



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias Mención
Microbiología

Caracterización Molecular y Estudio Funcional de Bacterias Metanotróficas Aisladas desde Lagunas y Bosques de la Región del Bío Bío, Chile

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Mención Microbiología

EMKY HÉCTOR VALDEBENITO ROLACK
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Homero Urrutia Briones
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Tesis realizada en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Homero Urrutia Briones

Profesor Tutor

Departamento de Microbiología

Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Germán Aroca Arcaya

Profesor Co-Tutor

Departamento de Ingeniería Bioquímica

Facultad de Ingeniería

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Dr. Carlos González Correa

Departamento de Microbiología

Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Gerardo González Rocha

Departamento de Microbiología

Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Luis Collado González

Instituto de Bioquímica & Microbiología

Facultad de Ciencias

Universidad Austral de Chile

Dr. Víctor Campos Araneda

Director Programa Doctorado en Ciencias
Biológicas Mención Microbiología.

Departamento de Microbiología

Facultad de Ciencias Biológicas

Esta tesis fue realizada con ayuda de CONICYT a través de sus becas:

- 1) Beca CONICYT de Doctorado en Chile (marzo 2013 - agosto 2015)
- 2) Beca de Apoyo a la Realización de Tesis Doctoral 21130221DOCTORADO2013 (periodo 2014-2015).



1. TABLA DE CONTENIDO

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	5
II.1. MOBs y el ciclo del carbono.....	7
II.2. MOBs.....	10
II. 3. Bioquímica de la oxidación del CH ₄	14
II.3.1. Metano Monooxigenasa soluble (sMMO).....	15
II.3.2. Metano Monooxigenasa particulada (pMMO).....	17
II.3.3. Oxidación de CH ₃ OH por la MDH.....	19
II.3.4. Oxidación de HCHO por una vía lineal.....	20
II.3.5. Oxidación de HCHO hapterina dependiente.....	21
II.3.6. Oxidación de HCOOH a CO ₂	23
II.3.7. Asimilación de HCHO por ciclo de la RuMP.....	23
II.3.8. Asimilación de HCHO por vía de las serinas.....	25
II.4. Cultivos de MOBs descritos hasta la fecha.....	27
II.4.1 <i>Methylomicrobium album</i> : modelo de las MOBs tipo I y X en este estudio.....	29
II.4.2 <i>Methylocystis</i> spp. como representante de las MOBs tipo II.....	30
II.5. Biopelículas de MOBs.....	31
II.5.1 EPS en biopelículas de MOBs.....	32
II.5.2. Soportes usados en biofiltración.....	33
II.6. Inhibición de la metanotrofia.....	34
III. HIPÓTESIS.....	43

IV. OBJETIVOS	44
V. MATERIALES Y MÉTODOS	46
V.1. Toma de Muestra	46
V.2. Medio de cultivo	47
V.3. Aislamiento y estudio de los	
cultivos en fase planctónica (suspensión)	48
V.3.1. Cultivo y aislamiento en medio NMS.....	48
V.3.2. Gas metano (CH ₄).....	49
V.3.3. Microscopía.....	50
V.3.4. Determinación cualitativa de metanotrofia.....	50
V.4. Perfil Bioquímico para identificación bacteriana	51
V.4.1. Crecimiento en medios especiales.....	51
V.4.2. Test de oxidasa y catalasa.....	51
V.5. Curva de crecimiento de cultivos en suspensión	52
V.5.1. Curva de calibración de absorbancia	
versus conteo celular.....	52
V.5.2. Curva de crecimiento en suspensión.....	52
V.5.3. Velocidad específica de crecimiento.....	53
V.5.4. Prueba estadística.....	54
V.6. Cepario	54
V.7. Desarrollo de biopelículas de MOBs	55
V.7.1. Curva de calibración para cromatografía de gas.....	56
V.7.2. Determinación de metano en cabeza de aire.....	56
V.7.3. Inhibición de la metanotrofia con H ₂ S y NH ₃	57
V.8. Inhibición de la metanotrofia y síntesis del ARNm	
de <i>pmoA1</i> y <i>pmoA2</i>	57
V.8.1. Extracción de ARN.....	58
V.8.2. Determinación de la síntesis de los ARNm	
de los genes <i>pmoA1</i> y <i>pmoA2</i> , mediante RT-qPCR.....	60
V.9. Extracción de ADN	62
V.9.1. PCR para gen de ARNr 16S y secuenciación de ADN.....	63

V.9.2. Análisis de secuencias.....	63
V.9.3. Análisis estadístico.....	64
V.9.4. Correlación entre expresión relativa de los mensajeros para <i>pmoA</i> y la tasa de consumo de CH ₄ en biopelículas.....	65
VI. RESULTADOS.....	66
VI. 1 Toma de muestra.....	66
VI. 2. Cultivo y aislamiento.....	67
VI.3. Crecimiento en medios especiales.....	68
VI.4. Test de oxidasa y catalasa.....	71
VI.5 Curva de calibración.....	72
VI.5.1. Curva de crecimiento.....	72
VI.5.2. Velocidad específica de crecimiento.....	73
VI.5.3. Prueba estadística.....	74
VI.6. Cepario.....	75
VI.7. Desarrollo de biopelículas de MOBs.....	75
VI.7.1. Curva de calibración para cromatografía de gas.....	83
VI.7.2. Determinación de metano en cabeza de aire.....	83
VI.7.3 Inhibición de la metanotrofia con H ₂ S y NH ₃	84
VI.8. Inhibición de la metanotrofia y síntesis del ARNm de los genes <i>pmoA1</i> y <i>pmoA2</i>.....	86
VI.9. Correlación entre síntesis de ARNm del gen <i>pmoA1</i>, <i>pmoA2</i> y tasa de consumo de CH₄.....	91
VI.10. Análisis de secuencias del gen de ARNr 16S.....	92

VII. DISCUSIÓN.....	94
VIII. CONCLUSIÓN.....	104
IX. REFERENCIAS.....	106



2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto invernadero: diagrama simplificado.....	5
Figura 2. Ciclo global del carbono.....	8
Figura 3. Concentración de CH ₄ promedio zonal.....	9
Figura 4. Microscopía electrónica de transmisión (MET), que muestra la disposición de las ICM.....	12
Figura 5. Esquema de la bioquímica de la oxidación del metano.....	15
Figura 6. Vía de la RuMP para la asimilación del formaldehído.....	25
Figura 7. Ciclo de las serinas para la asimilación del formaldehído.....	26
Figura 8. Actividad metanotrófica en suelos de diferentes ecosistemas.....	28
Figura 9. Inhibición de la oxidación de CH ₄ por compuestos sulfurados.....	35
Figura 10. Correlación entre la expresión del gen <i>pmoA</i> en la fase exponencial de crecimiento de <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	37
Figura 11. Expresión del gen <i>pmoA</i> en <i>Methylacidiphilum kamchatkense</i> , creciendo a pH 3,5 y 55 C°	38
Figura 12. Efecto del incremento en la concentración de NH ₄ ⁺ sobre la oxidación de CH ₄	39
Figura 13. Número de copias del gen <i>pmoA</i> en comunidades de MOBs de suelo y raíces.....	41
Figura 14. Ejemplos de viales positivos y negativos con medios especiales.....	70
Figura 15. Viales de cultivo luego de una semana de incubación.....	71
Figura 16. Curva de calibración de absorbancia a 600 nm versus el conteo celular en células mL ⁻¹	72
Figura 17. Curva de crecimiento en fase planctónica.....	73
Figura 18. Velocidades de crecimiento específicas (μ) en fase planctónica.....	74
Figura 19. Curva de crecimiento en biopelículas para distintos materiales de soporte.....	76
Figura 20. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de biopelículas.....	77, 78

Figura 21. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de una biopelícula de la cepa <i>Methylocystis</i> sp. ATCC 49242	79
Figura 22. Velocidades de crecimiento específicas (μ_t) en biopelículas para diferentes materiales de soporte.....	80
Figura 23. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser (CSLM).....	81
Figura 24. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	82
Figura 25. Curva de calibración de cromatografía de gas para CH ₄	83
Figura 26. Eficiencia de consumo de metano ($\text{nmol} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) para biopelículas en polietileno	84
Figura 27. Cinética de consumo de metano para biopelículas.....	85
Figura 28. Efecto del tratamiento con H ₂ S y NH ₃ en la tasa en el consumo de CH ₄ ($\text{nmol} \text{célula}^{-1} \text{h}^{-1}$) para biopelículas	86
Figura 29. Efecto del tratamiento (CH ₄ +H ₂ S, CH ₄ +H ₂ S+NH ₃ o CH ₄ +NH ₃) en la expresión relativa del gen <i>pmoA1</i> para biopelículas en polietileno.....	87
Figura 30. Efecto del tratamiento (CH ₄ +H ₂ S, CH ₄ +H ₂ S+NH ₃ o CH ₄ +NH ₃) en la expresión relativa del gen <i>pmoA2</i> para biopelículas en polietileno.....	88
Figura 31. Efecto del tratamiento (CH ₄ +H ₂ S, CH ₄ +H ₂ S+NH ₃ o CH ₄ +NH ₃) en la expresión relativa del gen <i>pmoA1</i> en cultivos planctónicos.....	89
Figura 32. Efecto del tratamiento (CH ₄ +H ₂ S, CH ₄ +H ₂ S+NH ₃ o CH ₄ +NH ₃) en la expresión relativa del gen <i>pmoA2</i> en cultivos planctónicos.....	90
Figura 33. Árbol Filogenético para el gen de ARNr 16S de los aislados bacterianos β y ϵ	93

3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración atmosférica de los gases que contienen carbono.....	8
Tabla 2. Clasificación actual de las MOBs aeróbicas.....	11
Tabla 3. Características diferenciales de MOBS tipo I, II y X.....	13
Tabla 4. Tasa de oxidación de CH ₄ bajo la adición de NH ₄ ⁺ y NO ₂ ⁻	36
Tabla 5. Modelo de lecturas por kilobases (RPKM) de los genes <i>pmoA1</i> (alta afinidad) y <i>pmoA2</i> (baja afinidad) en <i>Methylocystis</i> sp SC2.....	40
Tabla 6. Lugares y tipos de muestreo.....	46
Tabla 7. Medio de cultivo NMS modificado.....	47
Tabla 8. Muestras obtenidas en este estudio.....	66
Tabla 9. Cultivos metanotróficos obtenidos en este estudio.....	67
Tabla 10. Características macroscópicas y microscópicas de los aislados bacterianos obtenidos en este estudio.....	68
Tabla 11. Crecimiento de aislados en medios especiales.....	69
Tabla 12. Tests de oxidasa y catalasa.....	72
Tabla 13. Valores de P de test ANOVA de una vía y t student.....	75
Tabla 14. Correlación entre expresión relativa del ARNm de <i>pmoA1</i> y la tasa de consumo de CH ₄ en biopelículas.....	91
Tabla 15. Correlación entre expresión relativa del ARNm de <i>pmoA2</i> y la tasa de consumo de CH ₄ en biopelículas.....	92

I. RESUMEN

Industrias de diverso tipo producen gases de efecto invernadero (GI), principalmente el agua (H_2O), dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4), siendo este último el más importante, el que se ha incrementado de valores preindustriales de 715 ppb a 1.774 ppb en los últimos años. Los métodos tradicionales de remoción de estos componentes no son económicamente óptimos, ni eficientes. Por ello, la biofiltración surge como una alternativa económica y eficaz, en la que una biopelícula microbiana degrada el contaminante y no es necesaria una extensiva mantención. Las bacterias oxidadoras de metano (MOBs), también llamadas metanotróficas, son los microorganismos procariontes de elección para el mencionado proceso, pues oxidan el CH_4 transformándolo en CO_2 , el que, a pesar de ser gas invernadero, contribuye en menor medida a dicho efecto. Para ello, estas bacterias utilizan la enzima metano monooxigenasa (MMO) cuyo sitio activo es codificado por el gen *pmoA*, del que hay dos tipos: *pmoA1*, para MMO de alta afinidad a CH_4 y *pmoA2*, de baja afinidad. Se sabe que la mezcla de gases presentes en las emanaciones industriales también contienen H_2S y NH_3 , los que inhiben la oxidación de CH_4 por parte de las MOBs. Hasta hoy, no se sabe con certeza si esta inhibición es originada a nivel de expresión de ARNm o a nivel enzimático. Por todo esto, es de vital importancia estudiar la oxidación de metano en microorganismos procariontes. Hoy en día, se ha caracterizado tres tipos de MOB: tipo I, tipo X y tipo II. Los primeros fijan el CH_4 por la vía de la ribulosa monofosfato (RuMP), mientras que el tercero, lo hace por la ruta de la serina. Las MOBs se hallan presentes, principalmente, en lugares como lagunas y bosques. Diversos cultivos y cepas han sido descritas hasta

la fecha, y se ha informado que los bosques presentan la mayor actividad metanotrófica a escala global. Sin embargo no se ha comparado la eficiencia en la remoción de metano por parte de biopelículas obtenidas desde cultivos de muestras de los lugares antes mencionados, así como tampoco se ha investigado la expresión comparativa de los ARNm de los genes clave en las rutas bioquímicas de la biooxidación del CH₄, antes mencionados. Dado esto, el objetivo de este estudio fue aislar cepas de microorganismos procariontes metanotróficos desde bosques y lagunas de la octava región de Chile, y caracterizarlas molecular y funcionalmente en biopelículas, en orden de determinar cuáles cepas o cultivos oxidan metano con mayor eficiencia. A su vez, se determinó el material de soporte más adecuado para formar biopelículas de MOB. Para ello, en este estudio se cultivó dichos microorganismos al estado de biopelículas y se midió la concentración de CH₄, se realizó curvas de crecimiento en diferentes materiales de soporte, se determinó la identidad de los microorganismos vía secuenciación de ADNr 16S, se comparó la síntesis del ARNm de los genes *pmoA1* y *pmoA2*, se realizó microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía confocal de barrido láser (CSLM) para observar la formación de biopelículas y su distribución en el material de soporte más apropiado.

I.2. SUMMARY

Different kind of industries produce greenhouse gases (GHG), principally the water (H_2O), carbón dioxide (CO_2) and methane (CH_4), being the last one the most important and it has been incremented from preindustrial values of 715 ppb to 1.774 ppb in the last years. The traditional removal methods for these compounds are no economically optima, nor efficient. Thus, the biofiltration appears like an economic and effective alternative, where a microbial biofilm degrades the pollutant and no extensive mantention is needed. The methane oxidizing bacteria (MOBs), also known as methanotrophic, are the prokaryote microorganism of choice for the mentioned process, because they oxides CH_4 transforming it in CO_2 . Although the last one is a GHG, contributes in a lower degree to this effect. For that, these bacteria uses the enzyme methane monooxygenase (MMO) wich active site is codified by the gen *pmoA*, found in two types: *pmoA1*, for the high affinity MMO and the *pmoA2*, for the low affinity enzyme. It is known that in the industrial gas mix there are H_2S and NH_3 , inhibiting CH_4 MOB biooxidation. Until today, is unknown if this inhibition is originated at ARNm synthesis level or at ezymatic level. For all this, it is of huge importance the study of methane oxidation in prokaryotes. Today, has been characterized three MOBs types: I, X and II. The two firsts fixes the CH_4 by the ribulose monophosphate pathway (RuMP), besides the third one does the mentioned task by the serine pathway. The MOBs are found principally in places like lakes and forests. Different cultures and strains has been described till the date and has been reported that the forests has the higher methanotrophic activity at global level. But has not been compared the CH_4 removal efficiency by biofilms of cultures

obtained from samples of the mentioned places, nor has been researched the comparative expression of the mRNAs of the mentioned key genes involved in the CH₄ biooxidation biochemical pathways. Given that, the aim of this study was the isolation of methanotrophic prokaryote strains from forests and lakes of the Eighth region of Chile and characterize them molecular and functionally as biofilms, in order to determine which strains or cultures are more efficient. At the same time, it was researched the optimal packaging material for the MOB's biofilm formation. For that, the mentioned microorganisms were cultured as biofilms and the CH₄ concentration was measured, growth curves were realized in different packaging materials, the microorganisms identity was determined by 16S rDNA, the *pmoA1* and *pmoA2* mRNAs synthesis was measured by RT-qPCR, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and confocal scanning laser microscopy (CSLM) were made for observing the biofilm formation and the distribution in the best packaging material.

II. INTRODUCCIÓN

El efecto invernadero es el fenómeno por el cual ciertos gases atmosféricos absorben la radiación infrarroja emitida por la superficie de la Tierra, por la propia atmósfera debido a esos mismos gases, y por las nubes, reteniendo el calor en el sistema superficie-tropósfera (IPCC, 2007). La entrada de radiación solar debe estar balanceada con la salida de radiación de la superficie terrestre. Cerca de un tercio de la radiación solar entrante es reflejado, y el resto es mayormente absorbido por la superficie. Algo de la radiación calórica reflejada es absorbida por los gases de efecto invernadero (GIs) y por las nubes, manteniendo la superficie 33 °C más caliente de lo que debiera estar (Sulzman, 2000). Un aumento de los GIs produce, por ende, un aumento de la temperatura de nuestro planeta. Un esquema que ilustra este fenómeno se muestra en la Figura 1.

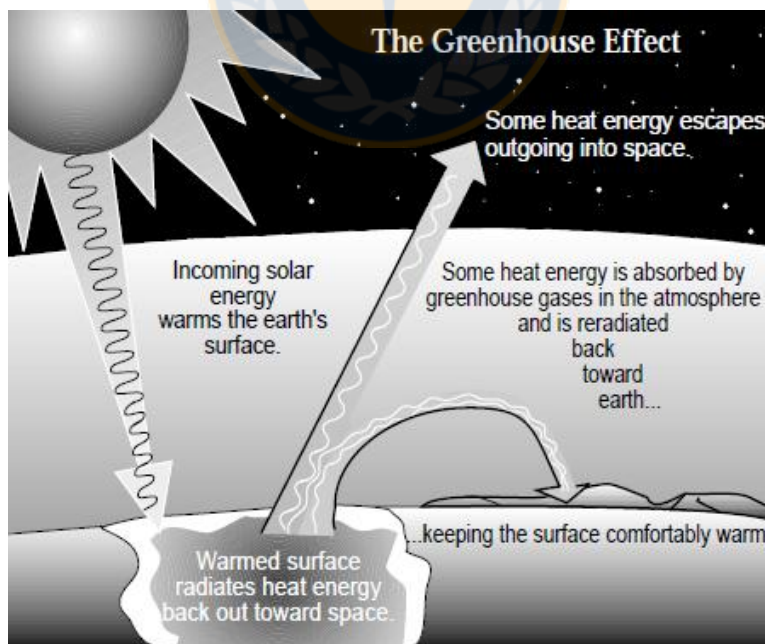


Figura 1. Efecto invernadero: diagrama simplificado (Fuente: Sulzman, 2000).

De industrias como la ganadería, plantas de tratamiento de desechos, la agricultura y plantas petroquímicas se emanan GIs, entre los que destacan el agua (H_2O), dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O) y metano (CH_4), siendo este último el más importante, debido a que se incrementa en mayor proporción a los demás gases invernadero más significativos, dándose este aumento en un 0,8% para CO_2 , un 0,3% para el N_2O , y un 1-2% para el CH_4 , por año (Kickert, 1989). Así, el CH_4 se ha incrementado de valores preindustriales de 715 ppb a 1.774 ppb en los últimos años (Yang et al., 2011). Por otro lado, el metano tiene un potencial de calentamiento global (GWP) 25 veces mayor al del CO_2 , en un horizonte de 100 años (IPCC, 2007), por lo que es un punto crucial en la disminución del efecto invernadero y la mitigación del calentamiento global. Uno de los métodos más deseables para remover el metano, es su colección y utilización para producción de energía por incineración. Sin embargo, es necesaria una cantidad mínima de 5 – 15% v/v de CH_4 para mantener una llama efectiva (Perry et al., 1997), hecho por el cual esta solución no es viable, en términos de economía y eficiencia, en la mayoría de los casos. De esta manera, la biofiltración surge como una alternativa económica y eficiente, en la que una biopelícula microbiana degrada el contaminante y no es necesaria una extensiva mantención (Hettiarachchi et al., 2011). Además, es una solución ideal para la remoción de CH_4 cuando las cantidades de este no son suficientes para una recuperación de energía económica por incineración (Stein, 2001). Las bacterias metanotróficas u oxidadoras de metano (MOBs) usan CH_4 como única fuente de carbono y energía, transformándolo en CO_2 , H_2O , biomasa y sales (Veillette et al., 2012), siendo ampliamente utilizadas en biofiltración de gas

antes mencionado. Estos microorganismos son ubicuos, encontrándose en agua dulce, mar y en ambientes terrestres como humedales, rellenos sanitarios y bosques (Svenning et al., 2003), y tienen un rol fundamental en el ciclo global del carbono (Iguchi et al., 2011). Se clasifican en tres grupos: tipo I, tipo X y tipo II. Los dos primeros tipos degradan el CH_4 por la vía de la ribulosa monofosfato (RuMP), mientras que tercer tipo, lo hace por la ruta de las serinas (Yang et al., 2011; Dianou et al., 2012).

II. 1. MOBs y el ciclo del carbono

El ciclo global del carbono (Figura 2) es la circulación de este elemento a través de la atmósfera, tierra y mar, a la forma de diferentes especies químicas, teniendo como fuente y reservorio, variados procesos fisicoquímicos y biológicos que se llevan a cabo en el planeta (Graber et al., 2008). Este ciclo es un balance de procesos naturales y las emisiones dadas por la actividad humana (US.DOE, 2008), de los gases atmosféricos que contienen carbono, más importantes, son el CO_2 , el CH_4 y el monóxido de carbono (CO) (Tabla 1) (Sulzman, 2000).

La conversión de materia orgánica compleja a CH_4 es un proceso esencial en el ciclo global del carbono, materia orgánica que puede ser oxidada aeróbicamente hasta CO_2 o descompuesta anaeróbicamente por consorcios microbianos hasta CH_4 (Kadnikov et al., 2011). De esta manera, el CH_4 es el gas orgánico más abundante en la atmósfera (Hanson y Hanson, 1996), del que cerca de un tercio es producto de la actividad geológica (Etiope y Klusman, 2002) y del metabolismo de arqueas metanogénicas bajo condiciones anaeróbicas (IPCC 2007).

Tabla 1. Concentración atmosférica de los gases que contienen carbono, más importantes. * ppm = partes por millón; por 1 millón de moléculas atmosféricas, antes de la revolución industrial habían 280 moléculas de CO₂ (Sulzman, 2000)

Gas	Estimated pre-Industrial Revolution concentration (ca. 1750)	Current concentration (1999)	Percentage of increase
Carbon dioxide	280 ppm*	367 ppm (773 Gt)	31%
Methane	0.7 ppm	1.8 ppm (5.1 Gt)	157%
Carbon monoxide	~0.05 ppm	0.05 ppm (0.1 Gt)	—

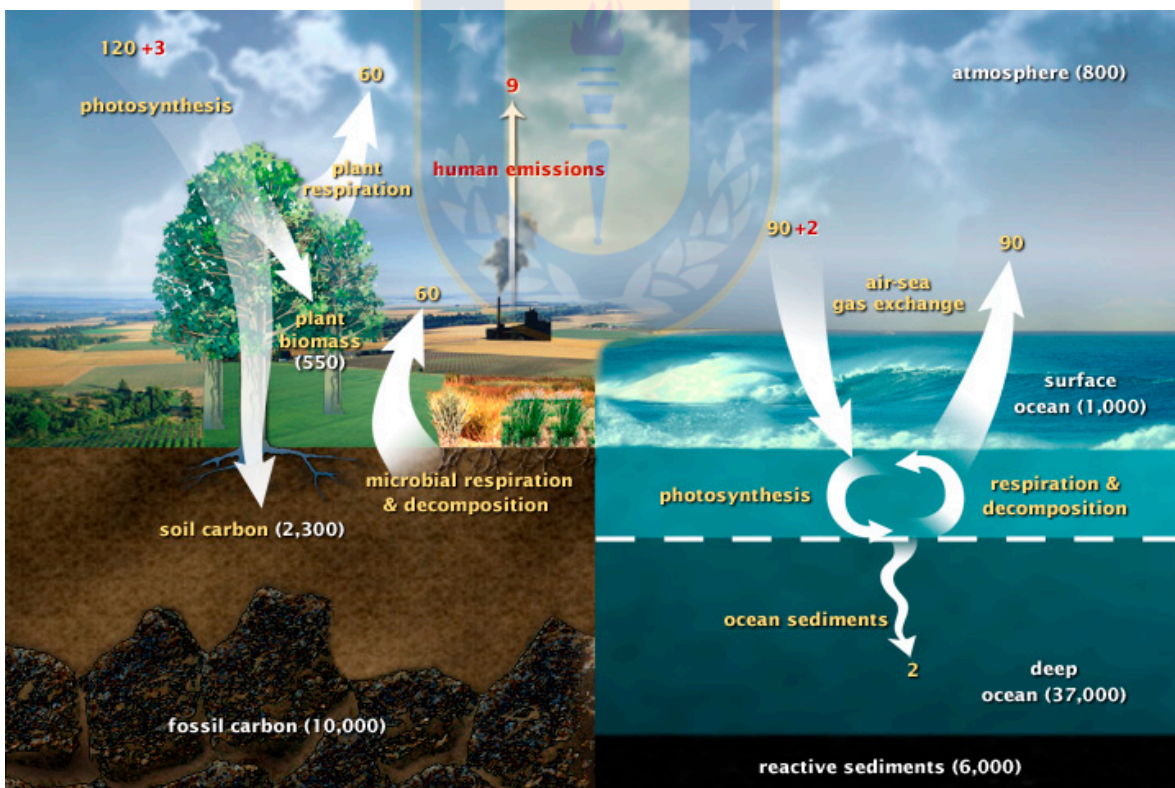


Figura 2. Ciclo global del carbono (Fuente: modificación: Riebeek, 2011; original: Graber et al., 2008).

Los otros dos tercios son producto de la industria y agricultura (Grenfell et al., 2010). Así, el metano emerge y reside en un 80 – 90% en la tropósfera (Fig 3; Grenfell et al., 2010) el que es oxidado principalmente (un 90% del CH₄ producido) a través de reacciones fotoquímicas iniciadas por el radical OH en la troposfera y estratósfera, siendo la principal fuente de H₂O en esta última capa atmosférica (Grenfell et al., 2010). Una pequeña parte del CH₄, pero significativa, se pierde por la oxidación del CH₄ a CO₂ vía MOBs en suelos (Hanson y Hanson, 1996). El CH₄ mesosférico es muy bajo debido a los procesos de oxidación antes mencionados. La conversión de CH₄ a CO₂ realizada por las MOBs, completa el ciclo del carbono, he allí su rol. El CH₄ que escapa a la oxidación microbiana, llega a la atmósfera y contribuye con el efecto invernadero (Kadnikov et al., 2011).

