fate of faecal indicator organisms and bacterial diversity dynamics in a series of continuously fed aerated tank reactors treating dairy manure. *Ecological Engineering* 81: 363-372.

Amaral, J. A. y Knowles, R. 1995. Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. *FEMS Microbiology Letters* 126(3): 215-220.

Arcangeli, J. y Arvin, E. 1999. Modeling the growth of a methanotrophic biofilm: estimation of parameters and viability. *Biodegradation* 10: 177-191.

Billemont, P., Coasne, B. y De Weireld, G. 2013. Adsorption of Carbon Dioxide, Methane, and Their Mixtures in Porous Carbons: Effect of Surface Chemistry, Water Content, and Pore Disorder. *Langmuir* 29(10): 3328-3338.

Caguiat, J. N., Yanchus, D. S., Gabhi, R. S., Kirk, D. W. y Jia, C. Q. 2018. Identifying the structures retained when transforming wood into biocarbon. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 136: 77-86.

Cantera, S., Lebrero, R., García-Encina, P. A. y Muñoz, R. 2016. Evaluation of the influence of methane and copper concentration and methane mass transport on the community structure and biodegradation kinetics of methanotrophic cultures. *Journal of Environmental Management* 171: 11-20.

Cifuentes, L. y Meza, F. 2008. Cambio Climático: consecuencias y desafíos para Chile. Vol. Serie N° 19, pp. 22.

Chamy, R. y Vivanco, E. 2007. Potencial de biogás: Identificación y clasificación de los distintos tipos de biomasa disponibles en Chile para la generación de biogás. pp. 80. Santiago de Chile: Proyecto Energías Renovables No Convencionales en Chile.

Chidambarampadmavathy, K., Karthikeyan, O. P., Huerlimann, R., Maes, G. E. y Heimann, K. 2017. Response of mixed methanotrophic consortia to different methane to oxygen ratios. *Waste Manag* 61: 220-228.

Doménech, J. 2007. Huella ecológica y desarrollo sostenible. Madrid: AENOR. Asociación Española de Normalización y Certificación.

Downie, A., Crosky, A. y Munroe, P. 2015. Chapter 2: Physical properties of biochar. En *Biochar for environmental management: science, technology and implementation*. pp.13-32. New York: Lehman, J. y Joseph, S. (Eds.).

Du, J., Sun, P., Feng, Z., Zhang, X. y Zhao, Y. 2016. The biosorption capacity of biochar for 4-bromodiphenyl ether: study of its kinetics, mechanism, and use as a carrier for immobilized bacteria. *Environmental Science and Pollution Research* 23(4): 3770-3780.

EBC. 2012. European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar.' European Biochar Foundation (EBC). Arbaz, Switzerland. Version 8.3E of 1st September 2019  
<https://www.europeanbiochar.org/en/download> 10.13140/RG.2.1.4658.7043

EPA. 2017, Febrero. Greenhouse Gas Emissions: Understanding Global Warming Potentials [En línea]. United States Environmental Protection Agency, official website. Recuperado en <https://www.epa.gov/ghgemissions/understanding-global-warming-potentials#main-content> [8 octubre 2019].

Finch, H. J. S., Samuel, A. M. y Lane, G. P. F. 2014. 4 - Fertilisers and manures. En *Lockhart & Wiseman's Crop Husbandry Including Grassland (Ninth Edition)*. pp.63-91. Woodhead.

Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D. W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D. C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M. y Van Dorland, R. M., H.L. 2007. Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. En *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. pp.129-234. Cambridge, UK:

Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M. y Miller, H. L. (Eds.).

Green, S. J., Michel, F. C., Jr., Hadar, Y. y Minz, D. 2004. Similarity of bacterial communities in sawdust- and straw-amended cow manure composts. *FEMS Microbiol Lett* 233(1): 115-123.

Green, V., Stott, D. y Diack, M. 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 693-701.

Hale, L., Luth, M., Kenney, R. y Crowley, D. 2014. Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation. *Applied Soil Ecology* 84: 192-199.

Hanson, R. y Hanson, E. 1996. Methanotrophic Bacteria. *Microbiological reviews* 60(2): 439-471.