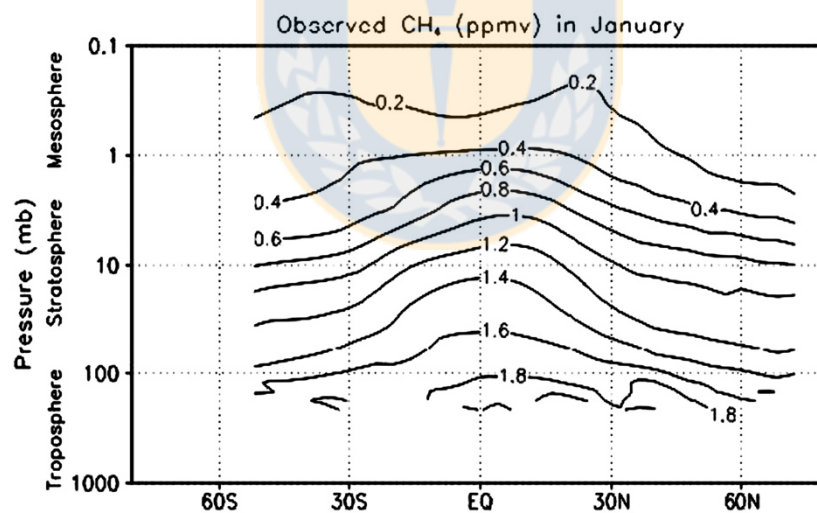


Figura 3. Concentración de CH₄ promedio zonal (partes por millón por volumen) en función de la altitud. Los datos representan el promedio de las mediciones en 11 Eneiros, desde 1992 a 2002, por el Halogen Occultation Experiment a bordo del satélite Upper Atmosphere Research (Fuente: Grenfell et al., 2010).

II.2. MOBS

Las MOBS aeróbicas, son bacterias Gram negativas que forman una pequeña parte de un grupo fisiológico de bacterias conocidas como metilotróficas. Así, las metilotróficas son aquellas bacterias que utilizan compuestos de un sólo átomo de carbono, más reducido que el ácido fórmico, como única fuente de carbono y energía (fuente de electrones), y asimilan formaldehído (HCHO) como mayor fuente de carbono celular. Mientras las bacterias metilotróficas utilizan una variedad de compuestos de un solo carbono, las MOBS utilizan sólo CH₄ (Hanson y Hanson, 1996). Antiguamente se tenía sólo data de bacterias metilotróficas aeróbicas, por lo que se pensaba que todas lo eran, incluyendo a las metanotróficas. Hoy en día se sabe que existen arqueas metanotróficas anaeróbicas (ANMEs) que al formar consorcios con bacterias reductoras de sulfato, oxidan metano en condiciones anóxicas (Shima et al., 2012), pero dado que el problema y solución que abarcará este estudio se desenvuelve en ambiente aeróbico, no se hará referencia a ellas. De esta manera, se considera a las MOBS como bacterias aeróbicas estrictas, Gram negativas y clasificadas en tres grupos principalmente según su manera de asimilar el formaldehído. Dentro de la subclase *α-Proteobacteria*, se encuentran las MOBS tipo I y tipo X (Tabla 2), cuya característica común es la asimilación del formaldehído por la vía de la RuMP, y su diferencia es principalmente dada por su morfología, contenido de algunas enzimas y temperatura de crecimiento (Hanson y Hanson, 1996; Trotsenko y Murrell, 2008).

Tabla 2. Clasificación actual de las MOBs aeróbicas (Fuente: Trotsenko y Murrell, 2008).

GAMMAPROTEOBACTERIA		ALPHAPROTEOBACTERIA	
Order: Methylococcales		Order: Rhizobiales	
Family: Methylococcaceae		Family: Methylocystaceae	
	Type I	Type X	Type II
<i>Methylomonas</i>	<i>Methylobacter</i>	<i>Methylococcus</i>	<i>Methylocystis</i>
<i>Methylomonas methanica</i>	<i>Methylobacter bovis</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>	<i>Methylocystis parva</i>
<i>Methylomonas fodinarum</i>	<i>Methylobacter chroococcum</i>	<i>Methylococcus thermophilus</i>	<i>Methylocystis echinoides</i>
<i>Methylomonas aurantiaca</i>	<i>Methylobacter vinelandii</i>		<i>Methylocystis rosea</i>
<i>Methylomonas rubra</i>	<i>Methylobacter psychrophilus</i>	<i>Methylocaldum</i>	<i>Methylocystis pyriformis</i>
<i>Methylomonas scandinavica</i>	<i>Methylobacter luteus</i>	<i>Methylocaldum gracile</i>	<i>Methylocystis methanolicus</i>
	<i>Methylobacter tundripaludum</i>	<i>Methylocaldum szegeziense</i>	<i>Methylocystis minimus</i>
	<i>Methylobacter marinus</i>	<i>Methylocaldum tepidum</i>	<i>Methylocystis heyeri</i>
			<i>Methylocystis hirsuta</i>
<i>Methylomicrobium</i>			
<i>Methylomicrobium pelagicum</i>	<i>Methylosphaera</i>		<i>Methylosinus</i>
<i>Methylomicrobium album</i>	<i>Methylosphaera hansonii</i>		<i>Methylosinus trichosporium</i>
<i>Methylomicrobium agile</i>			<i>Methylosinus sporium</i>
<i>Methylomicrobium buryatense</i>	<i>Methylosarcina</i>		
	<i>Methylosarcina fibrata</i>		Family: Beijerinckiaceae
<i>Methylolalobius</i>	<i>Methylosarcina quisquilibrium</i>		
<i>Methylolalobius crimeensis</i>	<i>Methylosarcina lacus</i>		<i>Methylocella</i>
			<i>Methylocella palustris</i>
<i>Crenothrix</i>	<i>Methylothermus</i>		<i>Methylocella tundrae</i>
<i>Crenothrix polyspora</i>	<i>Methylothermus thermalis</i>		<i>Methylocella silvestris</i>
<i>Clonothrix</i>			<i>Methylocapsa</i>
<i>Clonothrix fusca</i>			<i>Methylocapsa acidiphila</i>

Mientras las MOBs tipo I se presentan a la forma de bacilos cortos, cocos o células elipsoides usualmente sin agrupación, las del tipo X se encuentran a la forma de diplococos. En cuanto a enzimas, MOBs de tipo I y tipo X usan la RuMP, pero las de tipo X también poseen bajas concentraciones de enzimas de la vía de las serinas y crecen a temperaturas mayores (Hanson y Hanson, 1996). Por otro lado, dentro de la subclase γ -Proteobacteria, se tiene a las MOBs tipo II, que usan la vía de las serinas para la asimilación del formaldehído. Otras características diferenciales entre los tres tipos de MOBs son detalladas en la Tabla 3 (Hanson y Hanson, 1996), entre las que destacan la formación de estructuras de resistencia a factores ambientales desfavorables y la ubicación de su sistema de membranas intracelular

(ICM), que es en donde se lleva a cabo la oxidación del metano. Así, algunas cepas de MOBs de los tres tipos desarrollan quistes, mientras que sólo las del tipo II pueden formar exosporas.

Por otro lado, se tiene que las MOBS tipo I y tipo X poseen su ICM ubicado en cualquier lugar del citoplasma celular, a la forma de paquetes, en cambio, las de tipo II tienen sus ICM dispuestas en forma paralela a la membrana citoplasmática (Figura 4). En las ICMs es precisamente donde se encuentra unida la enzima metano mono oxigenasa (MMO) en su forma no soluble o particulada (pMMO), la encargada de iniciar la cascada de reacciones bioquímicas que integran la metanotrofia (Dedysh y Dunfield, 2011).

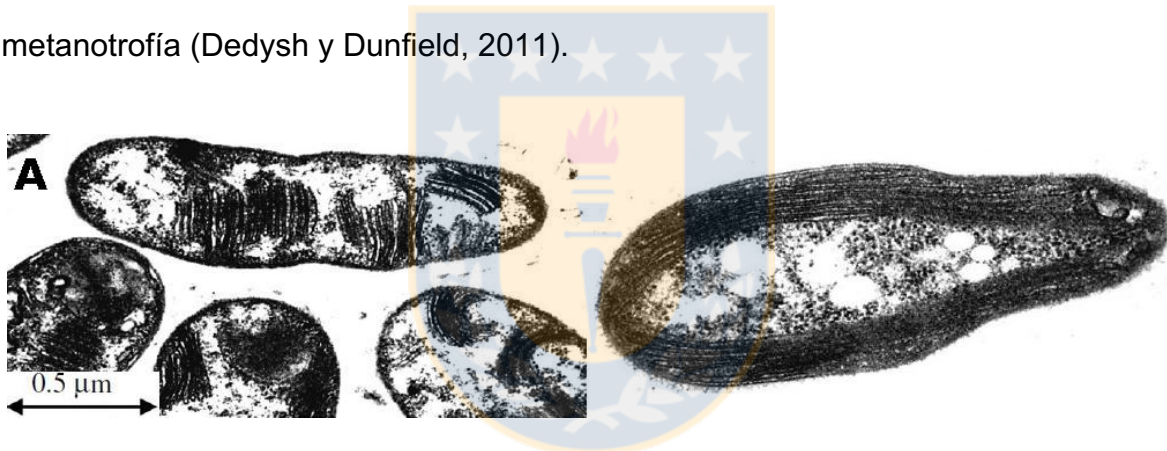


Figura 4. Microscopía electrónica de transmisión (MET), que muestra la disposición de las ICM en: A) MOBS tipo I y X, y B) MOBS tipo II (Fuente: Dalton, 2005).

Tabla 3. Características diferenciales de MOBS tipo I, II y X (Fuente: Hanson y Hanson, 1996).

Characteristic	Type I	Type II	Type X
Cell morphology	Short rods, usually occur singly; some cocci or cilioids	Crescent-shaped rods, rods, pear-shaped cells, sometimes occur in rosettes	Cocci, often found as pairs
Growth at 45°C	No	No	Yes
G+C content of DNA (mol%)	49-60	62-67	59-65
Membrane arrangement	Yes	No	Yes
Bundles of vesicular disks	No	Yes	No
Paired membranes aligned to periphery of cells	No	Yes	Yes
Nitrogen fixation	No	No	No
Resting stages formed	No	Some strains	No
Exospores	Some strains	Some strains	Some strains
Cysts	Yes	No	Yes
RuMP pathway present	No	Yes	Sometimes
Serine pathway present	No	No	Yes
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase present	14.0, 16:1 ω 7c, 16:1 ω 5t	18:1 ω 8c	16:0, 16:1 ω 7c
Major PLFAs	Gamma	Alpha	Gamma
Proteobacterial subdivision	1041 (5'-CTCCGGCTATCTCTAACAGATT-3'), 1035 (5'-GATTCTCTGGATGTC AAGGG-3'), MM650 (5'-CCTCTACTCAACTCTAGT-3'), MM850 (5'-TACGTTAGCTCCACCCTAA-3')	1034 (5'-CCATACCCGGACATGTCCAAAAGC-3')	No specific probe has been tested
Phylogenetic signature probe(s) ^a (50)			

^a Phylogenetic signature probes 1041 and 1035 will not hybridize with 16S rRNAs from members of the genus *Methylobionas*. Probes MM650 and MM850 have been employed to detect some species in this genus (180).

También puede hallarse en las MOBS la forma soluble de la enzima antes nombrada (sMMO), que sólo está presente en algunos géneros (Hanson y Hanson, 1996). Recientemente, se ha demostrado la existencia de MOBs facultativas, que pertenecen a algunos géneros de las α -*Proteobacterias*, cuya característica es que presentan sólo la sMMO y no forman ICM (Belova et al., 2011; Dedysh et al., 2005; Dunfield et al., 2010; Im et al., 2011), y dicha enzima es reprimida cuando la bacteria se encuentra en un medio con una fuente multicarbono (Theisen et al., 2005).

II. 3. Bioquímica de la oxidación del CH₄

Las MOBs oxidan el CH₄ hasta CO₂ y H₂O, vía los intermediarios CH₃OH, Formaldehído (HCHO) y formiato (HCOOH) (Figura 4). La oxidación inicial del CH₄ es catalizada por el sistema enzimático multicomponente MMO. Como ya se mencionó, existen dos tipos de MMO: la sMMO, que es la forma que se encuentra disuelta en el citoplasmática (Trotsenko y Murrell, 2008), tiene hierro (Fe) en su centro catalítico y es la MMO con menor actividad oxidadora de CH₄ (Chi Fru et al., 2011) y la pMMO, que se encuentra unida a las ICM (Trotsenko y Murrell, 2008), tiene Cobre (Cu) en su centro catalítico y es la MMO con mayor actividad (Chi Fru et al., 2011). La segunda forma, se halla en todas las MOBs, excepto en el género *Methylocella* (Dedysh et al., 2000). Sólo algunas MOBs poseen ambas formas (Ali et al., 2006). En otra mano, se tiene que la sMMO no es propiedad taxonómica de las MOBs, estando presente sólo en algunas cepas del grupo (McDonald et al., 2006). Es más, la expresión de sMMO no es constitutiva, teniendo como único inductor la razón Cu/biomasa, ya que el Cu inhibe la expresión de sMMO a altas

concentraciones. Así, cuando este cociente sobrepasa los $2,5 \mu\text{mol} \cdot \text{g cell}^{-1}$, se expresa la pMMO, mientras que a una razón más baja, se expresa sMMO (Trotsenko y Murrell, 2008).

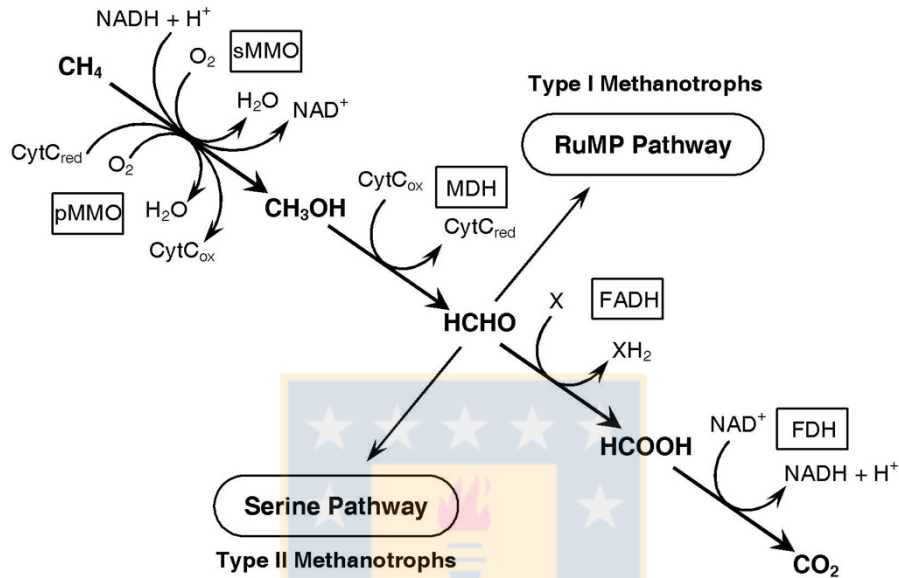
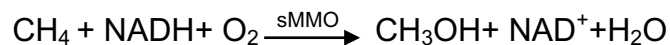


Figura 5. Esquema de la bioquímica de la oxidación del metano por las MOBS (Fuente: Tanthachoon et al., 2008).

II.3.1. Metano Monooxigenasa soluble (sMMO)

La sMMO es un sistema enzimático que cataliza la oxidación de CH_4 a CH_3OH , a expensas de NAD(P)H y utilizando O_2 como aceptor de electrones en las MOBS, según la siguiente ecuación (Christine et al., 2010):



El complejo sMMO consta de tres componentes: una hidroxilasa, una reductasa (MmoC) y una proteína reguladora (MmoB). El complejo hidroxilasa es una metaloproteína hexamérica no heme de 250 kDa, que tiene subunidades α (61 kDa), β (45 kDa) y γ (20 kDa). En la subunidad α se encuentra un centro de dos átomos de Fe unidos por puente μ -hidróxido. Este centro binuclear de Fe actúa como carrier de Oxígeno y además tiene función catalítica (Trotsenko y Murrell, 2008). La segunda parte de la sMMO es la MmoC, que es una flavoproteína Fe-S de 38,5 kDa que transporta los electrones, siendo reducida con electrones provenientes del NADH, que pasan al centro Fe_2S_2 de la reductasa. Luego, los electrones son transferidos a los sitios de oxidación de CH_4 y de reducción de oxígeno en el complejo hidroxilasa. De esta manera, la reductasa funciona como una transformasa de un electrón ofreciendo una fuente de reducción a partir de NADH (Trotsenko y Murrell, 2008). Finalmente, la tercera pieza de sMMO es la proteína reguladora MmoB, un polipéptido de 16 kDa, que no tiene grupos metal o ni prostéticos. Su función es promover la expresión y actividad de la hidroxilasa de sMMO. El polipéptido MmoB acopla la oxidación de NADH y CH_4 , funcionando como un regulador de la actividad de la función NADH oxidasa, cuando el CH_4 está ausente, y de la función hidroxilasa, cuando el CH_4 está presente. Los componentes de sMMO se organizan en un complejo proteico estable clave para la función enzimática en estudio (Trotsenko y Murrell, 2008). Así, el mecanismo de reacción para sMMO se resume en: CH_4 se une con el centro activo de la enzima oxidada. Luego, uno de los dos átomos de hierro reducido, quedando los átomos del centro de la enzima con valencia mixta ($\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$). La segunda reducción de un electrón

del centro de sMMO, produce peróxido de hidrógeno activo, que a través de su clivaje, acepta un átomo de hidrógeno del CH₄, en primera instancia, produciéndose la especie $\cdot\text{CH}_3$ la que recombina con radical $\cdot\text{OH}$ o participa en reacción de Fenton con H₂O, para formar CH₃OH (Trotsenko y Murrell, 2008; Dalton, 2005; Lieberman and Rosenzweig, 2004).

II.3.2. Metano Monooxigenasa particulada (pMMO)

pMMO es muy inestable, por lo que el trabajo con ella, en laboratorio es difícil. Dado eso, la mayoría de los avances en esta forma de la MMO son recientes (Kitmitto et al., 2005; Culpepper y Rosenzweig, 2012). La enzima es un trímero ($\alpha\beta\gamma$)₃ que constan de tres subunidades cada uno. Así, la subunidad α tiene un tamaño molecular de 45 kDa, la β , de 27 kDa y la γ , de 23 kDa. La pMMO activa posee dos átomos de Fe y alrededor de 15 de Cu. Aunque todavía no se conoce con exactitud Cuántos átomos de Cu y Fe están en la pMMO (Lieberman and Rosenzweig, 2004), recientes avances demuestran que el sitio activo está formado por Cu (Culpepper y Rosenzweig, 2012). Para que la enzima se active, se requiere un pequeño cromopéptido llamado metanobactina (mb) que se disocia fácilmente de los polipéptidos $\alpha\beta\gamma$ de MMO. Así, parece formarse un complejo Cu-mb que secuestra metales extracelulares, para coordinarlos y reducirlos por un mecanismo similar al del Cu. El poder reductor fisiológico, en el caso de la pMMO lo aportan los citocromos *b*_{559/569} o *c*₅₅₃. Artificialmente, lo hacen el duroquinol y NADH (Trotsenko y Murrell, 2008). Al contrario del caso de sMMO, para pMMO, muchos de los mecanismos de reacción, regulación y la estructura aún no son conocidos a

cabalidad. Sin embargo, recientes investigaciones en *Methylococcus capsulatus* (Bath) y *Methylosinus trichosporium* OB3b, acerca de la estructura cristalina de sus pMMO, revelaron que el trímero $(\alpha\beta\gamma)_3$ está formado por los polipéptidos pmoA, pmoB, y pmoC (Lieberman and Rosenzweig, 2005 a y b; Hakemian et al., 2008), los que están codificados en dos copias del clúster de genes *pmoC*, *pmoA*, *pmoB* y una copia adicional para *pmoC*. Esto es lo que se conoce como clúster *pmoCAB*, el cual tiene una alta homología con los genes de la amonio monooxigenasa (AMO) (Trotsenko y Murrell, 2008). De ellos, el gen *pmoA* es el más ampliamente utilizado para la detección de MOBs en general y para el ensayo de la expresión del ARNm para pMMO (Lüke y Frenzel, 2011). El mecanismo exacto por el cual se da la regulación recíproca entre la síntesis de sMMO y pMMO por los iones Cu es desconocido hasta la fecha. Por otro lado, recientemente se informó que el sitio activo de pMMO está conformado por átomos de Cu (Culpepper y Rosenzweig, 2012) y que, de manera similar al centro de hierro en sMMO, están dispuesto a la manera de un centro di Cu, en el que se da una mezcla de Cu^+ y Cu^{+2} (Smith et al., 2011).

Al contrario de la sMMO, que cataliza la oxidación de un amplio espectro de compuestos alifáticos, aromáticos y sus derivados halogenados, la pMMO oxida una variedad de sustratos de carbono muy reducida a alcanos y alquenos hasta de 5 átomos de carbono. Sin embargo, una MOB oxida CH_4 y lo transforma en un 34% más de biomasa que una MOB que utiliza sMMO (Trotsenko y Murrell, 2008). Así como se mencionó en el punto II.3. la pMMO está localizada en las ICMs, llegando a formar el 80% de las proteínas de dichos sistemas (Nguyen et al., 1998). El Cu es

necesario para la expresión de pMMO. Esta enzima tiene una alta afinidad por el CH_4 ($K_m = 1\text{--}2 \mu\text{M}$) y O_2 ($K_m = 0,1 \mu\text{M}$). La sMMO, en cambio, es menos afín por el CH_4 ($K_m = 3 \mu\text{M}$) y O_2 ($K_m = 16,8 \mu\text{M}$). Esta diferencia de la actividad entre sMMO y pMMO está dada por la interacción que posee la segunda forma con la enzima metanol deshidrogenasa (MDH), encargada de la oxidación del CH_3OH hasta formaldehído. Esta unión, permite que pMMO y MDH se estabilicen e intercambien electrones directamente, llevando a una transformación de CH_4 en biomasa más eficiente (Myronova et al., 2006).

II.3.3. Oxidación de CH_3OH por la MDH

Luego que el CH_4 es oxidado a CH_3OH , esta última especie es oxidada por una MDH en el periplasma, una heteroproteína que tiene una pirrolquinolina quinona (PQQ) como grupo prostético. MDH es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$, que consta de dos subunidades grandes (α) de 67 kDa y dos pequeñas (β) de 8,5 kDa. MDH tiene una estructura de simetría radial compleja, similar a una hélice de ocho aspas, compuesta por segmentos antiparalelos de subunidades α (Trotsenko y Murrell, 2008). El grupo PQQ y un ión Ca^{+2} son vitales para la actividad catalítica, los que se encuentran en un canal central tipo embudo en la subunidad α (Zhang et al., 2007). Las subunidades β no forman un dominio real y su función aún es desconocida (Trotsenko y Murrell, 2008).

La oxidación de CH_3OH está acoplada a la reducción de la PQQ hasta quinol (PQQH_2), seguida de una transferencia de electrones en dos etapas: primero al aceptor primario citocromo c_{551} (c_L), y luego, vía los citocromos c_{55} (c_n) y c_{552} , a la

oxidasa terminal. La oxidación de CH_3OH está acompañada de la generación de gradiente de protones (ΔpH), ya que los protones liberados, son retenidos en el periplasma y los electrones son transferidos por los citocromos a través de la membrana citoplasmática a la oxidasa Terminal aa_3 , en la que los electrones son aceptados por el oxígeno, al mismo tiempo que se consumen protones desde el citoplasma. La eficiencia de la transferencia de electrones desde MDH hacia el oxígeno ($\rightarrow \text{H/O} = 3,0-3,5$) indica la participación de muchos segmentos translocadores de protones (Trotsenko y Murrell, 2008).

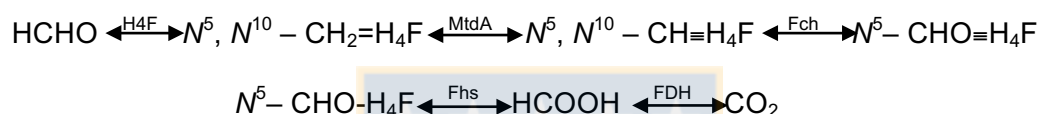
II.3.4. Oxidación de HCHO por una vía lineal

Las MOBs poseen muchas enzimas para la oxidación del HCHO, que se clasifican en dos grupos: las deshidrogenasas NADP^+ específicas y las enzimas unidas a citocromo. Al mismo tiempo, las deshidrogenasas NADP^+ específicas se dividen en tres subgrupos, de acuerdo a los cofactores usados, que pueden ser tioles (GSH), tetrahydrofolatos (THF, H_4F), o H_4MPT . En altas concentraciones de Cu ($>2,5 \mu\text{M}$ de Cu por mg de proteína celular), que es cuando se expresa pMMO, el HCHO es oxidado por una formaldehído deshidrogenada particulada unida a citocromo (FADH) (Zahn et al., 2001). Esta enzima, que es específica para HCHO es una heteroproteína homotetrámerica 49,5 kDa de tamaño molecular, que consta de un grupo prostético PQQ y utiliza coenzima Q_8 o el complejo de citocromos $b_{559/569}$ como aceptores de electrones fisiológicos (Trotsenko y Murrell, 2008). Los electrones entran a la cadena respiratoria al nivel de la citocromo *b*/ubiquinona. Así,

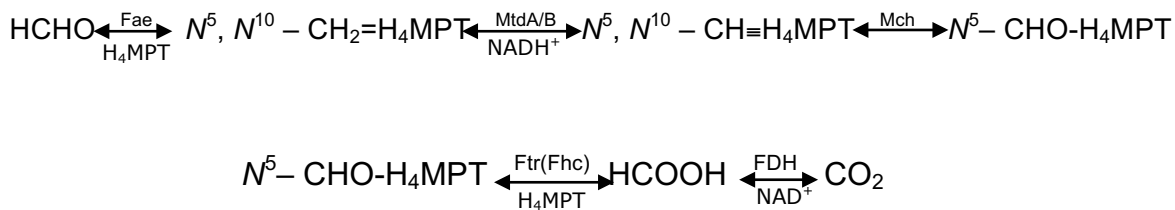
el acople entre la cadena respiratoria y la pMMO puede ocurrir al nivel del complejo de citocromos bc_1 , vía coenzima Q_8 (Myronova et al., 2006).

II.3.5. Oxidación de HCHO hapterina dependiente

Como se mencionó anteriormente en el punto II.3.4., los metilotróficos (incluyendo MOBs) utilizan H_4F/THF y H_4MPT , para la activación de la oxidación del HCHO (Vorholt, 2002). La vía H_4F dependiente está dada por las siguientes reacciones:



En las MOBs tipo II, las enzimas de la vía THF mantienen una alta concentración del aceptor de HCHO primario N^5, N^{10} -metileno-THF, en la asimilación de carbono por la ruta de la serina. Al ser estas reacciones reversibles, sus enzimas son reguladas según los requerimientos celulares de oxidación o asimilación de HCHO (Vorholt, 2002). Aunque la vía THF no ha sido descrita para MOBs tipo I, se asume que la conversión de compuestos de un carbono, vía derivados de THF, es llevada a cabo en casi todos los organismos, para la síntesis posterior de timidina y purinas (Trotsenko y Murrell, 2008). Por otro lado, La vía de oxidación de HCHO dependiente de H_4MPT , se rige por las siguientes reacciones:



La enzima activadora de formaldehído (Fae) es un homotrímero de 18 kDa que acelera la reacción espontánea de condensación del HCHO y de la H₄MPT con la formación de N⁵, N¹⁰ –metilen-H₄MPT (N⁵, N¹⁰ – CH₂=H₄MPT) (Vorholt et al., 2000). La oxidación de metilen-H₄MPT (CH₂=H₄MPT) a metenil-H₄MPT (CH=H₄MPT) es catalizada por dos enzimas diferentes: La metilen-H₄MPT deshidrogenasa NAD⁺ específica (MtdA), que también cataliza la deshidrogenación reversible de metilen-THF, y la metilen-H₄MPT deshidrogenasa NAD⁺ dependiente (MtdB), que es específica para metilen-H₄MPT, pero no activa para metilen-THF, y que cataliza una reacción irreversible (Trotsenko y Murrell, 2008). Hace algunos años, fue hallada una nueva clase de metilen-H₄MPT deshidrogenasa, denominada MtdC, pero su rol en metanotrofia aún no ha sido descrito (Vorholt et al., 2005).