Ho, A., de Roy, K., Thas, O., De Neve, J., Hoefman, S., Vandamme, P., Heylen, K. y Boon, N. 2014. The more, the merrier: heterotroph richness stimulates methanotrophic activity. *The Isme Journal* 8: 1945.

Hobbs, P. R., Sayre, K. y Gupta, R. 2008. The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 363(1491): 543-555.

Hoefman, S., Boon, N., De Vos, P. y Heylen, K. 2010. Protecting the fragile: Preservation of methanotrophic bacteria. *Cryobiology* 61(3): 367-367.

Hršak, D. y Begonja, A. 2000. Possible Interactions within a Methanotrophic-Heterotrophic Groundwater Community Able To Transform Linear Alkylbenzenesulfonates. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10): 4433-4439.

IEA. 2018. CO2 Emissions from Fuel Combustion 2018 Highlights. Todos los derechos reservados.

Iguchi, H., Yurimoto, H. y Sakai, Y. 2011. Stimulation of Methanotrophic Growth in Cocultures by Cobalamin Excreted by Rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology* 77(24): 8509.

IPCC. 2014. Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. pp. 157. IPCC, Ginebra, Suiza: Equipo principal de redacción, R.K. Pachauri y L.A. Meyer (Eds.).

Jeong, S.-Y., Cho, K.-S. y Kim, T. G. 2014. Density-dependent enhancement of methane oxidation activity and growth of *Methylocystis* sp. by a non-methanotrophic bacterium *Sphingopyxis* sp. *Biotechnology Reports* 4: 128-133.

Jiang, H., Chen, Y., Jiang, P., Zhang, C., Smith, T. J., Murrell, J. C. y Xing, X.-H. 2010. Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochemical Engineering Journal* 49(3): 277-288.

Knief, C. 2015. Diversity and Habitat Preferences of Cultivated and Uncultivated Aerobic Methanotrophic Bacteria Evaluated Based on *pmoA* as Molecular Marker. *Frontiers in microbiology* 6: 1346-1346.

Le Mer, J. y Roger, P. 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology* 37(1): 25-50.

Lopez, J. C., Quijano, G., Souza, T. S., Estrada, J. M., Lebrero, R. y Munoz, R. 2013. Biotechnologies for greenhouse gases (CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, and CO<sub>2</sub>) abatement: state of the art and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(6): 2277-2303.



Lv, X.-C., Weng, X., Zhang, W., Rao, P.-F. y Ni, L. 2012. Microbial diversity of traditional fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine as determined by PCR-mediated DGGE. *Food Control* 28(2): 426-434.

McGinnis, S. y Madden, T. L. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic acids research*, 32 (Web Server issue), W20–W25. doi:10.1093/nar/gkh435

MMA, Oficina Cambio Climático del Ministerio del Medio Ambiente. 2014. Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero de Chile, Serie Temporal 1990-2010 pp. 202. Chile: Ministerio del Medio Ambiente.

Muñoz, C., Paulino, L., Monreal, C. y Zagal, E. 2011. Greenhouse gas (CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O) emissions from soils: A review. *Chilean journal of agricultural research* 70(3): 485-497.

Murrell, J. 1994. Molecular genetics of methane oxidation. *Biodegradation* 5: 145-149.

Muyzer, G., de Waal, E. C. y Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59(3): 695-700.

Muyzer, G. y Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73(1): 127-141.

Nazaries, L., Murrell, J. C., Millard, P., Baggs, L. y Singh, B. K. 2013. Methane, microbes and models: fundamental understanding of the soil methane cycle for future predictions. *Environmental Microbiology* 15(9): 2395-2417.

Núñez-Colín, C. A. y Escobedo-López, D. 2011. Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana* 22(2): 415-427.

ODEPA. s.f. Estadísticas económicas. Recuperado en <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/estadisticas-economicas> [8 octubre 2019].

Peters, J., Combs, S. M., Hoskins, B., Jarman, J., Kovar, J. L., Watson, M. E., Wolf, A. M. y Wolf, N. 2003. Recommended methods of manure analysis. A3769, Cooperative Extension, Univ. of Wisconsin, Madison, WI.