La enzima Metenil-H₄MPT-cyclohidrolasa (Mch) cataliza la conversión metenil-H₄MPT en N⁵–formil-H₄MPT (N⁵– CHO-H₄MPT). Mch es monofuncional y no posee grupo prostético (Vorholt, 2002). El complejo formiltransferasa/hidrolasa (FhcABCD) contiene cuatro componentes y cataliza la conversión de N⁵–formil-H₄MPT a formiato. Dado que esta última reacción es irreversible, es un proceso generador de NADH efectivo (Adeosun et al., 2004; Trotsenko y Murrell, 2008).

II.3.6. Oxidación de HCOOH a CO₂

En este paso final en la oxidación del CH₄, en todas las MOBS, existe una formiato deshidrogenada NAD⁺ dependiente (FDH). Esta enzima consta de dos polipéptidos, uno de 54 kDa y otro de 106 kDa, que pueden estar combinados a la forma de dímeros o tetrámeros ($\alpha\beta$ ó $\alpha_2\beta_2$). El tetrámero resulta de un tamaño de 315 kDa y es la forma dominante. FDH contiene un átomo de Fe no heme y grupos ácidos SH lábiles (Trotsenko y Murrell, 2008). Se ha descrito que la expresión de esta enzima está regulada por la presencia de tungsteno y molibdeno (Chistoserdova et al., 2004).

II.3.7. Asimilación de HCHO por ciclo de la RuMP

Como fue descrito con anterioridad en el punto II de este proyecto, la asimilación del HCHO para la formación de biomasa en MOBS tipo I y tipo X, está dado por el ciclo de la RuMP (Figuras 6, A y B).

El ciclo de la RuMP ocurre en tres grandes etapas. En la primera, el HCHO es fijado junto con ribulosa-5-fosfato para formar (D-arabino)-3-hexulosa-6-fosfato en una reacción catalizada por la enzima 3-hexulosafosfato sintasa (HPS). El producto es inestable, por lo que isomeriza a fructosa-6-fosfato, gracias a la fosfohexuloisomerasa (PHI). HPS es un homohexámero de 310 kDa unido a membrana con una subunidad grande inusual de 49 kDa (Ward et al., 2004). Su estructura difiere de la hallada en el resto de los metilotróficos (Trotsenko y Murrell, 2008). HPS requiere, Mg⁺² o Mn⁺² para su actividad. En base a estudio de secuencias aminoacídicas, se modeló la estructura de HPS como similar a la de un

pliego de barril (β/α)₈ (Kato et al., 2006). PHI, por su lado, es un homodimero de 40 kDa y es inhibido por muchos metales bivalentes, como el Cu^{+2} . Tiene una estructura α/β que consiste en una hoja β de cinco bandas paralelas flanqueada en ambos lados por α hélices, formando un sandwich α - β de tres capas (Kato et al., 2006). En la segunda etapa, las fosfohexosas formadas a partir del HCHO, son clivadas para producir fosfotriosas, algo que sólo en MOBs ocurre gracias a dos vías que se dan en forma simultánea: la vía de Entner–Doudoroff y la de Embden–Meyerhof–Parnas. En la primera vía, la fructosa-6-fosfato es convertida a 2-keto-3-deoxi-6-fosfogluconato (KDPG), que luego es clivada a piruvato y gliceraldehido-3-fosfato (GAP), por la KDPG-aldolasa. En la segunda vía, la fructosa-6-fosfato es fosforilada por la 6-fosfofructokinasa dependiente de pirofosfato (PPi-PFK), para producir fructosa-1,6-bisfosfato, seguido de su clivaje a GAP y dihidroxiacetona-fosfato por una aldolasa, para luego llevarse a cabo la isomerización de la segunda a GAP. En la tercera etapa de la vía de la RuMP, la ribulosa-5P, como aceptor de HCHO, es regenerada desde GAP y fructosa-6-fosfato en una serie de reacciones transaldolasas/transketolasas, análogas a las bacterias fototróficas y quimiotróficas. (Trotsenko y Murrell, 2008). Tanto en MOB tipo I y X, a partir de la vía de la RuMP y a través de una serie de reacciones (Figura 6 y 7) se obtienen lípidos y, los aminoácidos alanina y glutamato, los cuales son usados como constituyentes celulares, es decir, para la formación de biomasa (Trotsenko y Murrell, 2008; Yurimoto, et al., 2009). MOB tipo I y X comparten la vía de la RuMP, con pequeñas diferencias, las que se revelan comparando la Figura 6A (MOB tipo I) y Figura 6B (MOB tipo X), en la que resalta la capacidad que tienen las MOB tipo X de llevar

a cabo la ruta de las serinas, ya que poseen pequeñas concentraciones de las enzimas de dicha ruta (Trotsenko y Murrell, 2008).

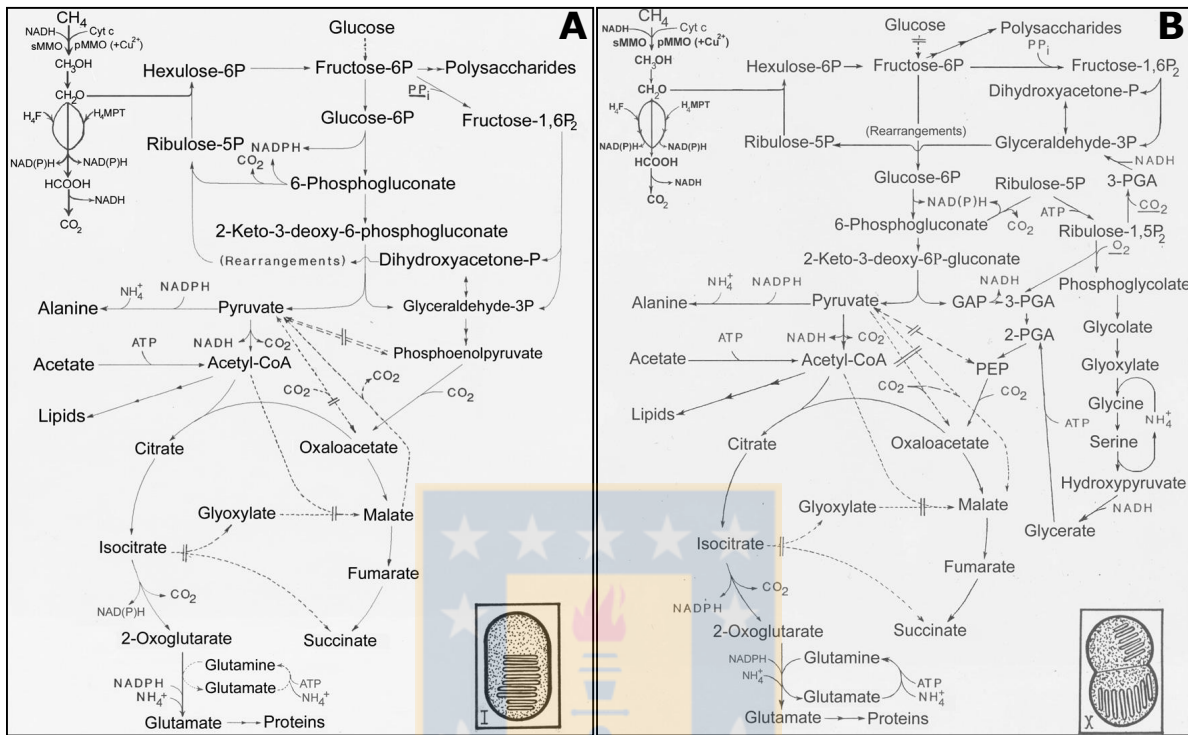


Figura 6. Vía de la RuMP para la asimilación del formaldehído en: A) MOBs tipo I, B) MOBs tipo X. En el extremo inferior derecho de cada cuadro se muestra un dibujo que representa la morfología de cada tipo y las disposiciones de sus sistemas de ICMs (Fuente: Trotsenko y Murrell, 2008).

II.3.8. Asimilación de HCHO por vía de las serinas

Las MOBs tipo II asimilan el formaldehído, producto de la oxidación del CH₄, por la vía de las serinas (Figura 7).

En la primera parte de este ciclo, el HCHO es condensado con THF, formándose N⁵,N¹⁰-metilen THF. Luego, el HCHO reacciona con glicina para producir serina,

oxalacetato. Esta especie es reducida por una malato dehidrogenasa hasta malato, que es convertido en malil-CoA por la malato tiokinasa. Luego, la malil-CoA liase forma glioxilato y acetil-CoA, que es producto primario del ciclo de la serina. Así, SHTM, SGAT, HPR y la malil-CoA liase son las enzimas propias del mencionado ciclo. En la segunda parte de la vía de las serinas, la acetil-CoA es oxidada hasta glioxilato que, bajo una reacción de transaminación, es transformado en glicina, con lo que el aceptor primario de HCHO es regenerado, vía la formación de acetoacetil-CoA e hidroxibutiril-CoA, intermediarios en la síntesis de poli- β -hidroxibutirato, y vía la formación de crotonil-CoA y butiril-CoA, intermediarios en la síntesis de ácidos grasos (Korotkova and Lidstrom, 2002).

Como se mencionó con anterioridad, las MOBs tipo X, aunque asimilan HCHO principalmente por la ruta de la RuMP, también poseen bajas concentraciones de enzimas de la ruta de las serinas, pero su rol en en MOBs tipo X aún no está claro (Trotsenko y Murrell, 2008).

II.4. Cultivos de MOBs descritos hasta la fecha

Diversos cultivos y cepas de MOBs han sido descritos, estando ampliamente distribuidos en una variedad de ambientes, entre los que se encuentran geisers, suelos, sistemas acuáticos fríos, vertederos o rellenos sanitarios, rizósfera, residuos industriales líquidos (RILES), musgo, mar, humedales, cuevas, arrozales y bosques (Pfluger et al., 2011; Knief et al., 2006; Trotsenko y Khmelenina, 2005; Henneberger et al., 2011; Lee et al., 2011; Boon et al., 2002; Putkinen et al., 2012; Boden et al., 2011; Narihiro et al., 2011; Hutchens et al., 2004; Macalady et al., 2002, Pratscher

et al., 2011; Zheng et al., 2012). De los ambientes antes mencionados, los suelos de bosque exhiben las comunidades de microorganismos con mayor actividad de oxidación de CH₄, como se muestra en la Figura 8 (Singh, 2011), la que decrece hasta un 60% por la tala de árboles y es restituida por la reforestación (Singh et al., 2007).

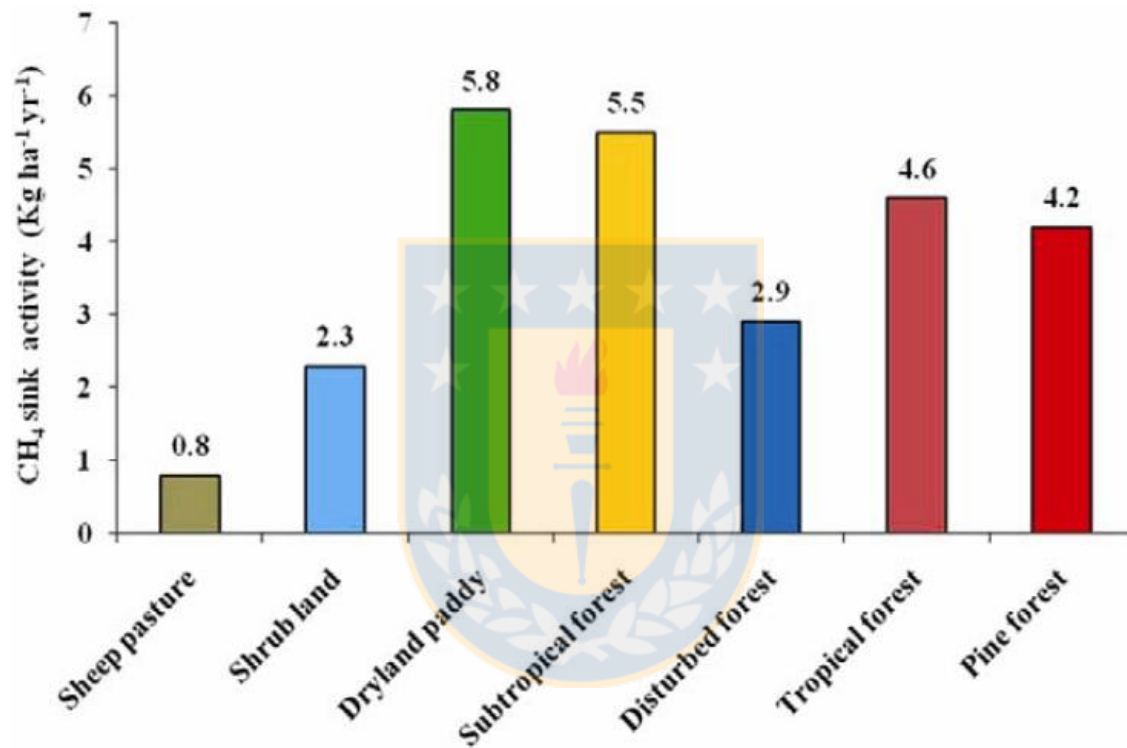


Figura 8. Actividad metanotrófica en suelos de diferentes ecosistemas (Fuente: Singh, 2011).

Se ha descrito una diversidad de géneros y especies de MOBs (Tabla 2), que, como se mencionó en el punto II.2, se clasifican en tipo I, X y II. Dentro de ellos, los géneros *Methylobacter* y *Methylomonas* son los clásicos microorganismos representates del grupo (Madigan et al., 2004). Sin embargo, los estudios de de

años recientes se han centrado en dos cepas, que han sido mejor caracterizadas: *Methylobacterium album*, como representante de las MOBs Tipo I (γ -Proteobacteria), y *Methylocystis* sp., como modelo de las MOBs tipo II (α -Proteobacteria) (Hanson y Hanson, 1996; Dam et al., 2012; Cáceres et al., 2013).

II.4.1 *Methylobacterium album*: modelo de las MOBs tipo I y X en este estudio

Methylobacterium album es una γ -Proteobacteria, Gram negativa, cuya morfología habitual es bacilo, móvil, aeróbica y utiliza obligadamente metano y metanol como fuente de energía (Garrity et al., 2005a). Crece a temperaturas entre los 20 °C y 30 °C (T óptima = 25-30 °C), con lo que se clasifica como mesófila. *M. album* se desarrolla a pH entre 6 y 9 (pH óptimo = 7) (Garrity et al., 2005a). Esta especie bacteriana contiene gránulos de poli- β -hidroxibutirato y polifosfato, que contribuye a los cambios de refringencia de sus células. No contiene cuerpos tipo quiste. Las colonias de *M. album* en agar de medio de sales minerales de nitrato (NMS) son circulares, convexas, lisas, de borde regular y no pigmentadas (Garrity et al., 2005a). La cepa tipo es NCIMB 11123, equivalente a ATCC 33003 (Bowman et al., 1993; Garrity et al., 2005a).

Methylobacterium album produce pMMO para catalizar la oxidación de CH₄ a metanol como paso inicial en la oxidación del primero hasta CO₂ (Brantner et al., 2002). El resto de la ruta hasta CO₂ es similar a todas las MOBs. Como representante de MOBs tipo I, asimila el HCHO por la vía de la RuMP (Figura 6B), como se describió en el punto II.3.6. Dado esto, bacterias de esta especie o consorcios microbianos que puedan llevar a cabo la oxidación de CH₄, de la manera

en que lo hace *M. album* y otras MOBs, son de gran utilidad en biofiltración de emanaciones gaseosa que contienen CH₄, y así poder mitigar el efecto invernadero. Debido a esto, hay un gran interés por obtener MOBs en la actualidad.

Aunque se conoce la mayoría de los aspectos a nivel molecular respecto a la oxidación de CH₄ llevada a cabo por *M. album*, se han realizado pocos estudios acerca de su utilización en biofiltración de gases (Cáceres et al 2013), y no se ha comparado la eficiencia de oxidación de CH₄ de cepas de MOBs en distintos soportes, con la eficiencia de *M. album*. Debido a esto, resulta de gran importancia aislar MOBs desde ambientes en los que se encuentra presentes el CH₄ y caracterizar la actividad oxidadora de sus biopelículas, en comparación con el antes mencionado microorganismo. De la misma manera, es de gran valor el determinar el material de soporte óptimo para el asentamiento de biopelículas de MOBs.

II.4.2 *Methylocystis* spp. como representante de las MOBs tipo II

Methylocystis es un género de MOB tipo II, por lo que usa la ruta de las serinas para la asimilación de HCHO. Este género es una α -*Proteobacteria*, Gram negativa, aeróbica, metanotrófica obligada (aunque también crece en CH₃OH), cuya morfología es bacilo o reniforme (forma de riñón), con un tamaño de 0,3–0,5 μ m x 0,5–1,5 μ m, no móvil. Puede formar espinas cilíndricas. En medio NMS agar, forma colonias aisladas blancas al principio y rosadas luego, debido a acumulación de citocromos. Estas colonias son circulares, convexas, de bordes regulares y con textura tipo mantequilla (Garrity et al., 2005b).

Todas las cepas del género *Methylocystis* producen catalasa, citocromo oxidasa, son mesófilas y neutrófilas. Crecen a temperaturas entre los 25 °C y 30 °C y se desarrollan a pH 7. *Methylocystis* spp. producen poli-β-hidroxibutirato como reserva de carbono (Dworkin et al., 2006).

Methylocystis spp. posee ambas formas de la enzima MMO (Jagadevan et al., 2013). Este género, utiliza una enzima llamada metanobactina (mbtin) para secuestrar el Cu a bajas concentraciones, funcionando como mecanismo de “interruptor” para utilizar la sMMO en lugar de la pMMO, en las mencionadas condiciones. Por esto, la cepa es clasificada como microorganismo de conmutación (El Ghazouani et al., 2011).

Al igual que *M. album*, se conoce gran parte de las características moleculares de *Methylocystis* spp.. Sin embargo, los estudios acerca de su utilización en biofiltración de gases o formación de biopelículas en general, son escasos (Hanna y Taylor, 1996; Hwang et al., 2007; Yoon et al., 2009). Dado esto, y como se mencionó en el punto II.4.1 es vital aislar MOBs desde ambientes en los que se encuentra presentes el CH₄ y comparar su actividad oxidadora de este compuesto, en biopelículas, con la presentada tanto por *Methylomicrobium album* y *Methylocystis* spp., ensayando a su vez, en diferentes materiales de soporte.

II.5. Biopelículas de MOBs

Se estima que el 80% de los microorganismos procariontes no existen en su ambiente natural como células planctónicas, sino que están adheridos a superficies en forma de biopelículas (Shopf et al., 2008). Las biopelículas son comunidades

organizadas de microorganismos adherentes a superficies, embebidas en una matriz de exopolisacáridos (EPS) (Suntharalingam y Cvitkovitch, 2005). Existen claras diferencias entre la fisiología exhibida por una comunidad planctónica entre las que se encuentran: a) Mayor resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos integrantes de la biopelícula, b) No limitan su crecimiento por el sustrato, ya que pueden interactuar con el medio ambiente y entre ellas; Las biopelículas no son estructuras fijas, c) Producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Shopf et al., 2008).

Son pocos los estudios de biopelículas de MOBs realizados hasta la fecha. Entre las investigaciones que describen comportamiento en biofiltros y en biopelículas en cultivo discontinuo suman 33. De estos, la mayoría utilizó consorcios metanotróficos, siendo muy escasas las investigaciones sobre cepas puras, además de no existir investigaciones sobre el material de soporte más adecuado para las MOBs (NCBI, 2015).

II.5.1 EPS en biopelículas de MOBs

Si se considera a una biopelícula como una “ciudad de microorganismos” (Watnik y Kolter, 2000), el EPS representa la “casa” de las células en dicha “ciudad” (Flemming et al., 2007). El EPS determina muchas de las condiciones de vida de los microorganismos de una biopelícula, afectando porosidad, densidad, contenido de agua, carga, propiedades de absorción, hidrofobicidad y estabilidad mecánica (Flemming y Wingender, 2002). Contrario a lo que se cree, la matriz de EPS contiene más que sólo polisacáridos. En ella se encuentran una variedad de otros

componentes, como proteínas, glicoproteínas, glicolípidos y en algunos casos ADN extracelular (Flemming et al., 2007).

En cuanto a las MOBs, una amplia variedad de sus especies producen EPS en diferentes cantidades, incluyendo *Methylococcus capsulatus* y *Methylosinus trichosporium* (Malashenko et al., 2001), y hay una serie de estudios que demuestran su formación en materiales de soporte como el compost (Wilshusen et al., 2004) y en biopelículas marinas (Krüger et al., 2008).

II.5.2. Soportes usados en biofiltración

Hasta la fecha, existe un gran número de soportes descritos para obtener biopelículas utilizadas en la biofiltración de compuestos volátiles. Los más comunes son los materiales orgánicos como la turba, suelo y *compost*, seguidos por la corteza de madera, bagazo de caña de azúcar (Sene et al., 2002) y cáscaras de maní (Ramirez-Lopez et al., 2003). Sin embargo, estos materiales llevan a la compresión de la cámara del biofiltro, causando caídas de presión y, finalmente, la disminución de la eficiencia del biofiltro (Gaudin et al., 2007). Materiales inorgánicos, como las esferas de vidrio y la perlita han demostrado proporcionar mejores propiedades mecánicas e hidrodinámicas (Hirai et al., 2001; Woertz et al., 2002; Gemeiner et al., 1994). De estos, los más utilizados son los óxidos de metal como la cerámica porosa, cristobalita calcinada (Hirai et al., 2001) y perlita (Kennes y Veiga, 2001). Sin embargo, su costo es elevado. También han sido estudiadas las combinaciones de materiales orgánicos e inorgánicos (Ergas et al., 1995; Zilli et al., 2001). Materiales poliméricos como el poliestireno (Kisten et al., 2004), polietileno (Sercu

et al., 2006), *Nylon* (González-Sánchez y Revah, 2009) y polipropileno (Maestre et al., 2010) también han sido utilizados, ofreciendo ventajas como alta área específica y características similares de hidrofobicidad con los microorganismos que se van a adherir.

Los estudios de materiales de soporte para biopelículas de MOBs son escasos. Entre ellos, destacan los únicos dos estudios de un grupo de trabajo que comparó dos materiales de soporte (vidrio, como material hidrofílico, y poliestireno, como material hidrofóbico) y su colonización por cepas de *M. capsulatus* y *Methylocystis parvus* (Kisten y Kurdish, 2002; Kisten et al., 2004). En dichas investigaciones, no se halló diferencia significativa en la colonización de los materiales antes mencionados por las cepas de MOBs estudiadas. El hallazgo crucial fue que la mezcla óptima de gases para la colonización de ambos soportes fue de 17-28% de metano y 5-28% de oxígeno. Pruebas en cerámica y otros materiales poliméricos de soporte no han sido estudiados.

II.6. Inhibición de la metanotrofia

Las emanaciones de gases industriales no contienen sólo CH₄, sino que constan de mezclas en las que cabe destacar, el CO₂, los gases de azufre totalmente reducido (TRSs), como el hidrógeno sulfurado (H₂S), y el amoníaco (NH₃). Hasta el día de hoy se ha encontrado evidencia de que los compuestos sulfurados y el NH₃ (NH₄⁺ en solución acuosa a pH neutro) inhiben la oxidación de metano que llevan a cabo las MOBs (Lee et al., 2011; Campbell et al., 2011), en concentraciones de 0,1 a 10 mM para NH₄⁺ (Nyerges y Stein, 2009) y de 100 a 200 ppm para H₂S (Lee et al.,

2011). El efecto ejercido en la metanotrofia bajo H_2S y otros compuestos sulfurados se aprecia en el gráfico de la figura 9, mientras que el descenso de la tasa de oxidación de metano, producto de la acción del NH_3 se observan en la tabla 4 (Lee et al., 2011; Nyerges y Stein, 2009).

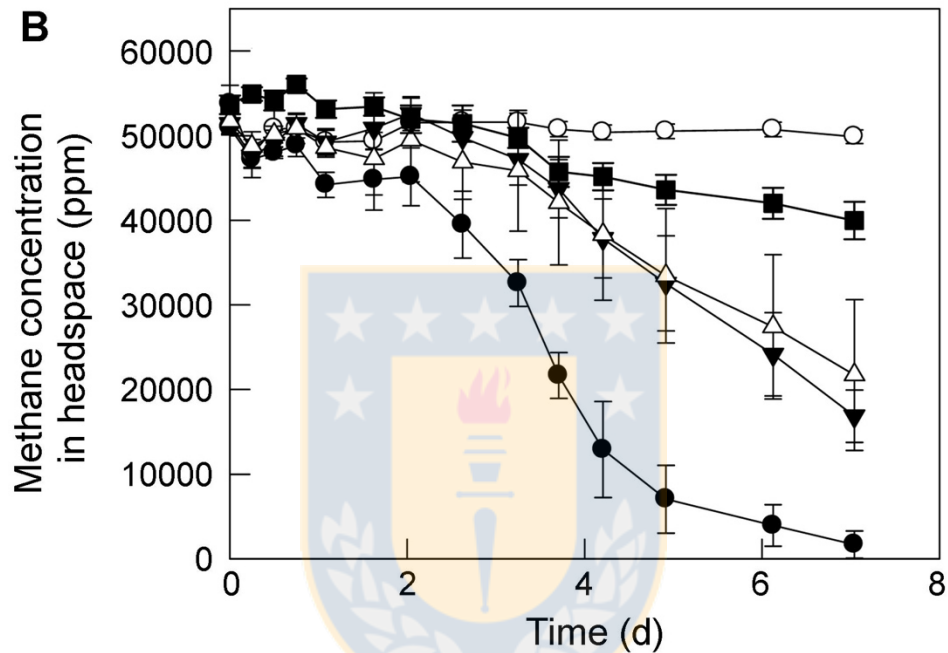


Figura 9. Inhibición de la oxidación de CH_4 por compuestos sulfurados. O, Control negativo (sin MOB_s); ●, Control positivo (MOB_s+ CH_4); ▼, CH_4 + H_2S ; △, CH_4 +Metanotiol; ■, Dimetilsulfuro+ CH_4 (Fuente: Lee et al., 2011).

Tabla 4. Tasa de oxidación de CH₄ bajo la adición de NH₄⁺ y NO₂⁻ (Fuente: Nyerges y Stein, 2009).

Isolate	Rate of CH ₄ oxidation (nmol min ⁻¹ per 10 ⁸ cells)				
	5000 p.p.m. CH ₄				
	No addition	0.5 mM NH ₄ ⁺	5 mM NH ₄ ⁺	0.5 mM NO ₂ ⁻	5 mM NO ₂ ⁻
<i>M. album</i>	1.81 (0.18)	0.91 (0.09)*	1.00 (0.04)	2.10 (0.27)	2.03 (0.22)*
<i>M. methanica</i>	1.96 (0.17)	1.77 (0.13)*	1.07 (0.23)	1.85 (0.27)	1.33 (0.05)*
<i>Methylocystis</i> sp.	2.30 (0.30)	2.64 (0.22)*	1.10 (0.16)	2.54 (0.10)	1.75 (0.16)
<i>M. sporium</i>	1.10 (0.11)	0.44 (0.08)*	0.53 (0.07)	0.95 (0.07)	0.56 (0.05)

Otras investigaciones sugieren que los sulfuros y el NH₃ inhiben la metanotrofia, compitiendo estos con el CH₄ por los sitios activos de las MMOs, dada dada la baja especificidad de las antes mencionadas enzimas (Jagadevan y Semrau, 2012; Lee et al., 2012; Yang et al., 2011). Así, se han dado investigaciones en búsqueda de cepas que co-oxidan CH₄ y TRSs, por ejemplo (Lee et al., 2012). Por otro lado, la similitud entre los genes que codifican para la pMMO y la AMO (Hakemian y Rosenzweig, 2007; Trotsenko y Murrell, 2008), sugieren que la inhibición de metanotrofia podría estar dada incluso a nivel de expresión génica, al menos por el NH₃ (NH₄⁺ en solución). Sin embargo, la inhibición en la metanotrofia ejercida por TRSs y NH₃, no está conclusivamente determinada. Dos aspectos importantes que cabe destacar en este tema son la influencia que los TRSs y del NH₄⁺ (NH₃) sobre la expresión de los ARNm que codifican para las MMOs (principalmente el gen *pmoA*, que codifica para el sitio activo de pMMO) y sobre la actividad de las MMOs en sí. Hasta la fecha, no hay estudios sobre ello, por lo que resulta de vital

importancia delucidar si la inhibición de la metanotrofia está dada a nivel de genes (ARNm), de actividad, o ambos en cuanto a las MMO. Un mayor aporte a nivel general será explicar lo anterior en cuanto a la pMMO, dado que esta enzima se encuentra en todas las MOBs y es la que entrega la mayor eficiencia en la metanotrofia. Aunque no se ha estudiado la expresión del gen *pmoA* bajo la presencia de H_2S y NH_4^+ , se conoce la expresión de este gen en respuesta a la concentración de CH_4 . En cuanto a esto, a mayor concentración del mencionado gas, mayor es la expresión del gen *pmoA*, como se muestra en la Figura 10, para *Methylosinus trichosporium* OB3b (Han y Semrau, 2004).

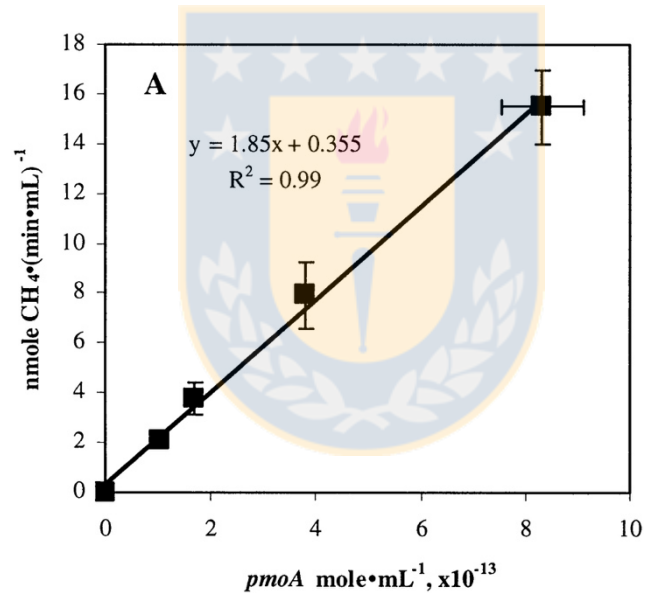


Figura 10. Correlación entre la expresión del gen *pmoA* en la fase exponencial de crecimiento de *Methylosinus trichosporium* OB3b bajo consumo total de CH_4 y en medio NMS con 10 mM de concentración de cobre (Fuente: Han y Semrau, 2004).

Sin embargo, bajo otros compuestos, como metanol, se produce una menor expresión del gen *pmoA*, como se muestra para la MOB acidófila *Methylacidiphilum kamchatkense*, como se muestra en la figura 11 (Erikstad et al., 2012).

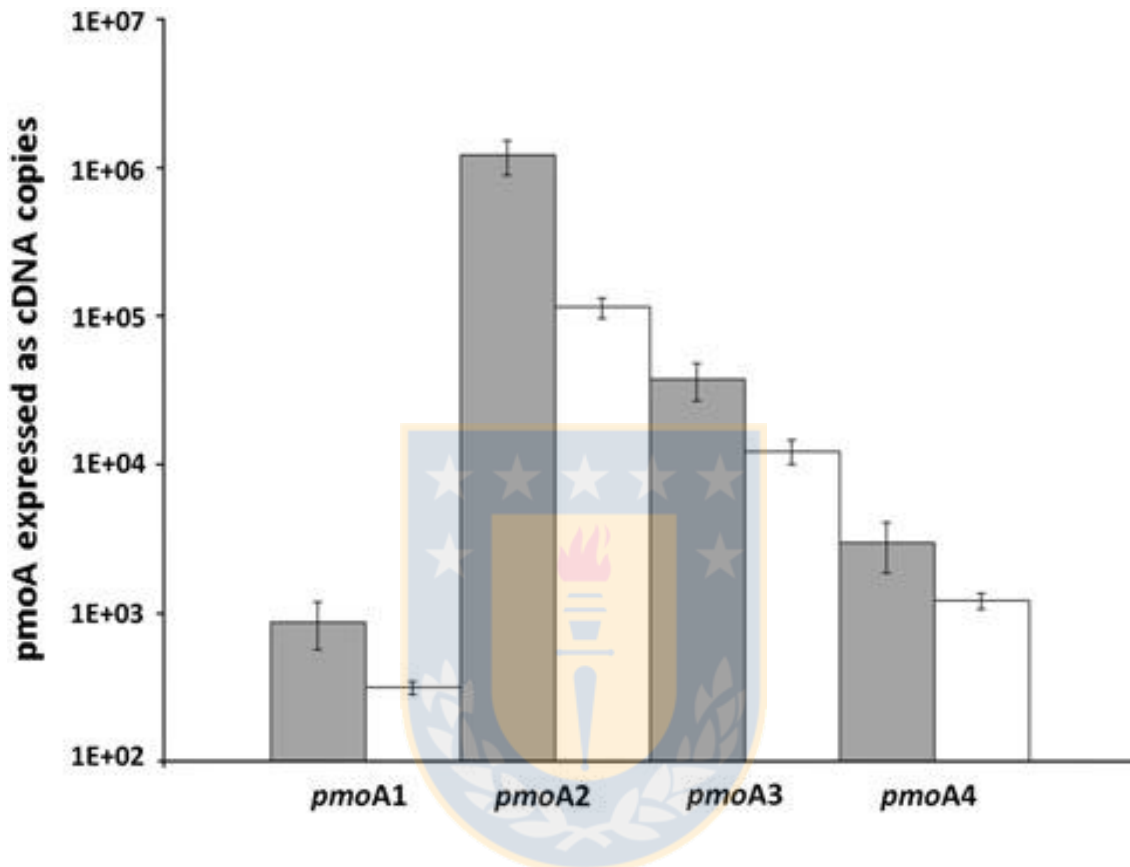


Figura 11. Expresión del gen *pmoA* en *Methylacidiphilum kamchatkense*, creciendo a pH 3,5 y 55 C° con CH₄ (barra gris) o CH₃OH (barra blanca). Número de transcritos de *pmoA* por cada 5 ng de RNA total (Fuente: Erikstad et al., 2012).

Recientemente, se ha informado que el ion amonio (NH₄⁺; amoníaco en solución a pH neutro), inhibe la oxidación de CH₄ por parte de *Methylocystis* sp. cepa SC2 (Figura 12) y afecta la síntesis del ARNm de los genes *pmoA1* y *pmoA2* que codifican para el sitio activo de la MMO de alta afinidad y baja afinidad, respectivamente (Tabla 5)

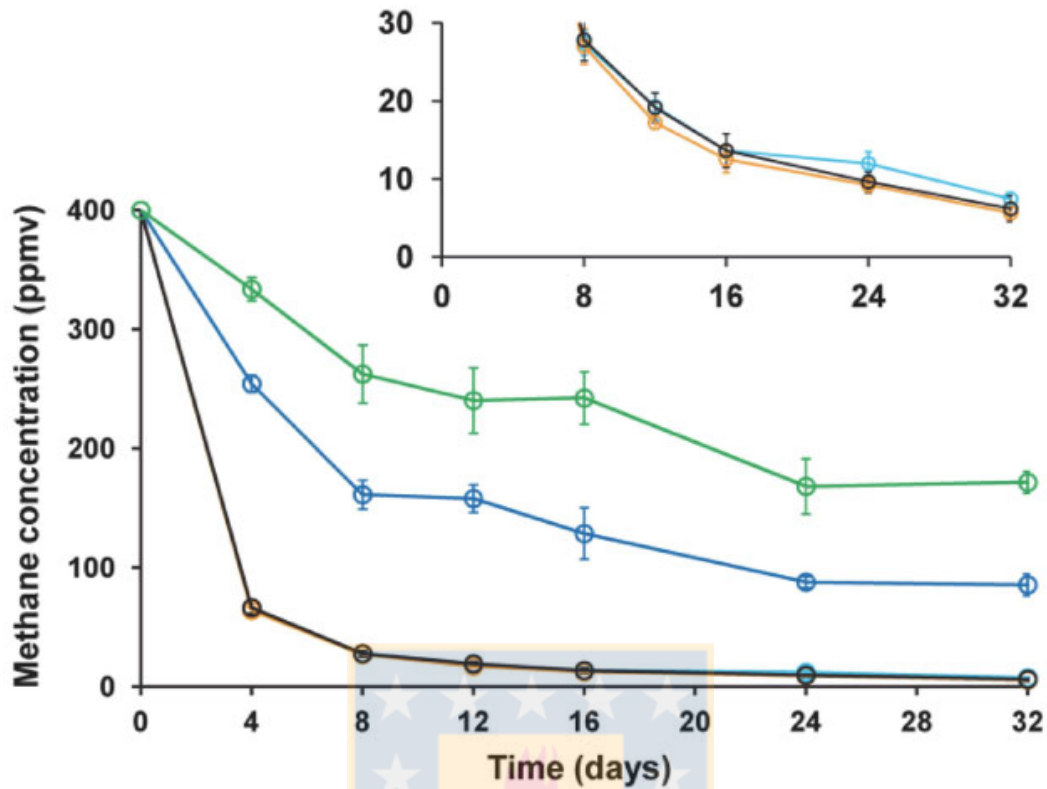


Figura 12. Efecto del incremento en la concentración de NH_4^+ sobre la oxidación de CH_4 de alta afinidad en *Methylocystis* sp. SC2. La concentración de metano usada fue de 400 ppmv, a la cual la pMMO de alta afinidad es funcional. Las concentraciones de amonio probadas fueron 10 mM (negro), 20 mM (azul) and 30 mM (verde). Para verificar que la inhibición de la oxidación de CH_4 se debió a la concentración de NH_4^+ y no a un efecto general de sales, dos condiciones adicionales fueron probadas: 10 mM MgSO_4 (naranja) o K_2SO_4 (azul claro), notándose que no hay efecto inhibitor respecto al control (negro) (Fuente: Dam et al., 2014)

Tabla 5. Modelo de lecturas por kilobases (RPKM) de los genes *pmoA1* (alta afinidad) y *pmoA2* (baja afinidad) en *Methylocystis* sp SC2 en medio NMS o con tratamiento de 30 mM de NH_4^+ (Fuente: Dam et al., 2014).

Gene ID	Gene	RPKM		Function
		NMS	NH4	
Methane oxidation				
BN69_2826	<i>pmoC1</i>	18 846	26 485	Particulate methane monooxygenase subunit C1
*BN69_2827	<i>pmoA1</i>	13 186	17 519	Particulate methane monooxygenase subunit A1
BN69_2828	<i>pmoB1</i>	12 667	16 815	Particulate methane monooxygenase subunit B1
BN69_0202	<i>pmoC2</i>	3 699	82	Particulate methane monooxygenase subunit C2
*BN69_0203	<i>pmoA2</i>	4 621	70	Particulate methane monooxygenase subunit A2
BN69_0204	<i>pmoB2</i>	3 426	104	Particulate methane monooxygenase subunit B2

Un efecto similar podría darse en el caso del H_2S y NH_3 , pero no ha sido descrito a cabalidad hasta la fecha. Sólo se ha descrito datos acerca de números de copias del gen *pmoA* relacionado con el tratamiento de fertilizantes, en el que cabe destacar el efecto de aumento de copias del gen *pmoA* bajo el uso de NH_4^+ , en un cultivo en que predominaron MOBs de los géneros *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylomonas*, *Methylococcus* como se aprecia en la Figura 13 y la expresión de los mensajeros de los genes *pmoA1* (alta afinidad) y *pmoA2* (baja afinidad) bajo adición de NH_4^+ , el que produce el aumento de la síntesis del primer mensajero mencionado y la disminución del segundo, en *Methylocystis* sp. Cepa SC2 (Figura 12 y Tabla 5) (Shrestha et al., 2010; Dam et al., 2014). Sin embargo, trabajos similares con respecto a la adición de H_2S como inhibidor no han sido descritos hasta la fecha.

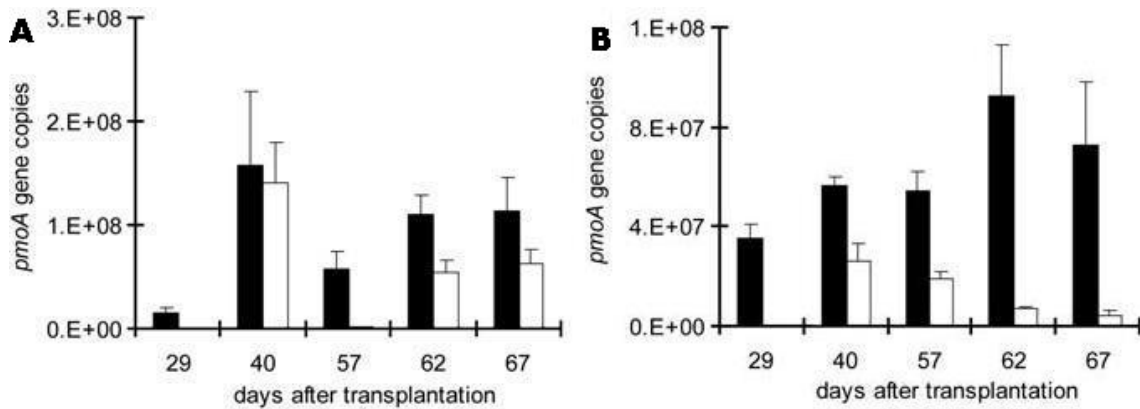


Figura 13. Número de copias del gen *pmoA* en comunidades de MOBs de suelo (barra blanca) y raíces (barra negra). A) sin tratamiento con compuestos nitrogenados; B) Tratado con NH_4^+ (Fuente: Shrestha et al., 2010).

Dado todo lo anteriormente expuesto y considerando que el CH_4 es un gas crítico en el efecto invernadero producido por diversas actividades del hombre, se requiere de su degradación económica y eficiente a través de biopelículas de MOBs, bacterias que se pueden hallar en lagunas, bosques y vertederos. Por otro lado, y según lo descrito con anterioridad, los materiales que aparecen como opción para biopelículas de MOBs son vidrio, poliestireno, polietileno, y cerámica. Además, se debe considerar las cepas mejor descritas, como modelo de MOBs tipo I, X y II en la mayoría de los estudios realizados hasta hoy. Ellas son *Methylococcus capsulatus* (Bath) y *Methylosinus trichosporium* OB3b. Finalmente, tenemos que la oxidación de metano por MOBs se ve inhibida por la presencia de otros gases en mezclas de emanaciones industriales, principalmente TRSs, como el H_2S , y el NH_3 (NH_4^+ en solución) y que esta inhibición se da a nivel de la enzima MMO, cuya forma más abundante es la particulada. Por otro lado, Cabe destacar que el gen

pmoA, que codifica para pMMO (sitio activo), es parámetro de identificación de MOBs y también puede ser investigada su expresión. Hasta la fecha, no hay estudios que utilicen la expresión del gen antes mencionado como parámetro indicador de metanotrofia para evaluar la inhibición ejercida por H_2S y NH_3 , ni para comparar distintos soportes en la formación de biopelículas, así como tampoco hay informes que correlacionen dicha expresión, con la eficiencia en la oxidación de CH_4 en biopelículas. Así, surge la siguiente interrogante: ¿El H_2S y NH_4^+ disminuyen la eficiencia de oxidación de metano en MOBs a través de la menor expresión de ARNm que codifica para la enzima pMMO? El contestar esta interrogante tendrá un valor agregado si se incluye en la investigación, cepas o cultivos aislados desde muestras propias de Chile.



III. HIPOTESIS

En una biopelícula de MOBs, el H_2S (>200 ppm) y NH_3 (>180 ppm) inhiben la síntesis del ARNm del gen *pmoA1* y *pmoA2*.



IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo General

Aislar y caracterizar un cultivo de microorganismos procariontes, cuyas biopelículas oxiden CH_4 y determinar en ellos la expresión del gen *pmoA* en presencia de H_2S y NH_4^+ .

IV.1. Objetivos Específicos

1) Aislar cepas u obtener cultivos de MOBs desde lagunas y bosques de la Octava región de Chile.

2) Comparar el crecimiento, en suspensión, de los aislados con el presentado por las cepas *Methylomicrobium album* (ATCC 33003) y *Methylocystis sp* (ATCC 49242), en presencia de CH_4 como única fuente de carbono.

**Enmarcados en Objetivo específico 1 Proyecto FONDECYT N° 1110919:
Obtener cepas de bacterias oxidadoras de metano (MOBs) Tipo I y II.**

3) Comparar la formación de biopelículas de los cultivos aislados, en soportes de cerámica, vidrio, poliestireno y polietileno de los aislados obtenidos, con la formación de biopelículas en dichos materiales por *Methylomicrobium album* (ATCC 33003) y *Methylocystis sp* (ATCC 49242).

4) En caso de obtener cepas, caracterizar molecularmente la que oxide CH_4 con mayor eficiencia, por secuenciación del gen de ARNr 16S y por detección del gen *pmoA*.

5) En caso de obtener cultivos, Caracterizar la composición microbiana de sus biopelículas más eficientes a largo plazo, estableciendo su identidad mediante secuenciación del gen de ARNr 16S y por detección del gen *pmoA*.

Enmarcado en:

Objetivo específico 5 Proyecto FONDECYT N° 1110919: Diseñar un biofiltro de biotrickling a escala de laboratorio para la bio-oxidación de metano en mezclas con NH₃ o H₂S.

Objetivo específico 7 Proyecto FONDECYT N° 1110919: determinar la robustez de las biopelículas de MOB en largos períodos de operación y diferentes perturbaciones.

Objetivo específico 8 Proyecto FONDECYT N° 1110919: caracterizar las biopelículas de MOBS y sus cambios en composición durante largos períodos de operación.

6) Comparar la expresión del gen *pmoA* de los cultivos aislados, en suspensión y biopelículas, con la expresión de este gen presentada por las cepas *Methylomicrobium album* (ATCC 33003) y *Methylocystis sp* (ATCC 49242), en presencia de H₂S y NH₃.

Enmarcados en Objetivo específico 2 Proyecto FONDECYT: Establecer el efecto de NH₃, H₂S u O₂ sobre la oxidación de CH₄ por MOB Tipo I y Tipo II aisladas, en orden de determinar el grado de inhibición de estos compuestos en la biooxidación de metano en MOB.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Toma de Muestra

Se tomó muestras del tipo y lugares descritos en la Tabla 6. Para ello se recolectó muestras directamente con tubos plásticos de 50 mL (estériles, con tapa) o con pinzas estériles y posterior traspaso a un tubo como el descrito con anterioridad. Los tubos conteniendo muestras se transportaron al laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, en el que inmediatamente se realizó traspaso de 5 mL de muestra a frascos de vidrio de 250 mL, conteniendo 195 mL de medio de sales minerales de nitrato (NMS) modificado (Tabla 7). Se incubó como se describe en el punto V.3.1 de este informe. Réplicas de todas las muestras fueron almacenadas a 4 °C en cámara de frío, como respaldo.

Tabla 6. Lugares y tipos de muestreo (Fuente: elaboración propia).

Lugar	Ubicación	Coordenadas	Tipo de muestra
Bosque de Universidad de Concepción	Gran Concepción, Octava Región, Chile	36° 49' 39" S, 73° 2' 20" W	Suelo
Bosque de Lomas Coloradas de Ranquil	Ñuble, Octava Región, Chile	36° 39' 0" S, 72° 33' 0" W	Suelo
Laguna Grande de San Pedro de la Paz	Gran Concepción, Octava región, Chile	36° 50' 51" S, 73° 6' 36" W	Agua o sedimento
Laguna Chica de San Pedro de la Paz	Gran Concepción, Octava región, Chile	36° 50' 40" S, 73° 5' 15" W	Agua o sedimento

V.2. Medio de cultivo

Se utilizó el medio NMS descrito en la Tabla 7 (Whittenbury et al., 1970; Welander y Summons, 2012). La solución se preparó en un frasco de vidrio de 1 L y se enrasó a 700 mL. Los fosfatos se prepararon a parte en un frasco de vidrio de 500 mL y se enrasó a 300 mL. Luego ambas soluciones se autoclavaron por separado. Luego del autoclave se mezcló las soluciones preparadas, para generar 1 L de medio NMS. La solución traza se preparó en un frasco de 250 mL y se autoclavó a parte. Se agregó una alícuota de solución solución traza a cada frasco de cultivo en una proporción de 0,5 mL por cada 1000 mL de medio NMS.

Tabla 7. Medio de cultivo NMS modificado (Fuente: elaboración propia).

Medio base	
Compuesto	Concentración (g/L)
CaCl ₂ *6H ₂ O	0,2
KH ₂ PO ₄	0,272
Na ₂ HPO ₄	0,717
KNO ₃	1
MgSO ₄	1
Solución traza	0,5 mL
Ajustar pH 6,8 con H ₂ SO ₄ y autoclavar	
Solución traza	
CoCl ₂	0,2
H ₃ BO ₃	0,3
Na ₂ MoO ₄	0,03
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,1
NiCl ₂ *6H ₂ O	0,02
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,03
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,2
CuCl ₂ *2H ₂ O	0,01

V.3. Aislamiento y estudio de los cultivos en fase planctónica (suspensión)

V.3.1. Cultivo y aislamiento en medio NMS

Se dispuso 5 mL de muestra en frasco de 250 mL. Se enrasó con medio de cultivo NMS hasta 100 mL, junto con la alícuota de solución traza, como fue descrito en el punto V.2. Se cerró el frasco con tapón de goma y tapa superior rosca con un agujero en su centro, para dejar acceso al tapón de goma. Se agregó gas metano (CH_4) de tal manera de asegurar desde un 50 a un 70% de CH_4 en la cabeza de aire (bajo presión: no se eliminó el aire contenido). Se incubó a 20 °C y 30 °C y 150 RPM por 14 d. Se observó crecimiento, morfología y afinidad tintorial a través de microscopía óptica a 100X, vía tinción de Gram (descrito en punto V.3.3.), cada 4 d. Transcurrido el tiempo de incubación, se reemplazó la mitad del volumen del cultivo por medio NMS nuevo y se incubó en las condiciones antes descritas durante 7 d. Se observó por microscopía como se describió anteriormente cada 3 d. Finalizada la etapa anterior, se reemplazó el 90% del volumen de cultivo por medio NMS nuevo y se incubó por 7 d, en las mismas condiciones antes descritas y se observó por microscopía, como se describió anteriormente, cada 3 d. Luego, se traspasó una alícuota de 2 mL de cultivo (concentración 10^7 cél/mL) a un vial de vidrio de 60 mL con tapa de goma y sello de aluminio, completando a 20 mL con medio NMS. Se agregó gas CH_4 , asegurando 20% v/v en la cabeza de aire (Dianou et al., 2012). Se incubó a 20 °C y 30 °C (Dworkin et al., 2006), en agitación a 150 rpm por 30 d (Welander y Summons, 2012). A continuación, para el aislamiento, se traspasó cultivo mediante asa curva (asa calibrada), a viales de 10 mL conteniendo medio

NMS sólido (agar en una concentración de 15 g/L) en su pared interior (“roll bottles”). Se cerró el vial con tapa de goma y sello de aluminio. Se incubó a 20 °C y 30 °C durante 14 d (Dianou et al., 2012; Welander y Summons, 2012), bajo atmósfera de CH₄ al 50-70% v/v en cabeza de aire (Svenning et al., 2003). Cada colonia aislada (cepa) fue transferida a un vial de 60 mL conteniendo 10 mL de medio NMS el que fue incubado a 20 °C y 30 °, 150 rpm de agitación, durante 14 d (Dianou et al., 2012). Se observó mediante microscopía óptica a 100X, vía tinción de Gram, cada 4 d. Finalmente, se traspasó 10 mL del vial anterior a un vial de 60 mL, nuevo, y se enrasó a 20 mL con medio NMS. Se cerró como ha sido descrito anteriormente y se agregó gas CH₄, asegurando 20% v/v en la cabeza de aire. Se incubó en las condiciones antes descritas y se hizo cambio del 90% del volumen de cultivo por medio NMS nuevo, cada 7 d. En cada una de las etapas de cultivo se incluyó dos controles negativo: uno que consistió en medio NMS sin inóculo y sin CH₄; el otro constó de medio NMS sin inóculo, pero con CH₄. Ambos por triplicado. Se observó y registró las características macroscópicas de la colonia.

V.3.2. Gas metano (CH₄)

Se utilizó un cilindro de gas CH₄ grado 4.0 (99.99 %), certificado por Indura Group Air Products, según referencia de la Norma Chilena y la Asociación de gases comprimidos, EE.UU.

V.3.3. Microscopía

Se determinó la pureza, morfología, agrupación celular, afinidad tintorial de los cultivos y presencia de gránulos o cuerpos tipo quiste, mediante tinción de Gram. Para ello se dispuso de 50-100 μL de muestra en un portaobjetos y se hizo frotis. Se cubrió el portaobjetos con solución de violeta de Genciana al 1% por 1 min. Se lavó y se cubrió el portaobjetos con solución de Lugol al 10% por 1 min. Se lavó nuevamente y se cubrió el portaobjetos con solución de etanol al 95% por 30 seg. Finalmente, se lavó el etanol y se cubrió el portaobjetos con solución de rojo de Safranina por 30 seg. Se secó el portaobjeto, gentilmente, con papel secante y se observó bajo microscopio óptico, con aumento de 100X, utilizando aceite de inmersión.

V.3.4. Determinación cualitativa de metanotrofia

Las cepas obtenidas como se describió en el punto V.3.1., fueron traspasadas mediante asa curva a “roll bottles” de 10 mL. Se cerró dichos recipientes con tapa de goma y sello de aluminio, sin agregar metano, para averiguar si la cepa es quimiolitotrófica (Hoefman et al., 2011). Se incluyó dos controles negativos: uno con CH_4 al 20 % en la cabeza de aire, otra sólo con aire.

V.4. Perfil Bioquímico para identificación bacteriana

V.4.1. Crecimiento en medios especiales

Se dispuso los siguientes reactivos, en viales separados, asegurando su concentración en 20 mL de cultivo con medio NMS: KCN 0,0075 %, Cristal violeta 0,001%, verde de malaquita 0,001%, SDS 0,01% y azida de sodio (NaN_3) 0,02 % (Bowman et al., 1993; Garrity et al., 2005a y b). El volumen total incluyó un inóculo de 2 mL de cultivo líquido de la cepa correspondiente (concentración 10^7 cél/mL). Dichos viales fueron cerrados con tapa de goma y sello de aluminio. Se agregó CH_4 al 20 % en la cabeza de aire. Se incubó a 30 °C y 150 RPM durante 14 d. Se incluyó un control negativo para cada serie, el cual consistió en medio NMS más un reactivo de los antes mencionados, sin inóculo, con CH_4 o sin el. Además, los experimento de cristal violeta y verde malaquita fueron ensayados en NMS agar. Para ello, se dispuso de la mezcla NMS más agar al 1,5 % más reactivo mencionado, en viales y se dejó solidificar a la forma de “pico de flauta”. Luego, se inoculó mediante traspaso desde cultivo líquido con asa curva, se cerró con tapa de goma, sello de aluminio y se agregó CH_4 al 20 % en la cabeza de aire.