Prendez, M. y Lara-Gonzalez, S. 2008. Application of strategies for sanitation management in wastewater treatment plants in order to control/reduce greenhouse gas emissions. *J Environ Manage* 88(4): 658-664.

Reyes, M. 2014. Estudio de las poblaciones bacterianas y su relación con los parámetros físico-químicos del tratamiento de aguas residuales., Universidad Politécnica de Valencia.

Rodwell, A. W. 1983. Cultivation and nutrition. En *Methods in Mycoplasmaology*. Razin, S. y Tully, J. G. (Eds.).

Rondon, M. A., Molina, D., Hurtado, M., Ramirez, J., Lehmann, J., Major, J. y Amezquita, E. 2006. Enhancing the productivity of crop and grasses while reducing greenhouse gas emissions through bio-char amendments to unfertile



tropical soil's. En 18th World Congress of Soil Science. Philadelphia, Pennsylvania, USA

Sadasivam, B. Y. y Reddy, K. R. 2015. Adsorption and transport of methane in biochars derived from waste wood. *Waste Management* 43: 218-229.

Salazar, F. 2012a. Capítulo 1: Dónde y cuánto purín se produce en un predio lechero. En *Manual de manejo y utilización de purines de lechería*. pp.7-16. Osorno: Salazar, F. (Eds.).

Salazar, F. 2012b. Capítulo 2: Muestreo y caracterización de purines de lechería. En *Manual de manejo y utilización de purines de lechería*. pp.17-24. Osorno: Salazar, F. (Eds.).

Seinfeld, J. H. 2011. Insights on global warming. *AIChE Journal* 57(12): 3259-3284.

Serrano-Silva, N., Sarria-Guzmán, Y., Dendooven, L. y Luna-Guido, M. 2014. Methanogenesis and Methanotrophy in Soil: A Review. *Pedosphere* 24(3): 291-307.

Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M. y De Haan, C. 2009. La larga sombra del ganado - Problemas ambientales y opciones. pp. 465. FAO (Eds.).

Stepniewska, Z. y Kuzniar, A. 2014. Cultivation and detection of endophytic aerobic methanotrophs isolated from Sphagnum species as a perspective for environmental biotechnology. *AMB Express* 4: 58.

Syed, R., Sagggar, S., Tate, K. R. y Rehm, B. 2016. Assessment of farm soil, biochar, compost and weathered pine mulch to mitigate methane emissions. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(21): 9365-9379.

Thies, J. E. y Rillig, M. C. 2015. Chapter 6: Characteristics of biochar: biological properties. En *Biochar for environmental management: science, technology and implementation*. pp.85-105. New York: Lehman, J. y Joseph, S. (Eds.).

Thies, J. E., Rillig, M. C. y Graber, E. R. 2015. Chapter 13: Biochar effects on the abundance, activity and diversity of the soil biota. En *Biochar for environmental management: science, technology and implementation (2nd edition)*. pp.327-389. New York: Lehman, J. y Joseph, S. (Eds.).

Van Zwieten, L., Singh, B., Joseph, S., Kimber, S., Cowie, A. y Chan, K. Y. 2015. Chapter 13: Biochar and emissions of non-CO<sub>2</sub> greenhouse gases from soil. En *Biochar for environmental management: science, technology and implementation*. pp.227-250. New York: Lehman, J. y Joseph, S. (Eds.).

Whitehead, T. R., Spence, C. y Cotta, M. A. 2013. Inhibition of hydrogen sulfide, methane, and total gas production and sulfate-reducing bacteria in in vitro swine manure by tannins, with focus on condensed quebracho tannins. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(18): 8403-8409.

Xie, T., Yang, Q., Winkler, M. K. H., Wang, D., Zhong, Y., An, H., Chen, F., Yao, F., Wang, X., Wu, J. y Li, X. 2018. Perchlorate bioreduction linked to methane oxidation in a membrane biofilm reactor: Performance and microbial community structure. *J Hazard Mater* 357: 244-252.

Xing, X.-H., Wu, H., Luo, M.-F. y Wang, B.-P. 2006. Effects of organic chemicals on growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochemical Engineering Journal* 31(2): 113-117.