V.4.2. Test de oxidasa y catalasa

Se traspasó 500 μL de cultivo de las cepas obtenidas a un tubo Ependorff de 1,7 mL. Desde allí se traspasó una gota del cultivo correspondiente, a una tira de test de oxidasa (Microbiology Bactident® Oxidase, Merck, Alemania). El viraje de color blanco del papel filtro a color azul indicó presencia de enzima citocromo oxidasa

(oxidasa +). A continuación, desde un “roll bottle” se traspasó una colonia completa de cepa (con asa curva de níquel-cromo) a 50-100 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) dispuestos en un portaobjetos (Reiner, 2010). La aparición de burbujas indica presencia de enzima catalasa (catalasa +).

V.5. Curva de crecimiento de cultivos en suspensión

V.5.1. Curva de calibración de absorbancia versus conteo celular

Se dispuso de un cultivo *Methylocystis sp.* ATCC 49242 de 14 d. Se traspasó 1,7 mL de cultivo a un tubo Ependorff y se diluyó en serie a 0,75; 0,5; 0,25; y 0,125 veces. Se incluyó un control negativo (medio de cultivo NMS sin inóculo). Las diluciones y el control negativo fueron observadas en microscopio óptico con cámara de Neubauer, para conteo celular. A su vez, se midió la absorbancia a 600 nm de las diluciones. Los datos obtenidos fueron graficados para obtener una curva de calibración de absorbancia versus conteo celular (células mL^{-1}).

V.5.2. Curva de crecimiento en suspensión

Se dispuso de cultivos de 7d, de todos los aislados obtenidas en este estudio y de las cepas de colección de *Methylomicrobium álbum* y *Methylocystis sp.*, como inóculo para este experimento. Basado en la curva de calibración descrita en el punto V.4.3. se midió absorbancia y se calculó el inóculo, asegurando una concentración celular inicial de 10^6 células mL^{-1} en 20 mL de cultivo líquido total en cada vial. Se cerró cada vial con tapa de goma y sello de aluminio. Se agregó 0,2

mL de CH₄ a cada vial, mediante jeringa de gases con válvula, procurando una concentración de 50.000 ppm de CH₄ en la cabeza de aire de cada frasco. Se incubó a 30 °C y 150 RPM. Se tomó 0,5 mL de muestra una vez al día, a la cual se midió absorbancia a 600 nm. Finalmente se calculó la concentración celular según curva de calibración descrita en punto V.4.3. y se graficó estos datos versus el tiempo transcurrido. Se incluyó dos controles negativo, uno alimentado con metano y otro sin metano. Además, se incluyó un control sin metano de cada aislado (con inóculo), para descartar crecimiento de quimiolitotróficos. Todas las condiciones fueron probadas por triplicado.

V.5.3. Velocidad específica de crecimiento

Durante la fase exponencial, la velocidad de crecimiento es constante y es llamada velocidad de crecimiento específica (μ t), donde la concentración de células está dada por la siguiente expresión:

$$X = X_0 \cdot e^{(\mu \cdot t)} \quad (1)$$

Donde X es la concentración de células en un cierto tiempo (células ml⁻¹), X₀ es la concentración inicial (células ml⁻¹), “e” es la constante de Neper (2,718), μ es la velocidad de crecimiento específica y t es el tiempo en horas. De la expresión (1) se obtuvo la siguiente ecuación para el cálculo de la velocidad de crecimiento específica:

$$\mu = \frac{(\ln X - \ln X_0)}{t} \quad (2)$$

Las velocidades de crecimiento específicas fueron calculadas para un período de 24 h, en orden de comparar los cultivos en estudio en cuanto a este parámetro.

V.5.4. Prueba estadística

Tests ANOVA de una vía y t student (según correspondió), con un intervalo de confianza de un 95% fueron realizados sobre los datos de velocidad de crecimiento específica (punto V.5.3.), para averiguar si este parámetro de crecimiento fue significativamente diferente entre los aislados bacterianos y las cepas control. El valor de P fue calculado y se consideró diferencia significativa si este número fue menor que 0,05. Estos test sólo fueron aplicados si la distribución de los datos era normal, lo que fue determinado según lo descrito en el punto V.9.3.

V.6. Ceparío

Se traspasó 700 µL de cultivo de cada cepa pura a tubo ependorff, al cual se añadió primero 300 µL de glicerol al 70% como criopreservante. Finalmente se almacenó los tubos a -80°C.

V.7. Desarrollo de biopelículas de MOBs

Se utilizó polietileno, vidrio y canutos de cerámica como material de soporte, a la forma de anillos con dimensiones de 8 x 5 x 1 mm, entregando una superficie total de 259,2 mm². Se utilizó viales de 60 mL en los que se introdujo 30 anillos de soporte, se completó hasta 20 mL con medio de cultivo NMS y se inoculó con las MOBs en estudio, asegurando una concentración de 10⁸ bacterias mL⁻¹. Se cerró cada vial con tapón de goma y sello de aluminio. Se introdujo gas metano hasta una concentración del 50% en la cabeza de aire y se incubó a 30 °C y 150 rpm de agitación por 15 d, tiempo durante el cual se tomó muestra de 3 anillos al día y se resuspendieron las bacterias adheridas a ellos en 5 mL. mediante sonicación por 30 s. Se realizó recuento de las bacterias vivas y muertas mediante tinción Baclight (Invitrogen, USA). Al cabo del período de incubación mencionado, se eliminó el medio de cultivo y se completó hasta 20 mL con medio de cultivo nuevo, cerrando los viales de la misma manera y con la misma concentración de CH₄ antes descritas. Se incubó en las mismas condiciones antes mencionadas durante 50 d, renovando medio de cultivo cada 7 d, para obtener biopelículas para determinación de consumo de metano. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. La velocidad de crecimiento específico en cada soporte fue calculada según la ecuación 2 descrita en el punto V.5.3 y fue graficada versus el cultivo y el material de soporte. Además se graficó el número de bacterias adheridas por mm² versus el tiempo en d, para cada cepa y material de soporte. Se usó microscopía electrónica de barrido para visualizar las células adheridas al soporte y las redes de exopolisacáridos deshidratadas. Además, se obtuvo microscopía confocal por láser

(CSLM) de las biopelículas en el soporte en que se obtuvo mayor adherencia, para observar la topología de la biopelícula. Para esto último se utilizó tinción de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Finalmente se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los cultivos líquidos correspondientes a cada biopelícula, para observar morfología y disposición de las ICMs.

V.7.1. Curva de calibración para cromatografía de gas

Se realizó diluciones de CH₄ en aire, con tal de obtener frascos con concentraciones de 1,88%; 3,75%; 7,5% y 15% de CH₄. Se sometió a cromatografía de gas en cromatógrafo con detector de conductividad térmica (TCD) Clarus 500 (Perkin Elmer, USA; N° de serie: 650N7051407), en el que se utilizó una columna de teflón con material de empaque Haye Sep Q (Supelco/Sigma Aldrich, USA). Se determinó el área bajo la curva para cada concentración y se realizó una gráfica de porcentaje de CH₄ vs área (n=3). Se obtuvo la ecuación de la recta (promedio) por regresión lineal para calcular el porcentaje de metano en una muestra problema.

V.7.2. Determinación de metano en cabeza de aire

Se introdujo 8 anillos de soporte, con biopelículas de 30 d de incubación en viales de 20 mL y se completó hasta 5 mL con medio NMS. Se cerró con tapón de goma y sello de aluminio. Se introdujo CH₄ hasta una concentración de 50% y se incubó durante 3 d, tiempo después del que se eliminó el medio de cultivo y se cerró los viales de la misma manera antes descrita. Se introdujo 1 mL de CH₄ en cada vial mediante jeringa *gastight*, asegurando una concentración de 5% del gas

mencionado en la cabeza de aire y se incubó durante 7 d. Se tomó 1 mL de muestra al día y se sometió a cromatografía en el equipo descrito en el punto V.7.1, obteniéndose las áreas bajo la curva. Se calculó la concentración de CH₄ interpolando las mencionadas áreas en la curva de calibración obtenida en el punto V.7.1.

V.7.3. Inhibición de la metanotrofia con H₂S y NH₃

Se dispuso de cuatro series de viales de 20 mL con soportes conteniendo biopelículas de MOBs obtenidas como describió en el punto V.8.2 (por triplicado). Se agregó 5000 ppm (5%) de CH₄ a la cabeza de aire de la primera serie (sin tratamiento), 5000 ppm de CH₄ más 200 a 500 ppm de H₂S a la segunda serie, 5000 ppm de CH₄ más 200 a 500 ppm de H₂S más 200 a 500 ppm de NH₃ a a tercera serie y 5000 ppm de CH₄ más 200 a 500 ppm de NH₃ a la cuarta serie. Se incubó en las mismas condiciones descritas en el punto V.8 durante 7 d. Se tomó 1 mL de muestra de cabeza de aire al día y se determinó la composición de CH₄ y CO₂ en el cromatógrafo de gas mencionado en el punto V.7.1. Se obtuvo la concentración de CH₄ como se ha descrito en el punto V.7.2. Se graficó la concentración de CH₄ sin tratamiento y con tratamiento, versus el tiempo en d, y se obtuvo las eficiencias de oxidación de CH₄ en nmol por cada célula y por cada hora.

V.8. Inhibición de la metanotrofia y síntesis del ARNm de *pmoA1* y *pmoA2*

Se realizó el mismo experimento descrito en el punto V.7.3, tanto en biopelículas como en cultivos de 2 d en suspensión en frascos de 60 mL conteniendo 20 mL de

cultivo con 10^8 bacterias/mL final cada uno, por triplicado (las cuatro series). Al cabo de 18 h se colectó 5 anillos de polietileno en el caso de los experimentos de biopelículas y 2 mL de cultivo en el caso de los experimentos en suspensión. Se resuspendió las biopelículas contenidas en los anillos de polietileno en 2 mL de medio de cultivo NMS sometiendo a agitación fuerte en *beadbeater* durante 40 s y tras pasando la resuspensión a tubos de 2 mL nuevos. Tanto las resuspensiones de biopelículas como las muestras de cultivos líquidos fueron medidas en espectrofotómetro Tecan Infinite F200 pro (Tecan Trading AG, Suiza) a 610 nm y se ajustó las concentraciones hasta tener una OD_{610} igual a 0,5. Se extrajo ARN total mediante kit GeneJET RNA Purification (Thermo Scientific, Lituania) siguiendo el protocolo modificado descrito en el punto V.8.1. A continuación se sometieron los extractos a concentración y purificación por columna a través del kit GeneJET RNA Cleanup Concentration (Thermo Scientific, Lituania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la concentración de ARN en espectrofotómetro Tecan Infinite F200 pro y se ajustó por dilución los extractos para obtener la misma concentración de ARN total (la menor). Finalmente se sometió los extractos a transcripción reversa y posterior PCR en tiempo real (RT-qPCR) como se describe posteriormente en el punto V.8.2.

V.8.1. Extracción de ARN

Se transfirió 1,5 mL de resuspensión de biopelículas o cultivo bacteriano líquido a tubos Eppendorf de 1,5 mL. Se colectó las células por centrifugación a 13.000 rpm por 2 min. Se removió cuidadosamente el sobrenadante, dejando el *pellet* lo más

seco posible, el que luego fue resuspendido en 300 μL de buffer TE conteniendo lisozima a una concentración final de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ y se mezcló invirtiendo los tubos varias veces. Se incubaron las células resuspendidas por 15 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A continuación, se agregó 300 μL de buffer de lisis (conteniendo 20 μL de β -mercaptoetanol $14,3 \text{ M}$ cada 1 mL de buffer de lisis) y se sometió a ruptura y homogeneización usando rotor-estator (*bead beater*), inmediatamente, durante 40 s. Luego, se añadieron 600 μL de proteinasa K diluida (10 μL de proteinasa K en 590 μL de buffer TE) y se mezcló en vortex brevemente, para luego incubar a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. Se añadió 450 μL de etanol al 100% y se mezcló por pipeteo. Se transfirió 700 μL de lisado a cada columna de purificación del kit insertadas en los tubos de colección de 2 mL y luego se centrifugó por 1 min a 13.000 rpm y se descartó el líquido colectado, devolviendo la columna a su tubo colector. Se repitió este paso hasta traspasar todo el lisado a la columna de purificación y se insertó cada columna en un nuevo tubo colector de 2 mL. Se añadió 700 μL de buffer de lavado 1 (conteniendo etanol al 100% según describe el kit) y se centrifugó por 1 min a 13.000 rpm. Se descartó el líquido colectado y se devolvió la columna a su tubo colector. Se añadió 600 μL de buffer de lavado 2 (conteniendo etanol al 100% según describe el kit) y se centrifugó or 1 min a 12.000 g. Se descartó el líquido colectado y se devolvió la columna a su tubo colector. Se añadió 250 μL de buffer de lavado 2 y se centrifugó por 2 min a 13.000 rpm. Se descartó el tubo colector y se insertó la columna en un tubo ependorff estéril y libre de ARNasa (incluido en el kit). Se añadió 50 μL de agua libre de nucleasas (incluida en kit) a cada columna, justo en el centro de la membrana y se centrifugó por 1 min a 13.000 rpm para eluir

el ARN. Se repitió este último paso con 50 μL adicionales de agua libre de nucleasas para así obtener un solución de ARN de 100 μL . Finalmente se purificó y concentró cada extracto de ARN mediante el kit GENEJET RNA Cleanup and Concentration, siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, Lituania).

V.8.2. Determinación de la síntesis de los ARNm de los genes *pmoA1* y *pmoA2*, mediante RT-qPCR

Se realizó RTqPCR en un solo paso, de una alícuota de 2 μL de extracto de ARN a una concentración total promedio de 50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, utilizando el kit KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Kapa Biosystems, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el gen *pmoA1* se usaron los primers *forward* (F): A189 (5' GGNGACTGGGACTTCTGG 3') y *reward* (R): 682bd (5' GAASGCNGAGAAGAASGC 3') (Ricke et al., 2004).

Para el gen *pmoA2* se utilizaron F: *pmoA206F* (5' GGNGACTGGGACTTCTGGATCGACTTCAAGGATCG 3') y R: *pmoA703bb* (5' GAASGCNGAGAAGAASGCGGCGACCGGAACGACGT 3') (Ricke et al., 2004).

Se usó el mix de PCR descrito a continuación: 2,4 μL de H_2O para PCR; 5 μL de Kapa SYBR FAST qPCR master mix 2X; 0,2 μL del primer F (desde stock 10 μM); 0,2 μL del primer R (desde stock 10 μM); 0,2 μL KAPA RT mix 50X; 2 μL de extracto de ARN (templado). El volumen final de cada reacción fue de 10 μL . Para los ciclos térmicos se usó un termociclador LightCycler 2.0 (Roche, Suiza). El protocolo a seguir fue el siguiente: RT: un ciclo de 42 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min, seguido de un ciclo de

inactivación de la RT a 95 °C por 5 min. PCR: 40 ciclos compuestos de: 1 ciclo de 95 °C por 3 s, seguido de 1 ciclo de alineamiento a 50 °C para los primers A189 y 682bd, y de 66 °C en el caso de los primers pmoA206F y pmoA703bb, seguido 1 ciclo de 72 °C por 23 s. Luego de los 40 ciclos se finalizó con un ciclo de 72 °C por 7 min. Se incluyó un control negativo sin templado (NTC) y un control negativo con ARN de *Methylobacterium album*, pero sin mix de RT (NRT).

Para averiguar la expresión de los mensajeros en estudio, se utilizó el método de cuantificación relativa en el que se comparó del parámetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como gen de referencia (*housekeeping gene*) el que codifica para el ARNr 16S, mediante RT-qPCR con los partidores universales 341F (5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3') (Muyzer et al., 1993) y 907R (5' CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 3') (Muyzer et al., 1998) y usando los mismos ciclos térmicos, excepto por el de alineamiento que fue de 58 °C.

A partir de las curvas de amplificación de RTqPCR en un solo paso, se obtuvo el coeficiente umbral (Ct) para las condiciones sin y con tratamiento (CH₄+H₂S; CH₄+H₂S+NH₃ o CH₄+NH₃), tanto para el gen de ARNr 16 usado como *housekeeping gene*, como para los genes *pmoA1* y *pmoA2* (genes objetivo o *targets*), que codifican para la pMMO (alta y baja afinidad respectivamente). Con dichos valores se calculó el parámetro de expresión relativa de los genes objetivo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, el que fue utilizado para confeccionar gráficos de expresión relativa versus el tratamiento para cada cultivo. También se graficó la expresión relativa de los genes objetivo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ versus la tasa de consumo de sulfato para averiguar si hay correlación en los resultados.

V.9. Extracción de ADN

Se extrajo ADN de los aislados que fue posible mantener en laboratorio y que presentaron la mayor tasa de oxidación de CH₄, uno obtenido desde bosque y otro obtenido de laguna. Para ello se obtuvo un pellet de 1,7 mL de cada cultivo en tubos Ependorff, por centrifugación a 8.000 RPM por 10 min. Se eliminó sobrenadante y se resuspendió cada pellet en 310 µL de tampón HTE (HTE: 50 mM de Tris-HCl, 20 mM de EDTA, pH=8). Luego se agregó 350 µL de SDS al 2% en tampón HTE y se mezcló por inversión 7 veces. Se agregó 5 µL de Rnasa A y se incubó la mezcla a 37 °C por 15 min. Después se agregó Proteinasa K y se incubó a 50 °C por 1 hora. Transcurrido lo anterior, se agitó a máxima velocidad por 2 min en vortex, para disgregar el ADN. A continuación, bajo campana, se agregó 700 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se mezcló en vortex un instante para luego centrifugar a 11.000 rpm durante 3 min. Luego, se tomó cada fase acuosa (superior) producida y se traspasó a tubos nuevos. Se repitió este procedimiento desde el agregado de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, 2 veces más. Después se agregó a cada tubo 1/10 de su volumen final, de acetato de sodio 3 M, se mezcló bien y se refrigeró a -20 °C por toda la noche. Pasado lo anterior, se centrifugó a 11.000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante, y se lavó el pellet de ADN con etanol al 70% y -20 °C. Finalmente, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 30–50 µL de agua mq/DEPC (libre de nucleasas).

V.9.1. PCR para gen de ARNr 16 y secuenciación de ADN

Se mezcló 1 μL de solución de ADN extraído (templado) con 23 μL de un mix para PCR con la siguiente composición: 5 μL de Buffer para Go Taq (Madison Wisconsin, Promega, USA), 1,5 μL MgCl_2 , 0,5 μL dNTPs (10 mM), 1,25 μL de cada partidor (10 μM), 0,125 μL de Gotaq. Se utilizó los partidores 27F (5' GTGCTGCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (5' CACGGATCCTACGGGTACCTTGTACGACTT 3') (DeLong 1992). Para control negativo se utilizó mix de PCR sin templado. Las mezclas fueron dispuestas en tubos de PCR y llevadas a termociclador. Se usó los siguientes programas térmicos: PCR bacteria: 94 °C 2 min, 30 ciclos que incluyeron: 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min, luego un ciclo de 72 °C 10 min, y un conservado final de 20 °C. los productos de PCR obtenidos fueron enviados a servicio de secuenciación de ADN de Macrogen, Korea.

V.9.2. Análisis de secuencias

Las secuencias de ADN obtenidas en el punto anterior fueron sometidas a búsqueda de secuencias por alineamiento, utilizando la herramienta informática BLAST (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1997). Se usó la modalidad Megablast sobre base de datos no redundante (non-redundant database). El parámetro match/mismatch scores fue ajustado a un valor de 0,33 (1/-3), según lo descrito en el capítulo 16 del NCBI Handbook (McEntyre y Ostell, 2002) y en web BLAST page options (Altschul et al., 1997). Se utilizó valores por defecto en el resto

de los parámetros. Se seleccionó las secuencias con un porcentaje de identidad mayor al 87%, un E-value menor que 10^{-4} , y se utilizaron para la elaboración de un árbol filogenético en el programa MEGA versión 6 (Tamura et al., 2013). Como raíz, se utilizó la secuencia de ADNr 16S de *Thiobacillus thioparus*. Se realizó un alineamiento de las secuencias antes mencionadas mediante ClustalW (Mount, 2004). Se usó el sistema de scoring match/mismatch por defecto. Se utilizó la penalización de affine gap con los parámetros 15/6,66, mientras que el delay divergent cutoff fue ajustado a 50. La historia evolutiva fue inferida usando el método neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987), que fue validado utilizando árbol de consenso tipo bootstrap con las réplicas ajustadas a 1000 (Salo-Zieman et al., 2006) y mostrando una escala de 0,01 sustituciones de nucleótido por posición de secuencia (equivalente a 1% de diferencia entre secuencias). Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método maximum composite likelihood (Tamura et al., 2004).

V.9.3. Análisis estadístico

La distribución de los datos de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) y de tasa de consumo de CH_4 fue investigada sometiendo los datos a prueba de normalidad de datos de D'Agostino y Pearson, con intervalo de confianza de 95% y $\alpha = 0,05$ en el software Prism 6 (Graph Pad, USA). Se consideró que los datos tuvieron una distribución normal cuando el valor de P fue mayor a 0,05.

Para todas las comparaciones entre los datos de controles y condiciones experimentales de las experiencias descritas en los puntos V.7, V.7.3 y V.8.2 se

utilizó prueba estadística t student, siempre que la distribución de los datos fuera normal.

V.9.4. Correlación entre expresión relativa de los mensajeros para *pmoA* y la tasa de consumo de CH₄ en biopelículas

La expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) del ARNm para el gen *pmoA1* y *pmoA2* fue obtenida como fue descrito en el punto V.8.2 y la tasa de consumo de CH₄ fue determinada según lo establecido en el V.7.3 y V.7.4, tanto para el control con CH₄, como para cada condición experimental (CH₄+H₂S, CH₄+H₂S+NH₃ y CH₄+NH₃). La correlación entre la expresión relativa y la tasa de consumo de CH₄ fue determinada calculando el coeficiente de Pearson (r) mediante el software Prism 6 (Graph Pad, USA). Se consideró que existió correlación en el mismo sentido cuando: $0 < r < 1$; y en el sentido inverso cuando $-1 < r < 0$. Se asumió que no hubo correlación si $r = 0$. De igual manera, si r tuvo un valor distinto de 0, se consideró que esta correlación no fue al azar sólo si el valor estadístico P para el test (intervalo de confianza de 95%, $\alpha = 0,05$) fue menor que 0,05.

VI. RESULTADOS

VI. 1 Toma de muestra

Como se describió en el punto V.1., se obtuvo muestras cuyo detalle se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Muestras obtenidas en este estudio al 30 de Agosto del 2013 (Fuente: elaboración propia).

Muestra	Nombre	Descripción	Fecha
1	LG A 3	Laguna grande, agua, muestra 3	24/9/2012
2	LG A Pen 2	Laguna grande, agua, península,	24/9/2012
3	LG A Hum	Laguna grande, agua, humedal,	24/9/2012
4	LG A 2 1	Laguna grande, agua, lugar 2, muestra	24/9/2012
5	LG A 2 2	Laguna grande, agua, lugar 2, muestra	24/9/2012
6	LG S1	Laguna grande, suelo, muestra 1	24/9/2012
7	LG S2	Laguna grande, suelo, muestra 2	24/9/2012
8	LG S Pen 1	Laguna grande, suelo, península,	24/9/2012
9	LG S 2 1	Laguna grande, suelo, lugar 2,	24/9/2012
10	LG S 2 2	Laguna grande, suelo, lugar 2,	24/9/2012
11	LG S Pen 3	Laguna grande, suelo, península,	24/9/2012
12	LC S R 1	Laguna chica, suelo y raíces de árbol,	24/9/2012
13	LC S R	Laguna chica, suelo y raíces, sauce,	24/9/2012
14	LC Agua 3	Laguna chica, agua, muestra 3	24/9/2012
15	LC T Cerro	Laguna chica, tierra, cerro, muestra 4	24/9/2012
16	RAM 1	Bosque UdeC, raíz, arcilla y musgo,	24/9/2012
17	RS 1	Bosque UdeC, raíz y suelo, muestra 1	24/9/2012
18	S 1	Bosque UdeC, suelo, muestra 1	24/9/2012
19	SBP 1 1	Bosque pino, Ránquil, suelo, lugar 1,	12/5/2013
20	SBP 1 2	Bosque pino Ránquil, suelo, lugar 1,	12/5/2013
21	SBE 2 1	Bosque eucalipto Ránquil, suelo, lugar	12/5/2013
22	SBE 2 2	Bosque eucalipto Ránquil, suelo, lugar	12/5/2013
23	LG HUM 1S	Laguna grande, suelo, humedal,	12/5/2013
24	LG Hum 2	Laguna grande, agua, humedal,	12/5/2013
25	LG Anfi 1 S	Laguna grande, suelo, anfiteatro,	12/5/2013
26	LG Anfi 2 A	Laguna grande, agua, anfiteatro,	12/5/2013

VI. 2. Cultivo y aislamiento

Se cultivó todas las muestras descritas en la tabla 8, según fue descrito en el punto V.3.1. De dichos cultivos, los descritos en la tabla 9 demostraron ser metanotróficos (crecimiento en presencia de CH₄ y no crecimiento sin CH₄).

Tabla 9. Cultivos metanotróficos obtenidos en este estudio (Fuente: elaboración propia).

Cultivo	Observación microscópica
RAM 1	Bacilos cortos Gram negativos, sin agrupación.
S 1	Bacilos cortos y medianos Gram negativos, sin agrupación.
LG Hum 1S	Bacilos y cocos Gram negativos, sin agrupación. Bacilos de gran tamaño gram negativos, agrupados en cadena.
LC Agua 3	Cocos Gram negativos, sin agrupación.
LG Hum 2A	Cocos pequeños Gram negativos, sin agrupación o en racimo. Bacilos pequeños Gram negativos ocasionales.
SBP	Cocos y diplococos Gram negativos pequeños, agupados en racimo.
SBE	Cocos, diplococos y bacilos cortos Gram negativos pequeños, sin agrupación.

De los cultivos descritos en la tabla 4, se obtuvo colonias aisladas en “roll bottles”, las cuales resultaron ser de igual forma, color y tamaño para cada cultivo. En la Tabla 10 se detalla la observación microscópica de los aislados en cultivo líquido, obtenidos de la manera descrita en el punto V.3.1. Cada aislado fue denominado con una letra griega. Todos los aislados crecieron a 30 °C.

Tabla 10. Características macroscópicas y microscópicas de los aislados bacterianos obtenidos en este estudio (Fuente: elaboración propia).

Aislado	Muestra	Observación macroscópica	Observación microscópica
α	LG Hum 1S	Colonia pequeña, blanca, bordes irregulares, opaca.	Bacilos cortos Gram negativos, agupados en cadena.
β	SBE 2 1	Colonia de 1 mm. promedio, pigmento ligeramente café, no soluble, bordes irregulares, opaca.	Bacilos cortos Gram negativos, agrupados en racimo.
γ	SBP 1 1	Colonia de 1 mm. promedio, pigmento ligeramente café, no soluble, bordes irregulares, opaca.	Bacilos cortos Gram negativos, agrupados en racimo.
σ	LC Agua 3	Colonia pequeña, color crema a blanquecino, brillante, redonda, convexa, de bordes regulares.	Bacilos cortos Gram negativos, agrupados en cadena.
ε	LG Hum 2 A	Colonia de 1 mm. promedio, pigmento rosado, no soluble, bordes irregulares, opaca.	Bacilos cortos Gram negativos, agrupados en cadena.
Ω	S1	Colonia pequeña, blanca, opaca, redonda, convexa, de bordes regulares.	Bacilos Gram negativos, agrupados en cadena.

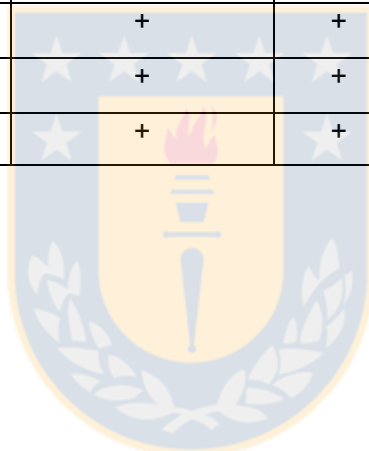
VI.3. Crecimiento en medios especiales

El resultado del cultivo de las cepas en los medios especiales se detalla en la Tabla 11. En el caso de Medios con cristal violeta agar y verde de malaquita agar, un resultado positivo el crecimiento de colonias aisladas. Un resultado positivo para SDS NaN₃ y KCN, consta del enturbiamiento del medio (crecimiento bacteriano).

Ejemplos de viales positivos y negativos para cristal violeta agar y verde de malaquita agar, se observan en la Figura 14.

Tabla 11. Crecimiento de aislados en medios especiales (Fuente: elaboración propia).

Aislados	Cristal Violeta 0,001 %	Verde Malaquita 0,001 %	SDS 0,01 %	NaN ₃ 0,02%	KCN 0,0075 %
α	+	+	+	-	+
β	+	+	+	-	+
γ	+	+	+	-	+
σ	+	+	+	-	+
ε	+	+	+	+	+
Ω	+	+	+	-	+



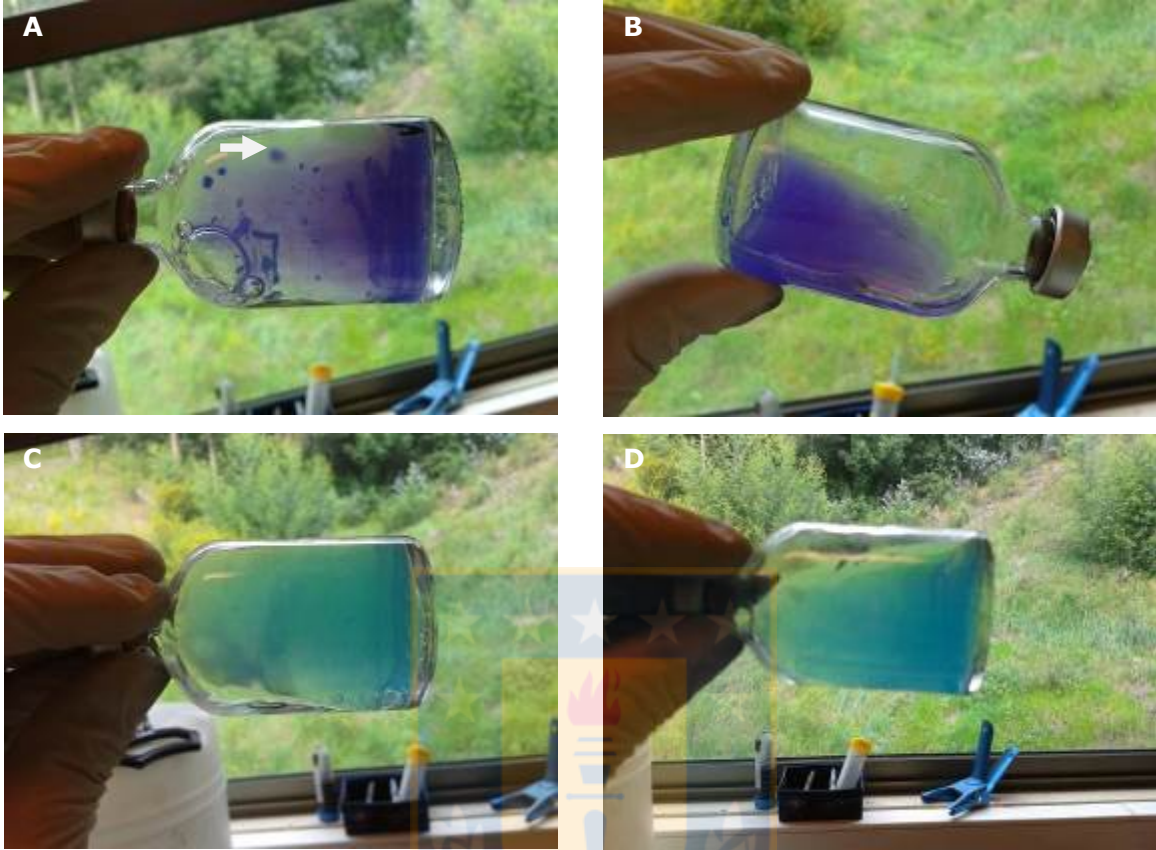


Figura 14. Ejemplos de viales positivos y negativos con medios especiales más agar. A) Positivo para cristal violeta, B) negativo para cristal violeta, C) positivo para verde de malaquita, D) negativo para verde de malaquita. Colonias aisladas han sido destacadas con flechas blancas (Fuente: elaboración propia).

Imágenes del aspecto de los viales luego de una semana de incubación en las condiciones descritas en el punto V.3.1. se muestran en la Figura 15.

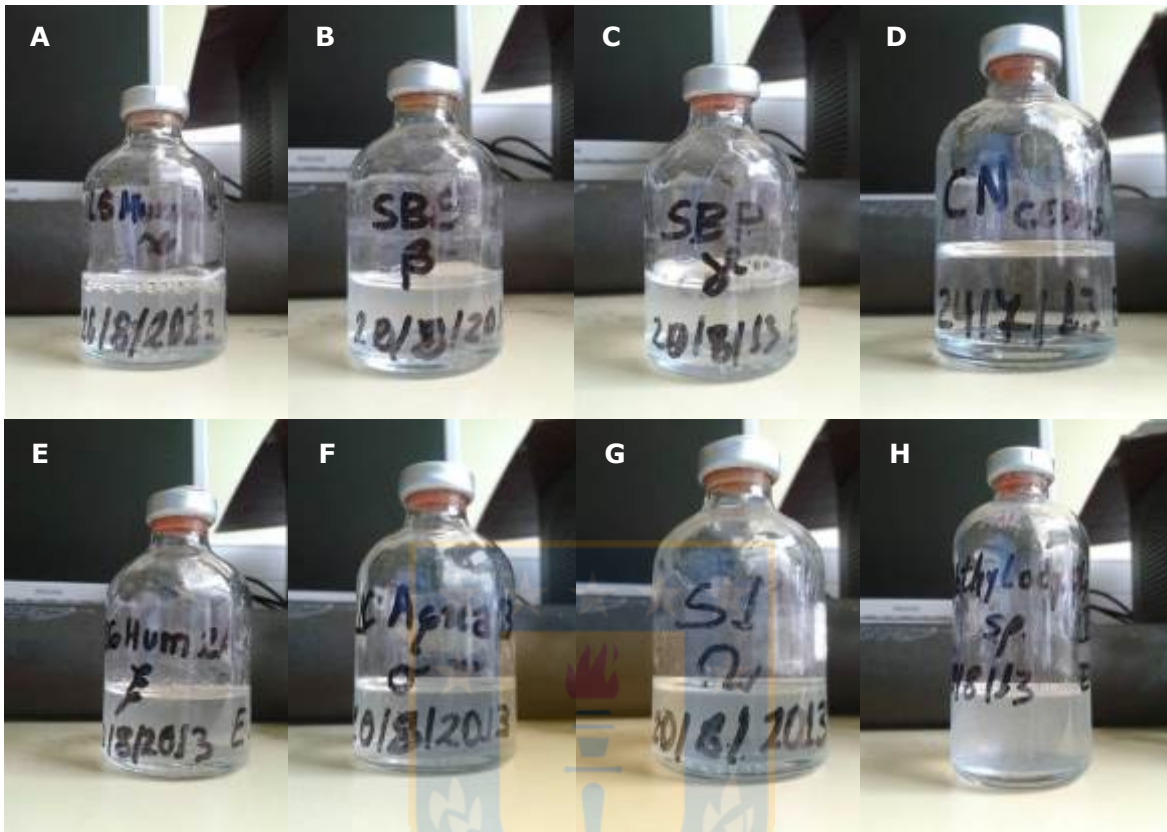


Figura 15. Viales de cultivo luego de una semana de incubación. A) cepa α , B) cepa β , C) cepa γ , D) Control Negativo (sin inóculo, con CH_4), E) cepa ε , F) cepa σ , G) cepa Ω , H) *Methylocystis sp* (ATCC 49242) (Fuente: elaboración propia).

VI.4. Test de oxidasa y catalasa

Los resultados de las pruebas de oxidasa y catalasa se detallan en la Tabla 12.

Tabla 12. Tests de oxidasa y catalasa (Fuente: elaboración propia).

Cepa	Oxidasa	Catalasa
α	+	d
β	+	d
γ	+	d
σ	+	d
ε	+	d
Ω	+	d

VI.5 Curva de calibración

Una curva de calibración para absorbancia con el número de células de un cultivo líquido de *Methylocystis* sp. ATCC 49242 es descrito en la Figura 16.

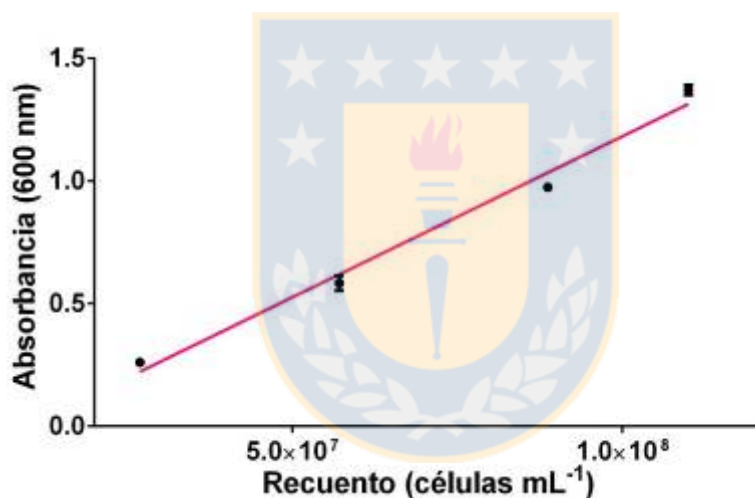


Figura 16. Curva de calibración de absorbancia a 600 nm versus el conteo celular en células mL⁻¹. La ecuación de la recta es $A = 1,312 \cdot 10^{-8} \cdot N - 0,1307$, donde A es absorbancia y N es recuento. $R^2 = 0,9847$ (Fuente: elaboración propia).

VI.5.1. Curva de crecimiento

Los recuentos bacterianos de los aislados y las cepas control fueron graficados contra el tiempo en días, lo que se muestra en la Figura 17.

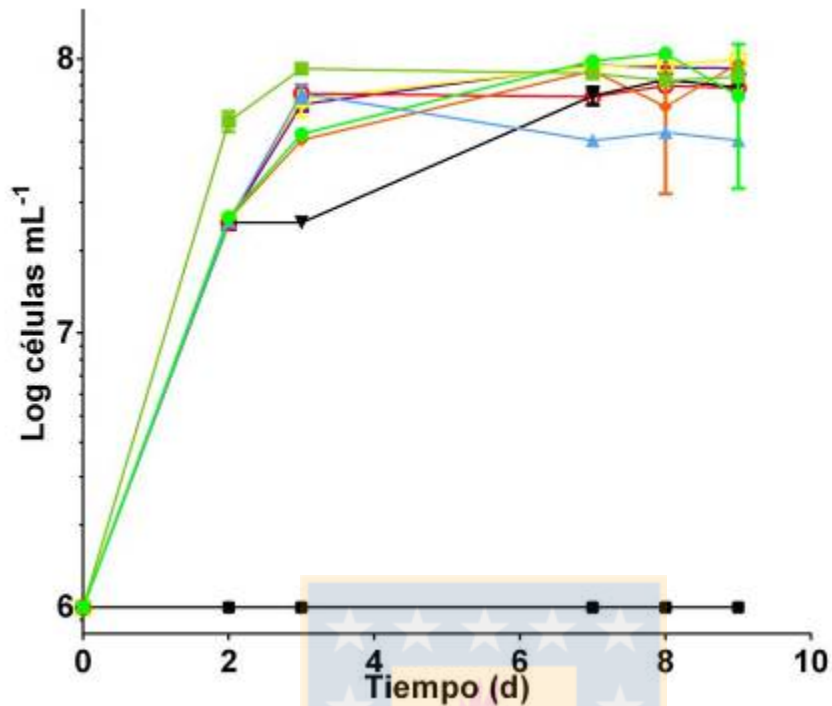


Figura 17. Curva de crecimiento en fase planctónica para las cepas aisladas en este estudio y controles, cultivados con CH₄ (●) Cepa γ , (■) cepa σ , (▲) cepa α , (▼) cepa Ω , (◆) cepa β , (○) cepa ϵ , (□) cepa *Methylocystis* sp. ATCC 49242, (Δ) cepa *Methylomicrobium álbum* ATCC 33003. El resto corresponde a controles negativos y a las cepas cultivadas bajo aire (sin CH₄), que no crecieron (Fuente: elaboración propia).

VI.5.2. Velocidad específica de crecimiento

A partir de los datos obtenidos en la grafica de la Figura 4, se calculó la velocidad específica de crecimiento que se muestra en el gráfico de la Figura 18.

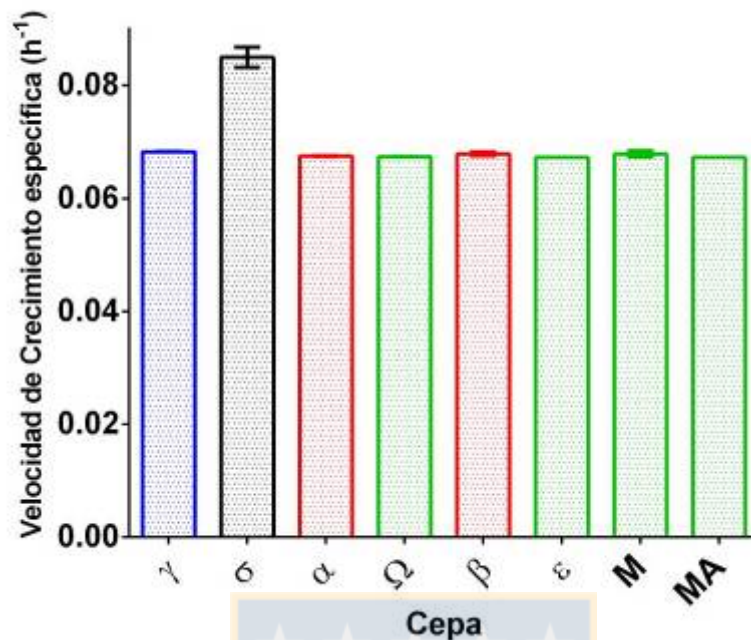


Figura 18. Velocidades de crecimiento específicas (μ) en fase planctónica, para las cepas en estudio (γ , σ , α , Ω , β , ε) y las cepas metanotróficas control *Methylocystis* sp. ATCC 49242 (M) y *Methylomicrobium álbum* ATCC 33003 (MA) (Fuente: elaboración propia).

VI.5.3. Prueba estadística

Un resumen de los valores de P para los tests estadísticos en cuanto a su velocidad específica de crecimiento, es mostrado en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores de P de test ANOVA de una vía y t student para distintas combinaciones de agrupación entre velocidades de crecimiento específico de los aislados obtenidos y las cepas *Methylocystis* sp. ATCC 49242 (M) y *Methylomicrobium album* ATCC 33003 (MA) (Fuente: elaboración propia).

Aislados comparados	P ANOVA	P t student
α, β	---	0,1302
$\Omega, \varepsilon, M, MA$	0,0671	---
$\gamma, \sigma, \alpha, \Omega, \beta, \varepsilon, M, MA$	0,0305	---
γ, M	---	0,2955
γ, β	---	0,1617

VI.6. Cepario

Se depositó un total de 6 cepas de MOBs diferentes: $\alpha, \beta, \gamma, \sigma, \varepsilon$ y Ω (3 copias de cada una) y 3 copias de cada una de las cepas control *Methylomicrobium album* (ATCC 33003) y *Methylocystis* sp (ATCC 49242). Los aislados de este estudio de más fácil mantención en cultivos en biopelículas y recuperación de cepas almacenadas en cepario, fueron β en el caso de aislados de bosque y ε en el caso de aislado de laguna. Dado esto, se eligieron estos dos aislados para continuar con el estudio de las biopelículas.

VI.7. Desarrollo de biopelículas de MOBs

El recuento de células adheridas, de cada cepa, por mm^2 de polietileno, vidrio o cerámica versus el tiempo, se muestra en la Figura 19. Dicha observación se realizó mediante tinción de bacterias vivas y muertas Baclight (Invitrogen, USA) y utilizando

un aumento de 100X en microscopio óptico. Imágenes de MEB de las biopelículas en los diferentes soportes son mostradas en la Figura 20 y 21. A partir de los datos del gráfico de la Figura 19 y la ecuación 2 descrita en el punto V.5.3, se obtuvo la velocidad específica de crecimiento que se muestra en el gráfico de la Figura 22.

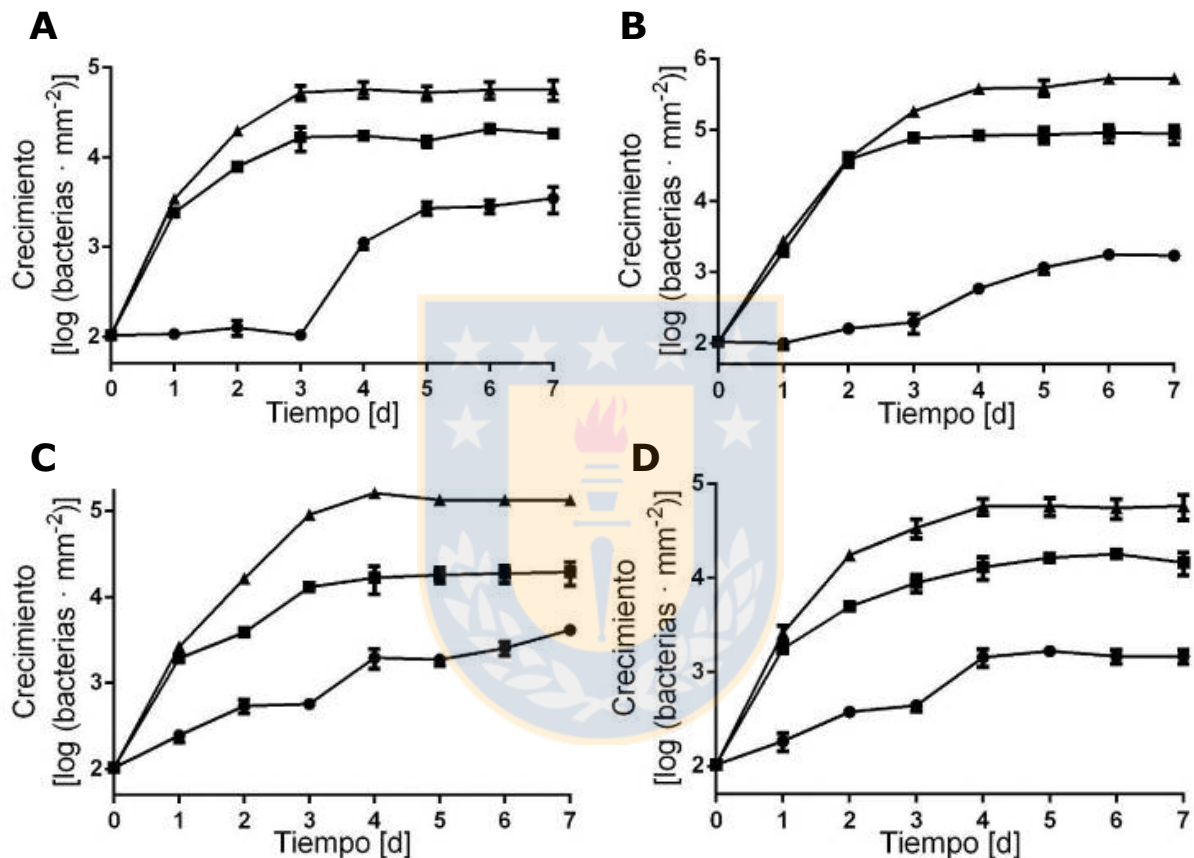
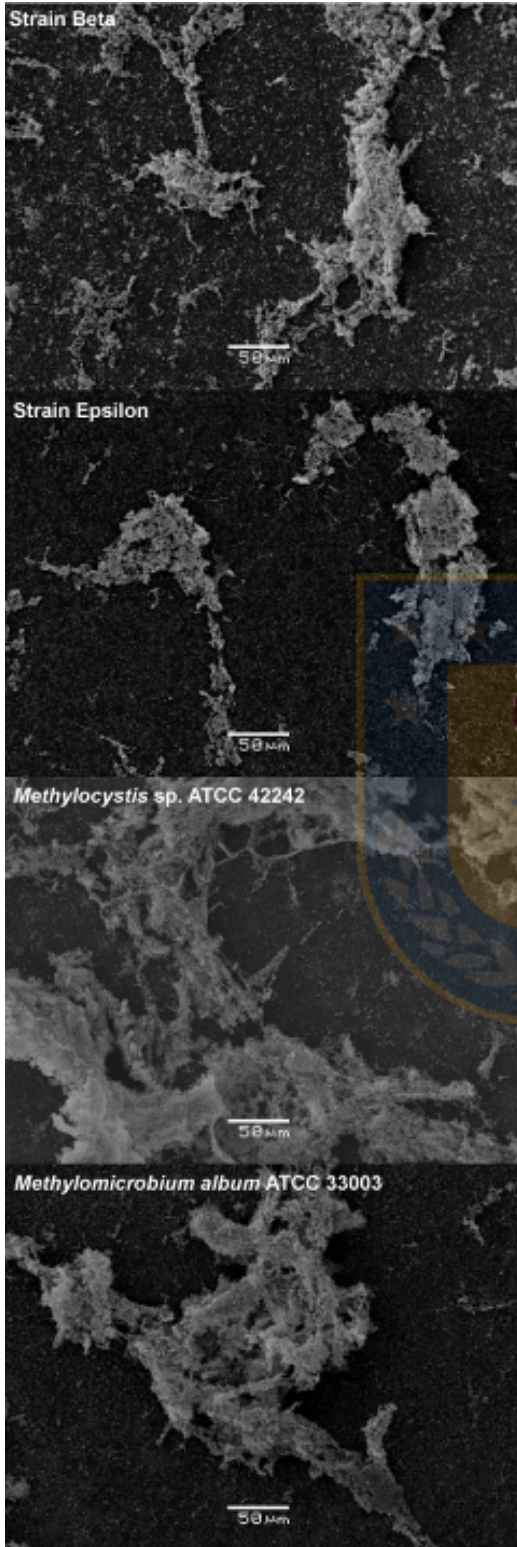
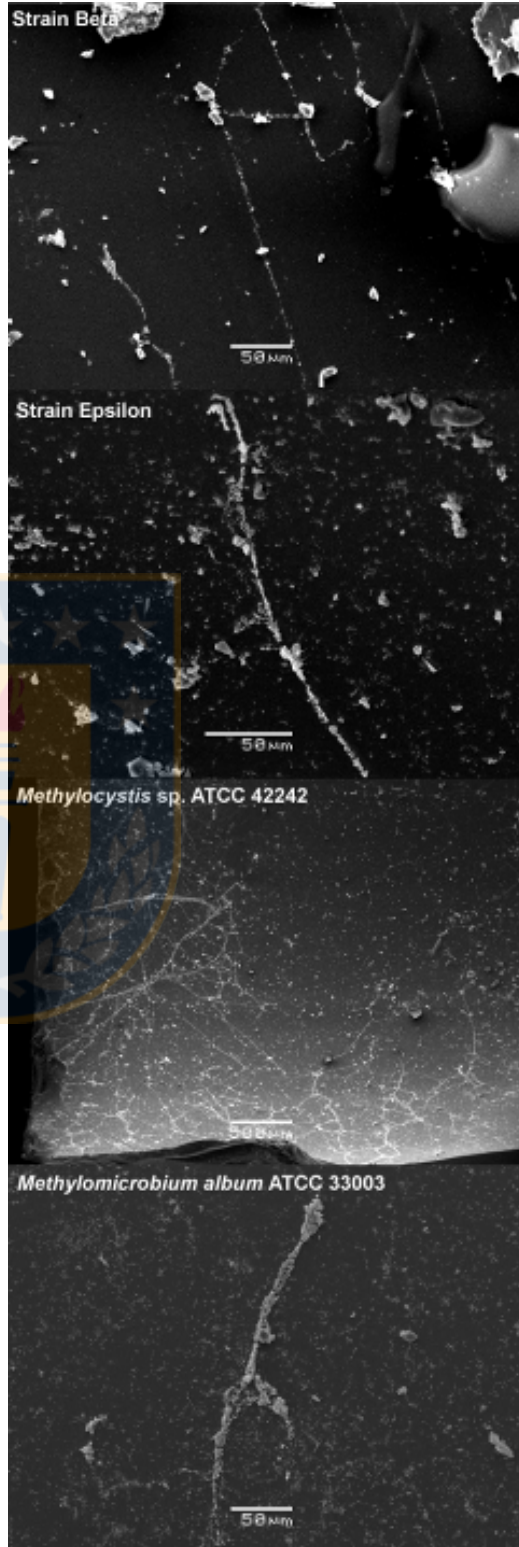


Figura 19. Curva de crecimiento en biopelículas para distintos materiales de soporte obtenida por microscopía de epifluorescencia con tinción Baclight (vivas y muertas). Se expresó los valores como logaritmo del recuento por mm^2 de soporte para A) aislado β , B) aislado ϵ , C) *Methylocystis* sp. ATCC 49242, D) *Methylobacterium album* ATCC 33003, en (\blacktriangle) polietileno, (\blacksquare) vidrio y (\bullet) cerámica. Medio: NMS. ($n=3$). Se utilizó escala logarítmica (Fuente: elaboración propia).

A



B



C

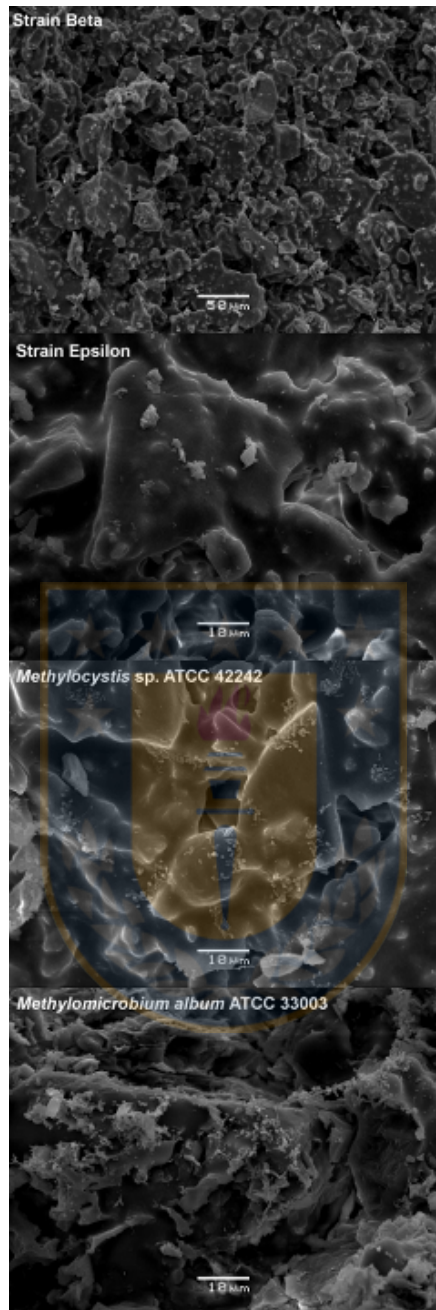


Figura 20. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de biopelículas de los cultivos en estudio sobre los materiales de soporte A) polietileno, B) vidrio y C) cerámica. La regla de tamaño relativo es mostrada en cada imagen. Las micrografías muestran biopelículas de 30 d de incubación (Fuente: elaboración propia).

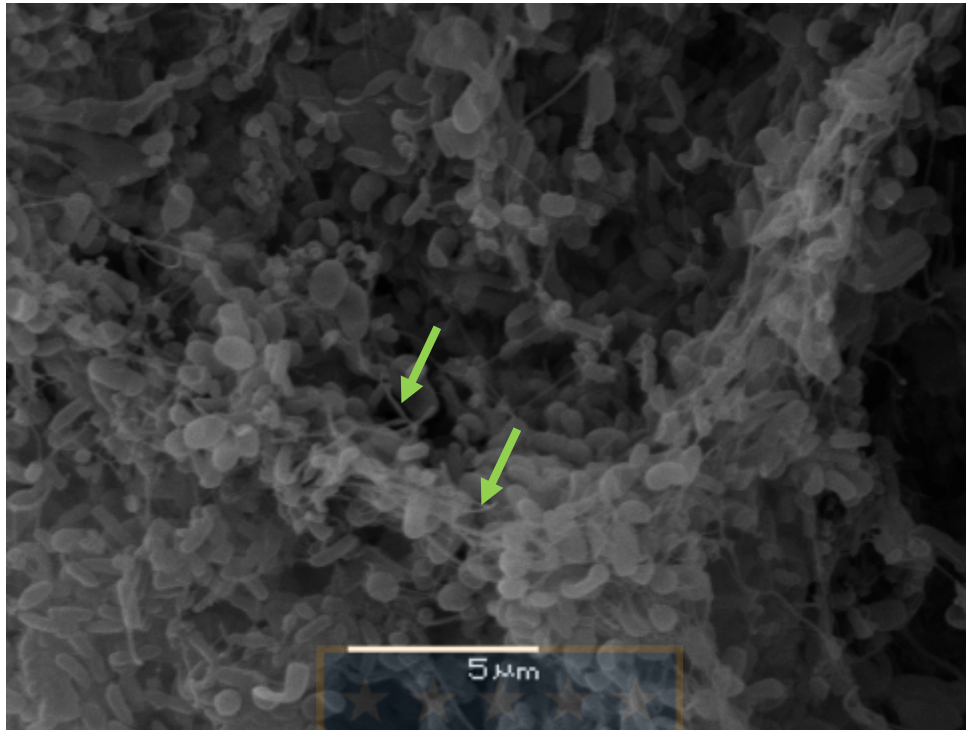


Figura 21. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de una biopelícula de la cepa *Methylocystis* sp. ATCC 49242 como ejemplo (todos los cultivos en estudio se observaron de manera similar). Las flechas verdes indican los filamentos de exopolisacáridos típicos en las MEB de biopelículas bacterianas. La micrografía muestra una biopelícula de 30 d de incubación (Fuente: elaboración propia).

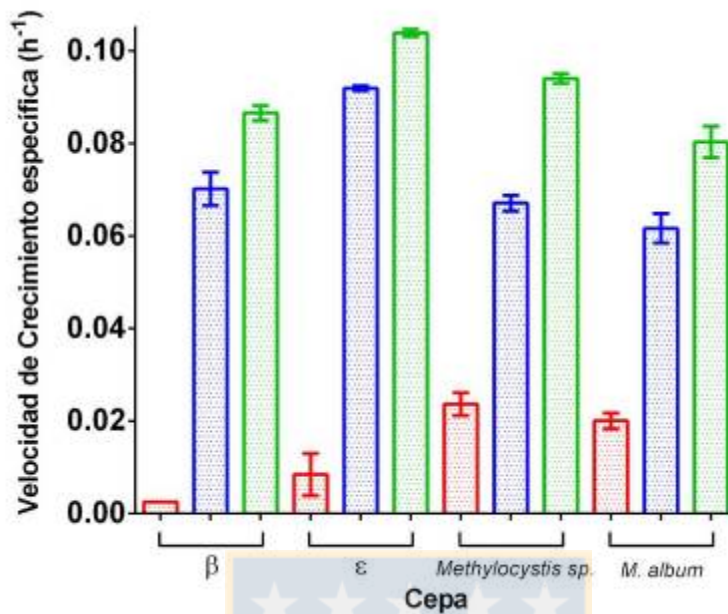


Figura 22. Velocidades de crecimiento específicas (μt) en biopelículas para diferentes materiales de soporte, desde la inoculación hasta las 72 h de incubación a 30 °C en los materiales de soporte polietileno (verde), vidrio (azul) y cerámica (rojo). $n=3$ (Fuente: elaboración propia).

Puesto que el polietileno fue el material en el que se obtuvo mayor adherencia, se seleccionó las biopelículas formadas en dicho material para continuar con los estudios restantes, se obtuvo la CSLM de las biopelículas formadas al cabo de 50 d de incubación, cuyas imágenes se encuentran en la Figura 23. También se obtuvo micrografías por TEM, para observar morfología celular y disposición de las ICMs, lo que se muestra en la Figura 24.

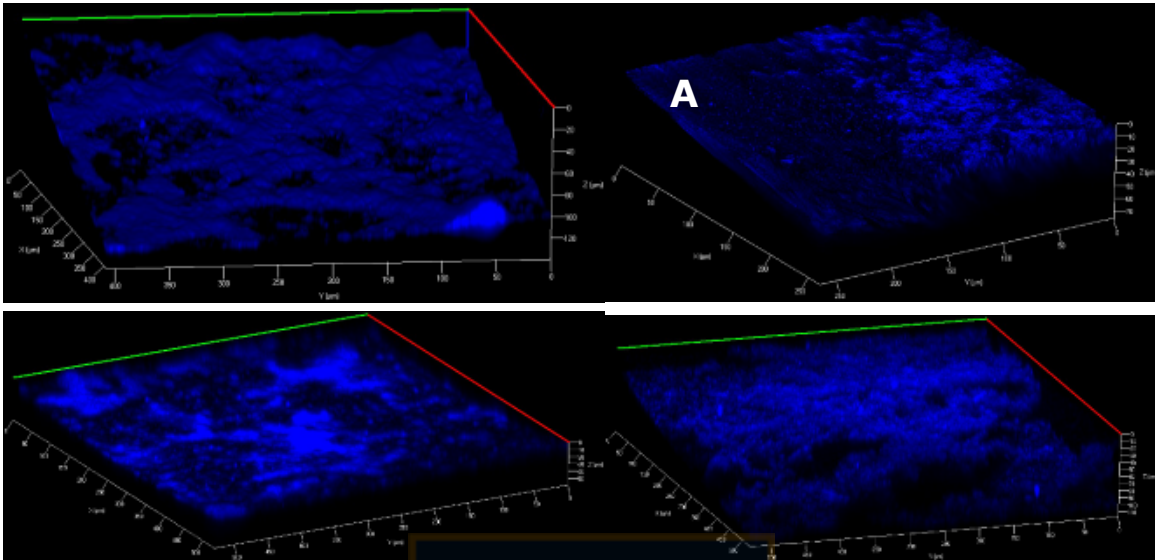


Figura 23. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser (CSLM) que muestra las biopelículas del A) aislado β , B) aislado ϵ , C) *Methylocystis* sp. ATCC 49242, D) *Methylomicrobium álbum* ATCC 33003, todas en polietileno. Aumento de 25X. Tinción: DAPI (Fuente: elaboración propia).

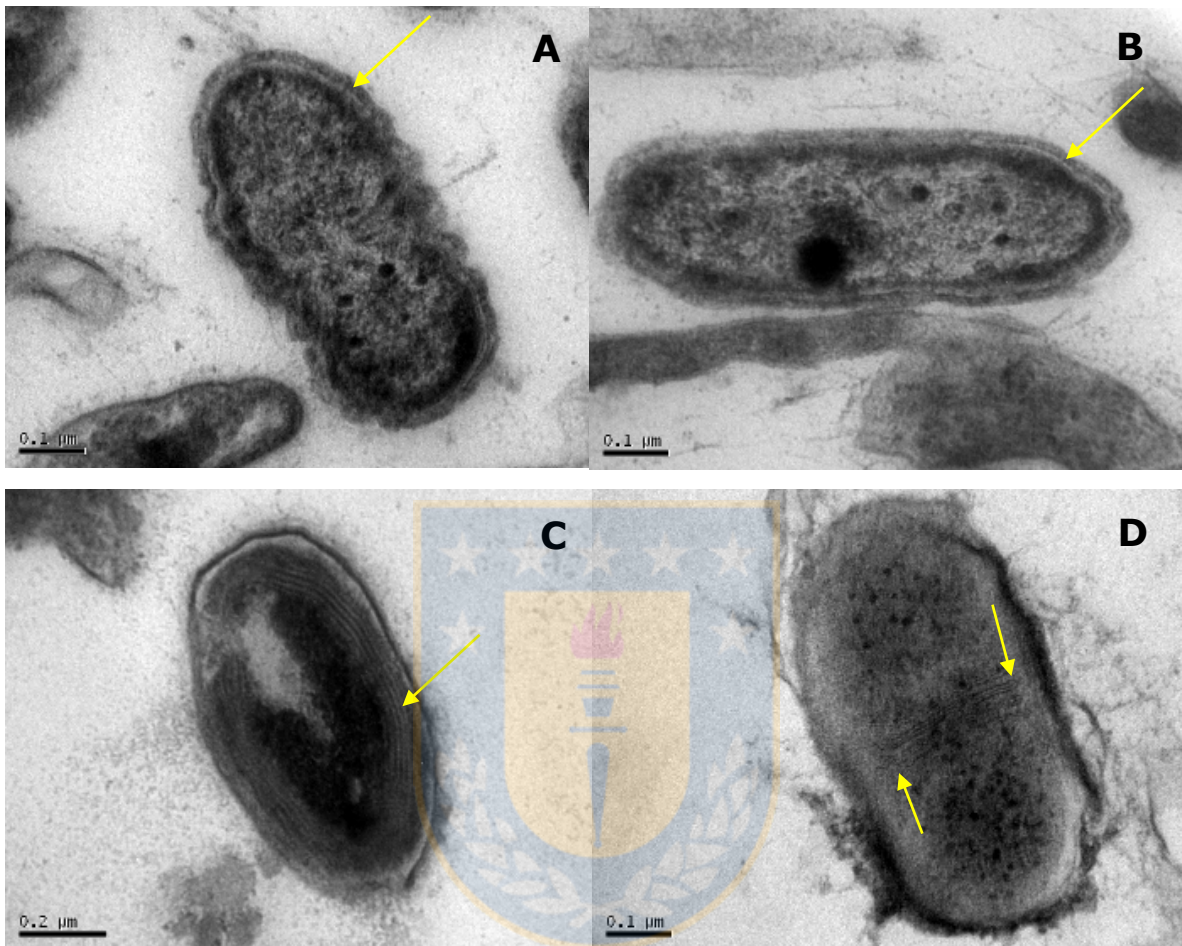


Figura 24. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) que muestra células representativas de los cultivos de este estudio sobre los materiales de soporte A) aislado β , B) aislado ϵ , C) *Methylocystis* sp. ATCC 49242, D) *Methylomicrobium album* ATCC 33003, todas en polietileno. La regla de tamaño relativo se muestra en cada imagen. Las micrografías muestran células de 14 d de incubación. Flechas amarillas indican parte de las ICMs paralelas a la membrana celular (MOBs tipo II) y en medio del citoplasma (MOB tipo I) (Fuente: elaboración propia).

VI.7.1. Curva de calibración para cromatografía de gas

La curva de calibración para obtener la concentración de metano en una muestra (en porcentaje), muestra en la Figura 25.

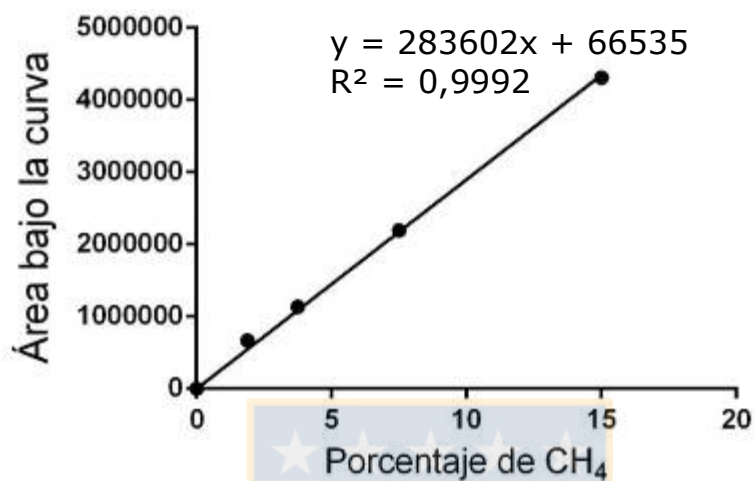


Figura 25. Curva de calibración de cromatografía de gas para CH₄ en la que se muestra la regresión lineal del gráfico de área bajo la curva del cromatograma versus porcentaje de CH₄ ($n=3$) (Fuente: elaboración propia).

VI.7.2. Determinación de metano en cabeza de aire

A partir de la determinación de la concentración de metano en la cabeza de aire de los cultivos bacterianos en biopelículas sobre soporte de polietileno y el recuento total de bacterias adheridas en el soporte (30 d de incubación), se obtuvo un gráfico de eficiencia versus el aislado o cepa control, el que se muestra en la figura 26.

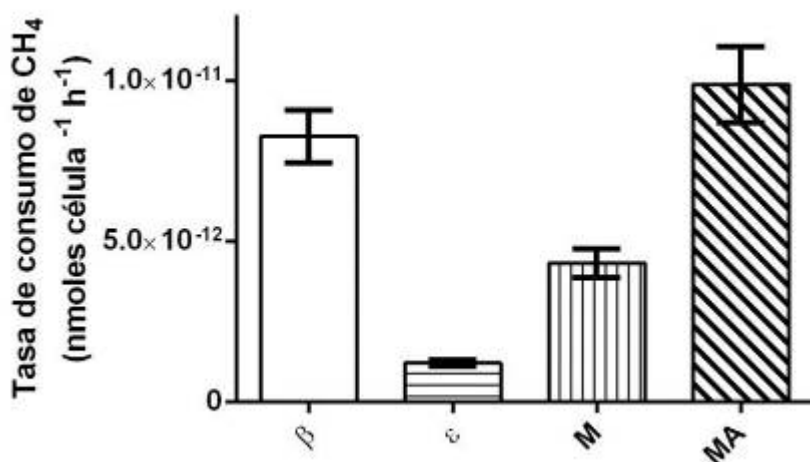


Figura 26. Eficiencia de consumo de metano ($\text{nmol} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) para biopelículas en polietileno, de las cepas de este estudio. MA: *Methylobacterium album* ATCC 33003 y M: *Methylocystis* sp. ATCC 49242. ($n=3$) (Fuente: elaboración propia).

VI.7.3 Inhibición de la metanotrofia con H₂S y NH₃

Un gráfico de concentración de CH₄ versus el tiempo fue obtenido para cada cepa y para cada tratamiento (H₂S, H₂S más NH₃, y NH₃), los que se muestran en la figura 27. Por otro lado, las eficiencias de oxidación de metano en nmol por célula y por día fueron calculadas y graficadas contra el correspondiente cultivo, lo que se muestra en la Figura 28.

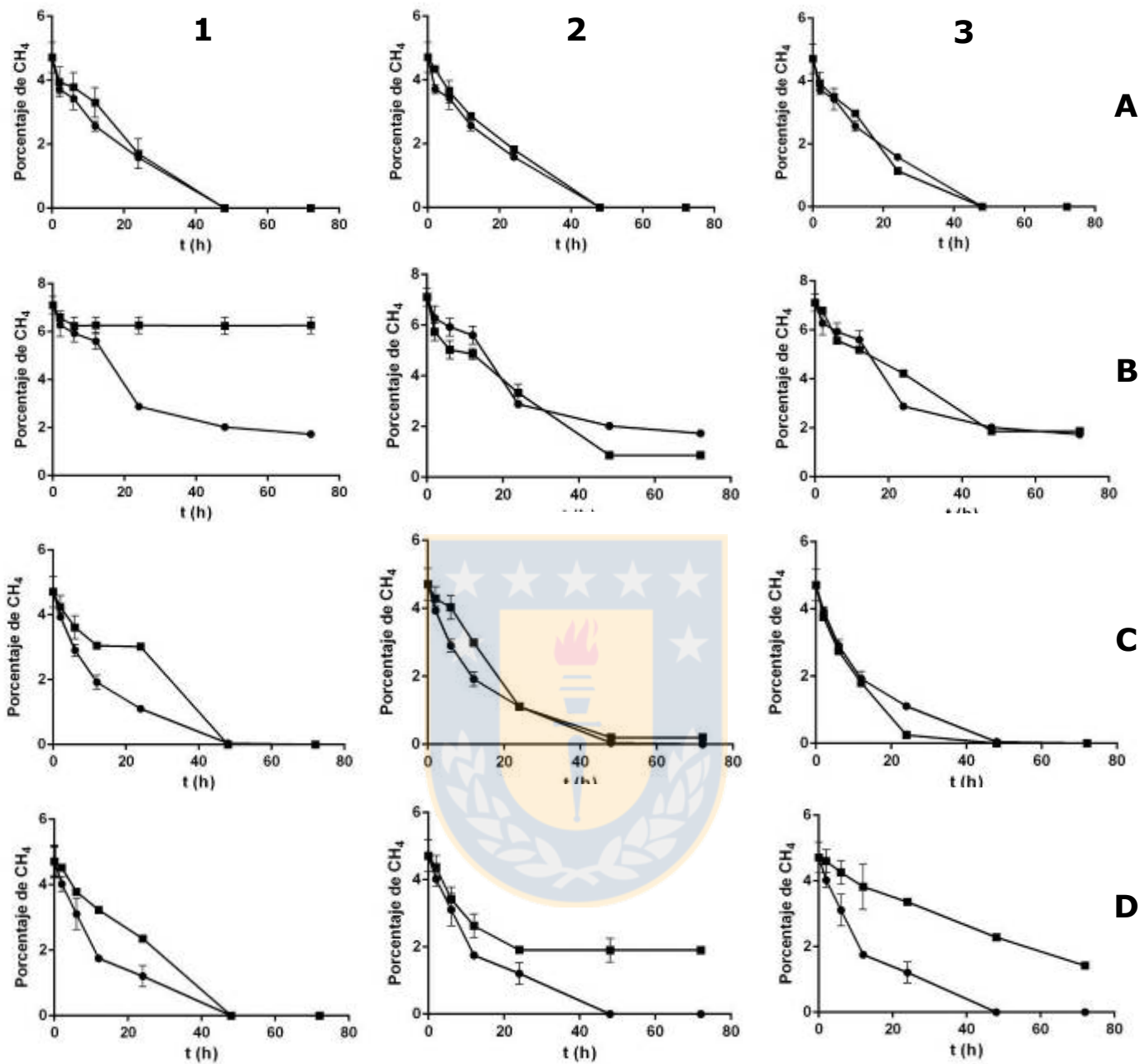


Figura 27. Cinética de consumo de metano para biopelículas de aislado β (fila A), aislado ϵ (fila B), *Methylocystis* sp. ATCC 49242 (fila C) y *Methyломicrobium album* ATCC 33003 (fila D), en polietileno y tratadas con H₂S (columna 1), H₂S más NH₃ (columna 2), y NH₃ (columna 3). CH₄: ●, sin tratamiento: ■. n=3 (Fuente: elaboración propia).

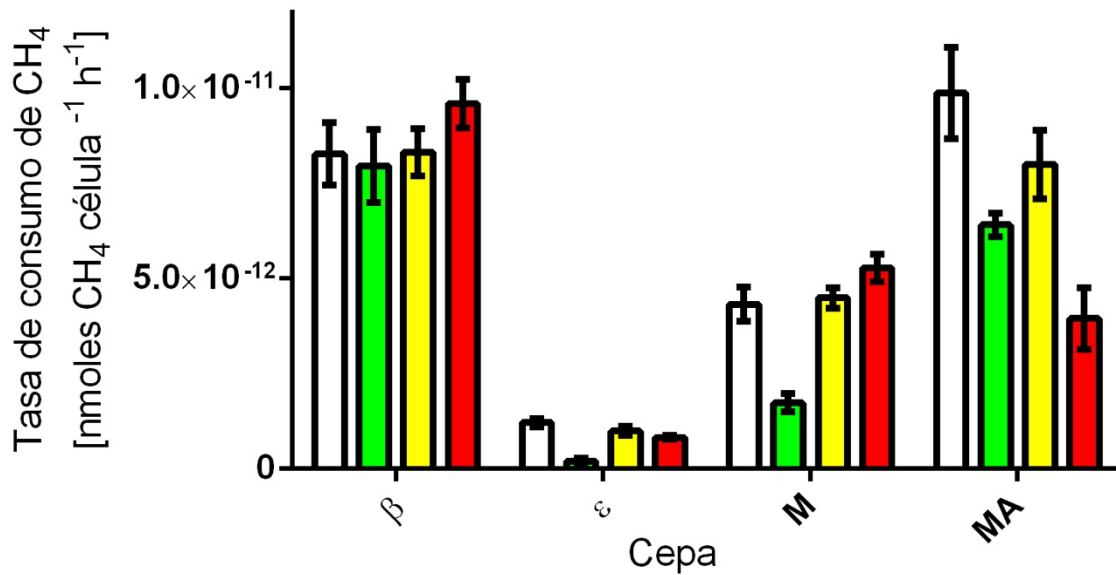


Figura 28. Efecto del tratamiento con H₂S y NH₃ en la tasa en el consumo de CH₄ (nmol célula⁻¹ h⁻¹) para biopelículas de las cepas de este estudio, formadas en polietileno. MA: *Methylobacterium album* ATCC 33003 y M: *Methylocystis* sp. ATCC 49242. Blanco: CH₄, verde: CH₄+H₂S, amarillo: CH₄+H₂S+NH₃, rojo: Azul: CH₄+NH₃. n=3 (Fuente: elaboración propia).

VI.8. Inhibición de la metanotrofia y síntesis del ARNm de los genes *pmoA1* y *pmoA2*

Los gráficos de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) versus el tratamiento por cada cultivo se muestra para biopelículas en la Figura 29 y 30, y para cultivos en suspensión en la Figura 31 y 32. Los controles negativo sin templado (NTC) y un control negativo con ARN de *Methylobacterium album*, pero sin mix de RT (NRT) no mostraron amplificación.

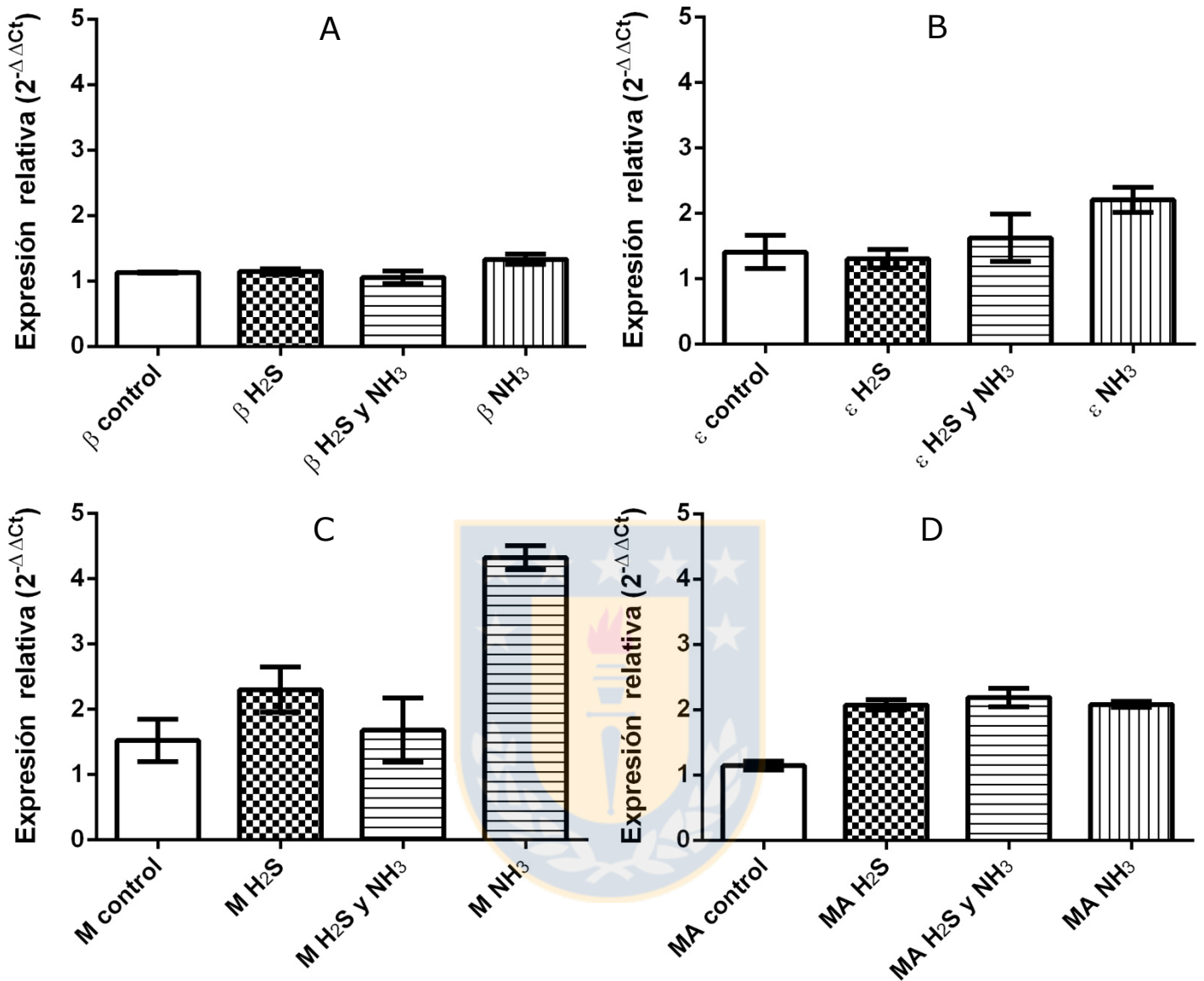


Figura 29. Efecto del tratamiento (CH₄+H₂S, CH₄+H₂S+NH₃ o CH₄+NH₃) en la expresión relativa del gen *pmoA1* para biopelículas en polietileno (parámetro 2^{-ΔΔCt} usando el gen de ARNr 16 como referencia). MA: *Methylomicrobium album* ATCC 33003 y M: *Methylocystis* sp. ATCC 49242. n=3. Control: CH₄ (Fuente: elaboración propia).

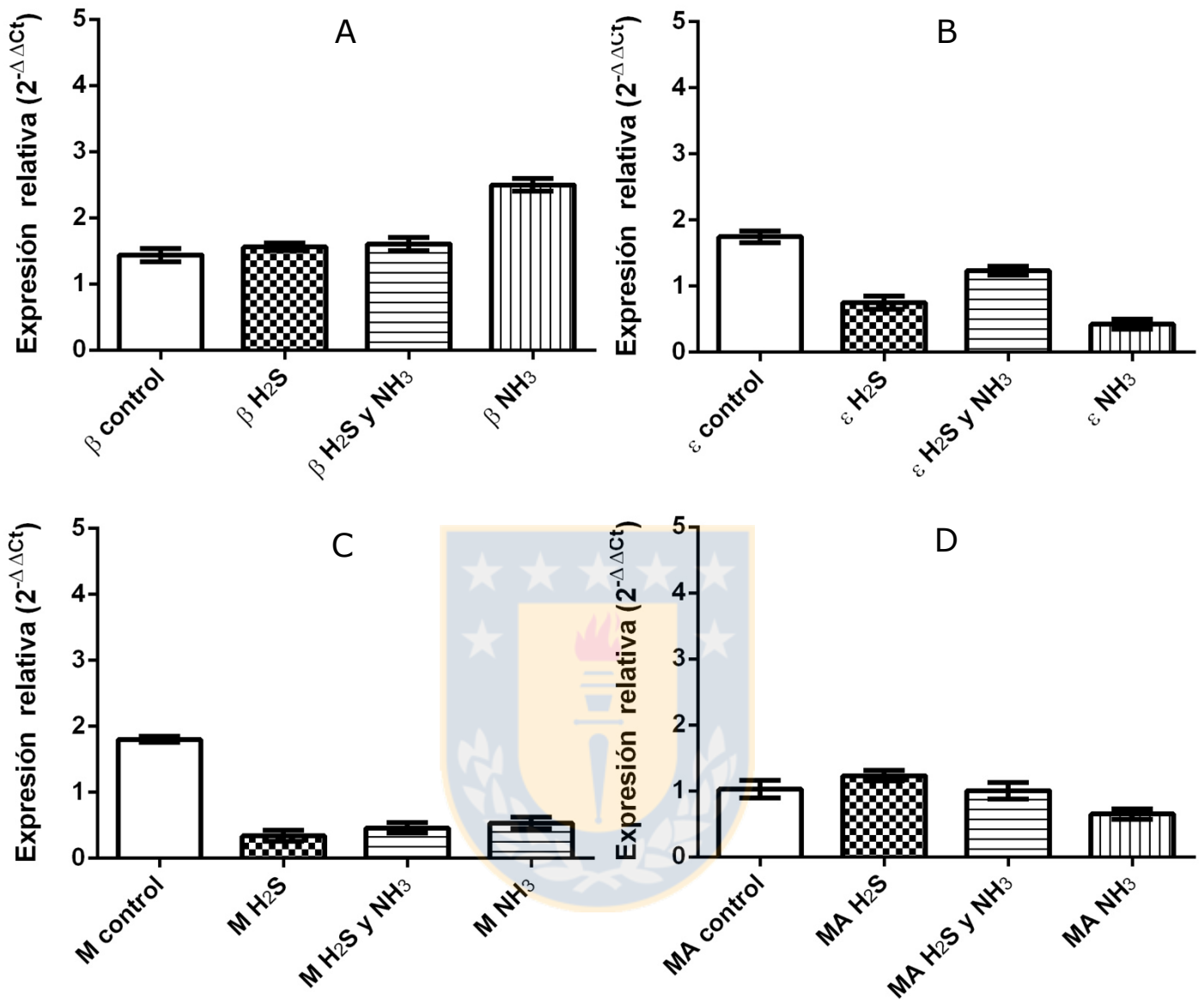


Figura 30. Efecto del tratamiento ($\text{CH}_4+\text{H}_2\text{S}$, $\text{CH}_4+\text{H}_2\text{S}+\text{NH}_3$ o CH_4+NH_3) en la expresión relativa del gen *pmoA2* para biopelículas en polietileno (parámetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando el gen de ARNr 16 como referencia). MA: *Methylomicrobium album* ATCC 33003 y M: *Methylocystis* sp. ATCC 49242. $n=3$. Control: CH_4 (Fuente: elaboración propia).

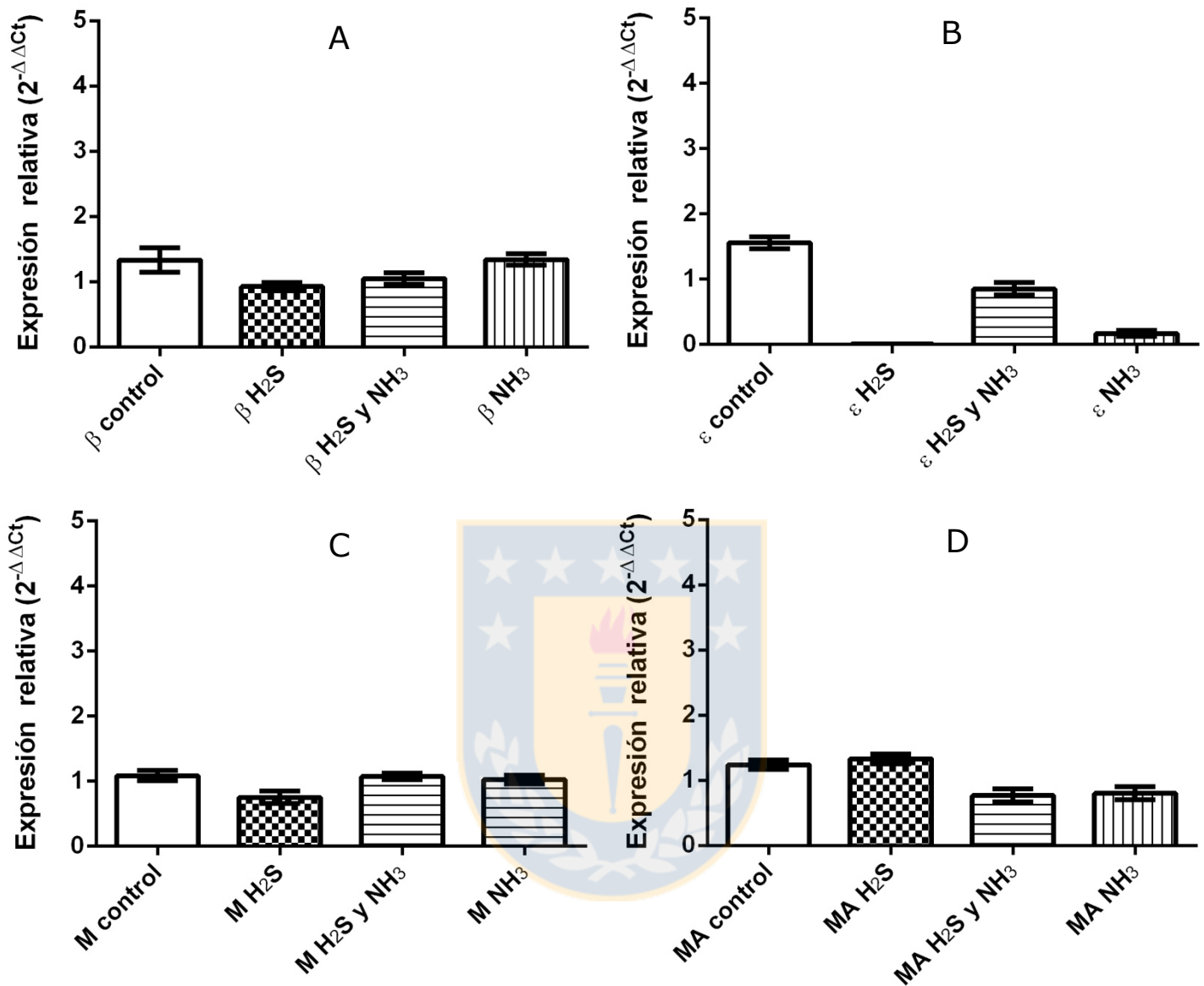


Figura 31. Efecto del tratamiento ($\text{CH}_4+\text{H}_2\text{S}$, $\text{CH}_4+\text{H}_2\text{S}+\text{NH}_3$ o CH_4+NH_3) en la expresión relativa del gen *pmoA1* en cultivos planctónicos (parámetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando el gen de ARNr 16 como referencia). MA: *Methylomicrobium album* ATCC 33003 y M: *Methylocystis* sp. ATCC 49242. $n=3$. Control: CH_4 (Fuente: elaboración propia).

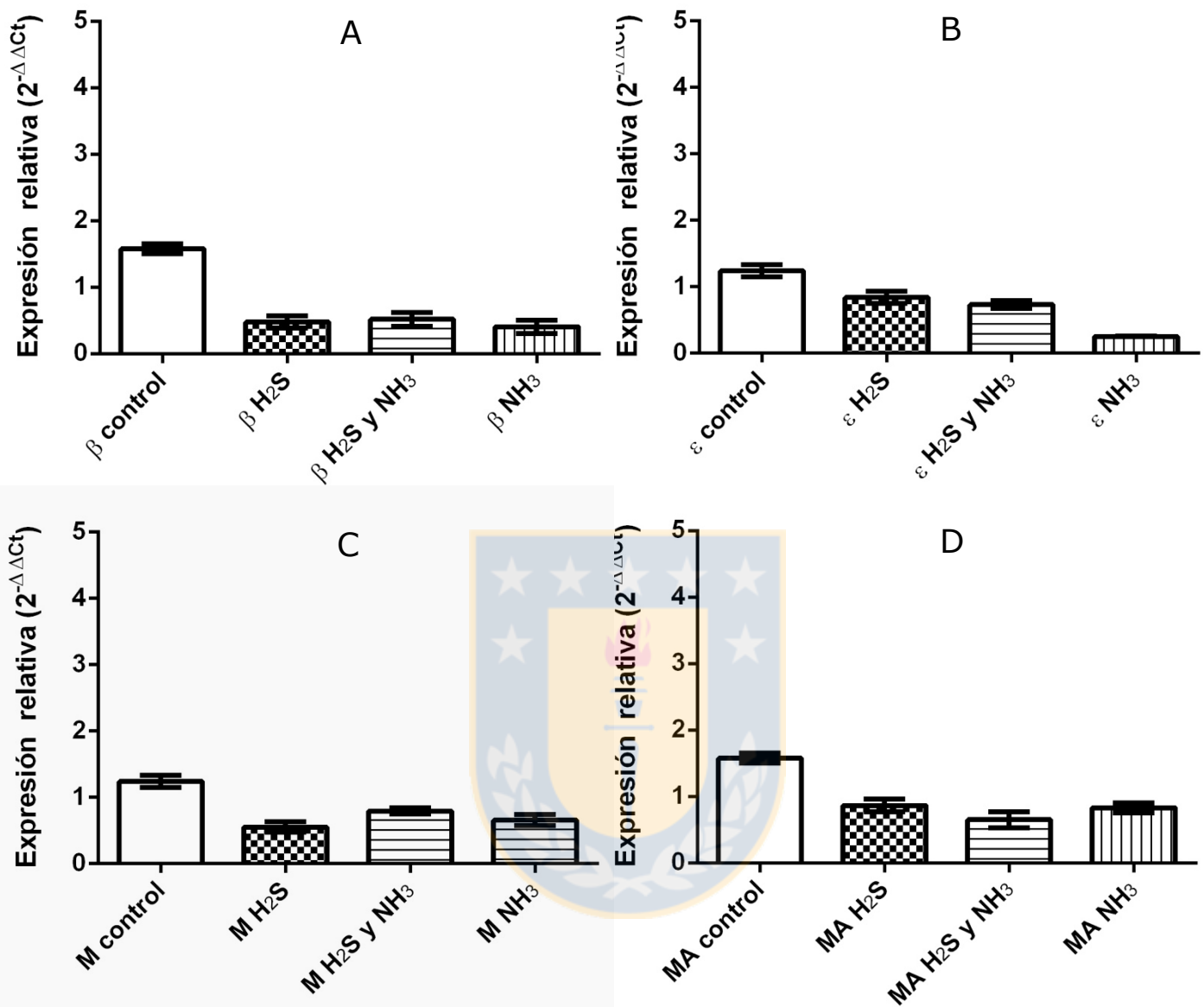


Figura 32. Efecto del tratamiento ($\text{CH}_4+\text{H}_2\text{S}$, $\text{CH}_4+\text{H}_2\text{S}+\text{NH}_3$ o CH_4+NH_3) en la expresión relativa del gen *pmoA2* en cultivos planctónicos (parámetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando el gen de ARNr 16 como referencia). MA: *Methylomicrobium album* ATCC 33003 y M: *Methylocystis* sp. ATCC 49242. $n=3$. Control: CH_4 (Fuente: elaboración propia).

VI.9. Correlación entre síntesis de ARNm del gen *pmoA1*, *pmoA2* y tasa de consumo de CH₄

Los coeficientes de Pearson (*r*) y los valores de *P* para el mismo fueron calculados según lo detallado en el punto V.9.4 y se muestran en la tabla 14 y 15, para los genes *pmoA1* y *pmoA2*.

Tabla 14. Correlación entre expresión relativa del ARNm de *pmoA1* y la tasa de consumo de CH₄ en biopelículas (Fuente: elaboración propia).

Aislado/Cepa	Tratamiento	r	P
β	CH ₄ +H ₂ S	0,4647	0,3531
	CH ₄ +H ₂ S+NH ₃	-0,0370	0,9444
	CH ₄ + NH ₃	0,7447	0,0894
ε	CH ₄ +H ₂ S	0,2654	0,6113
	CH ₄ +H ₂ S+NH ₃	0,1638	0,6110
	CH ₄ + NH ₃	-0,8801*	0,0207
M	CH ₄ +H ₂ S	-0,9081*	0,0123
	CH ₄ +H ₂ S+NH ₃	0,3105	0,3259
	CH ₄ + NH ₃	0,7717	0,0723
MA	CH ₄ +H ₂ S	-0,9042*	0,0133
	CH ₄ +H ₂ S+NH ₃	-0,6519*	0,0216
	CH ₄ + NH ₃	-0,9431*	0,0048

Tabla 15. Correlación entre expresión relativa del ARNm de *pmoA2* y la tasa de consumo de CH₄ en biopelículas (Fuente: elaboración propia).

Aislado/Cepa	Tratamiento	r	P
β	CH ₄ +H ₂ S	-0,1895	0,7191
	CH ₄ +H ₂ S+NH ₃	0,08304	0,8757
	CH ₄ + NH ₃	0,6461*	0,0232
ε	CH ₄ +H ₂ S	0,9580*	0,0026
	CH ₄ +H ₂ S+NH ₃	0,7261	0,1023
	CH ₄ + NH ₃	0,6216*	0,0310
M	CH ₄ +H ₂ S	0,9725*	0,0011
	CH ₄ +H ₂ S+NH ₃	-0,2647	0,6122
	CH ₄ + NH ₃	0,2586	0,4171
MA	CH ₄ +H ₂ S	-0,7705	0,0729
	CH ₄ +H ₂ S+NH ₃	-0,1372	0,7954
	CH ₄ + NH ₃	0,4655	0,1272

VI.10. Análisis de secuencias del gen de ARNr 16

La relación filogenética entre los fragmentos del gen de ARNr 16S de los aislados de MOB_s β y ε se muestra en el árbol filogenético de la Figura 33.

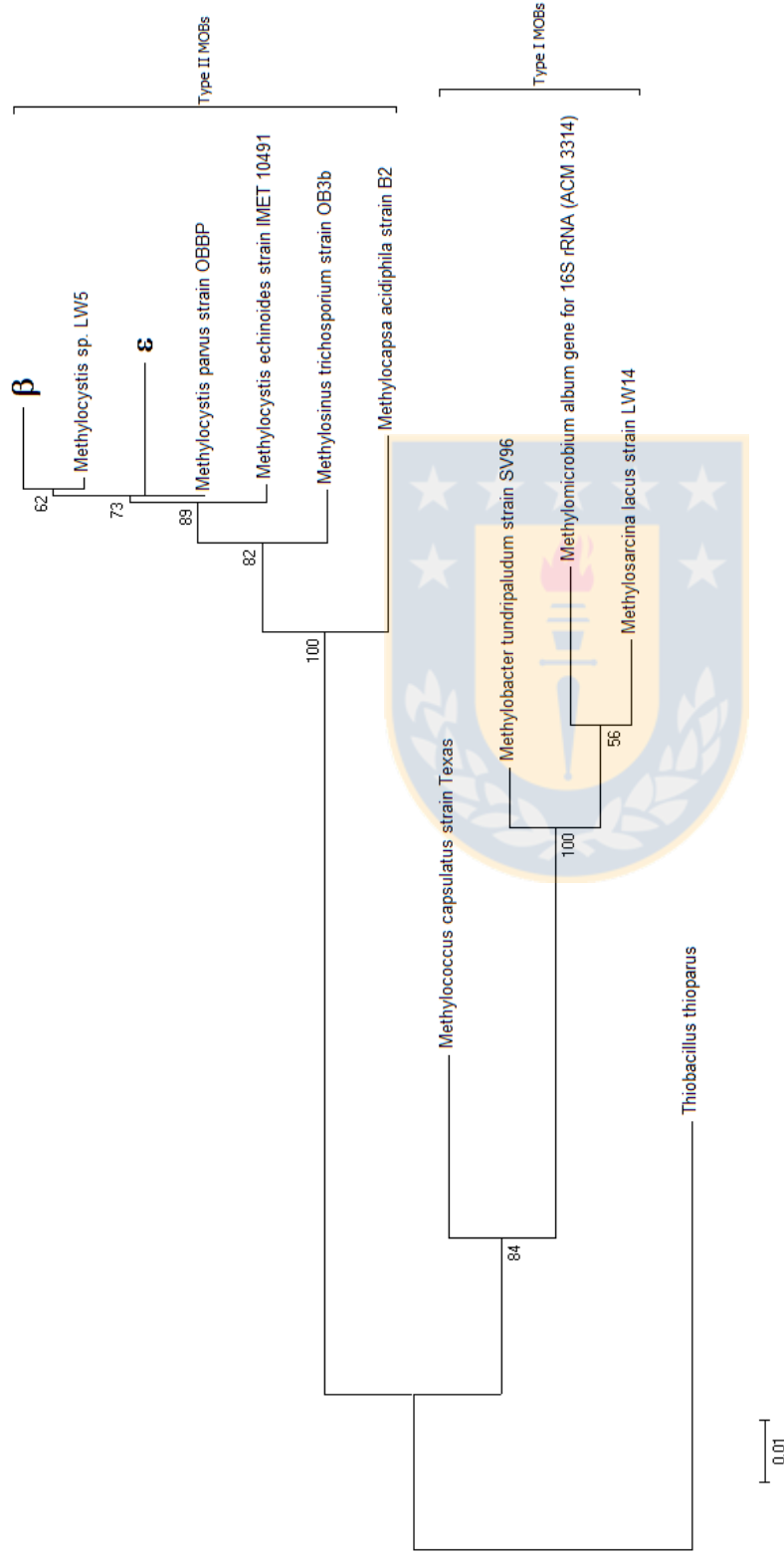


Figura 33. Árbol Filogenético para el gen de ARNr 16S de los aislados bacterianos β , ϵ y 9 especies de MOBs (4 tipo I y 5 tipo II), enraizado con la gamma proteobacteria *Thiobacillus thioparus* (fuera del grupo de las MOBs). La reconstrucción evolutiva de la figura es un árbol tipo Neighbour-Joining, resultado de análisis por método de Maximum Composite Likelihood (1000 Bootstraps). La escala de 0,01 sustituciones de nucleótido por sitio corresponde a un 1% de diferencia entre secuencias (Fuente: elaboración propia).

VII. DISCUSIÓN

VII.1. Se obtuvo 2 aislados bacterianos oxidadores de metano de fácil mantención, uno proveniente de bosque y otro proveniente de laguna.

Muestras de suelo de dos bosques de plantación y de sedimento de dos lagunas de la Octava región fueron utilizadas en este estudio para obtener 6 aislados de bacterianas metanotróficas, no quimiolitotróficas, dado que crecieron en atmósfera de metano, pero no de aire, lo que se observó en el gráfico de la Figura 17. Dichos aislados, tuvieron valores de velocidades específicas de crecimiento similares las cepas de *Methylobacterium album* y de *Methylocystis* sp. (Figura 18), lo que se sostiene en la comparación de valores de P para prueba estadísticas t student y ANOVA en todas las combinaciones de comparación (Tabla 13). Sin embargo, en el aislado σ se observó una velocidad de crecimiento en cultivo líquido significativamente mayor a los demás (Figura 18, $P > 0,05$). Las curvas de crecimiento obtenidas en este estudio (Figura 17) son similares a las encontradas en la literatura, alcanzando fase estacionaria en aproximadamente 2 d, pero obteniéndose crecimientos a tiempo final menores que los encontrados en bibliografía (Nyerges et al., 2010). Esto último se debe a que la concentración de CH_4 fue menor a la usada en el estudio antes citado (Benstead et al., 1998; Han et al., 1999; Nyerges et al., 2010) y a que las curvas de crecimiento en bacterias metanotróficas, dependen de la cepa o aislado en estudio (Iguchi et al., 2011; Hoefman et al., 2013).

Según las características macroscópicas de sus colonias aisladas (Tabla 10), características microscópicas (tinción de Gram, Tabla 10), prueba de oxidasa y catalasa (Tabla 12), perfil de crecimiento en medios especiales (cristal violeta, verde malaquita, SDS, NaN_3 y KCN, en Tabla 11), el aislado α y σ corresponden al género *Methylobacter*, cepa β , γ y ε , a *Methylocystis* y cepa Ω , a *Methylomicrobium* (Garrity et al., 2005 a y b; Dworkin et al., 2006). Aunque todas fueron capaces de desarrollarse en cultivos líquidos, β y ε fueron los aislados de más fácil recuperación desde cepario y mantención en biopelículas, por lo que se optó por seguir el estudio de las biopelículas con dichos cultivos, en comparación con las cepas control *Methylomicrobium album* ATCC 33003 y *Methylocystis* sp. ATCC 49242, a las que llamó MA y M respectivamente en la mayoría de los gráficos de este estudio.

En cuanto a la morfología y dimensiones celulares de los cultivos β y ε , la microscopía electrónica de transmisión (Figura 24 A y B) reveló que estos poseen una forma de bacilo corto, con las membranas intracelulares (ICMs) dispuestas de forma paralela a la pared bacteriana, asemejando a “capas de cebolla”, característica de las MOBs tipo II, con un tamaño promedio de 1,6 μm de largo por 0,4 μm de ancho, lo que coincide con lo observado en *Methylocystis* sp. ATCC 49242 (1,6 μm de largo por 0,4 μm de ancho, Figura 24 C) y lo expuesto en literatura, que va desde 0,8 μm a 2,5 μm de largo y de 0,4 a 1,1 μm de ancho (Wartiainen et al., 2006; Dworkin et al., 2006), lo que sugirió que las células de los aislados de este estudio pertenecen al género *Methylocystis*. La comparación de las características de tamaño y morfología de β y ε con la literatura, sugirió que en estos cultivos

predominan las MOBs del género *Methylocystis*. Esto último fue demostrado mediante la secuenciación y caracterización del gen de ARNr 16S de β y ϵ , Ambas mostraron un 99% y 98% de homología con *Methylocystis* sp. LW5 y a ϵ , con la especie *Methylocystis parvus* respectivamente, en la búsqueda de las secuencias en bases de datos de ADN mediante BLAST, con un valor de expectación (E value) muy inferior igual a cero (un porcentaje de homología en BLAST tiene más significado biológico, en medida que el E value tenga un valor igual a 0 ó menor que 10^{-4}). Este hallazgo es reafirmado con la reconstrucción de la filogenia de β y ϵ , mediante árbol filogenético tipo Neighbour-Joining (Figura 33), el que demostró que los dos fragmentos de ADNr 16S obtenidos de los aislados mencionados, están efectivamente asociados estrechamente a las especies *Methylocystis* sp. y *Methylocystis parvus*, respectivamente. Dichas secuencias mostraron una distancia de un 1% y 2% aproximadamente, respecto a las especies mencionadas, respectivamente. Aunque tanto los resultados de árbol filogenético y BLAST son válidos y similares es aceptado como más confiable el resultado aportado por el árbol filogenético y el alineamiento de secuencias que le dio origen (Claverie y Notredame, 2007). Dado esto, sólo se clasificó a β como *Methylocystis* sp. y a ϵ como *Methylocystis parvus*.

VII.2. Los aislados y cepas control crecieron de manera similar en CH₄. Todos los cultivos obtenidos crecieron a 30 °C, por lo que fueron considerados como mesófilos. Por otro lado, dichos cultivos, tanto los aislados en este estudio como las cepas control, crecieron en CH₄, el que disminuyó a través del tiempo

significativamente en 2 d, por lo que fueron considerados como microorganismos procariontes oxidadores de metano (MOBs) (Figuras 27 y 28). Como fuente de carbono y energía sólo se utilizó CH₄. La velocidad de crecimiento específica fue similar en todos los cultivos líquidos, excepto por el cultivo σ , que mostró una velocidad significativamente mayor (Figura 18, $P < 0,05$).

VII.3. El material de soporte más apropiado para la formación de biopelículas

de MOBs fue el polietileno. Los cultivos β , ϵ , *Methylomicrobium album* ATCC

33003 y *Methylocystis* sp. ATCC 49242 formaron biopelículas en cerámica vidrio y

polietileno. Sin embargo, fue el último mencionado el material de soporte al que las

bacterias se adhirieron más, observación hecha a partir del conteo celular por mm²

de soporte, mediante microscopía óptica con tinción de células vivas y muertas

Baclight (Figura 19), en las que además, el 99% de las bacterias resultaron tener su

pared celular íntegra (criterio para considerarlas vivas). La velocidad de crecimiento

específica fue significativamente mayor en polietileno, para todos los cultivos en la

fase exponencial de crecimiento (hasta las 72 h de incubación), lo que se refleja en

el gráfico de velocidad específica versus material de soporte para cada cultivo en la

figura 22. Esto es sostenido aún más por la observación de las bacterias adheridas

en cada tipo de material, a través de microscopía electrónica de barrido (MEB), en

la que se halló una distribución más uniforme en polietileno (Figura 20 A), mientras

que en el vidrio se encontró que las células se distribuyen a la forma de filamentos

(Figura 20 B) y en cerámica se distribuyen a la forma de parches (Figura 20 C). Así

la cantidad de bacterias por unidad de área de soporte resulta mayor en polietileno.

Tanto la morfología, tamaño y filamentos de EPS observada en la micrografía ejemplo para una biopelícula de *Methylocystis* sp. ATCC 49242 (Figura 21) que es similar a lo informado para *Methylomonas methanica* (Kunkel 2007), otra MOB. La distribución uniforme de las biopelículas en polietileno fue corroborada por CLSM con tinción DAPI, en la que se observó una total cobertura del material por parte de las bacterias, lo que se muestra en la Figura 23. Estas observaciones son las primeras en su clase informadas hasta el momento.

Funcionalmente, los cultivos en estudio tuvieron comportamientos diversos en la oxidación de CH_4 ante el tratamiento con H_2S , NH_3 o ambos en biopelículas formadas sobre polietileno, lo que coincide con datos ya informados con anterioridad (Nyerges y Stein, 2009). El aislado β , demostró no ser afectado de manera significativa por el tratamiento con los gases mencionados (Figura 27 A, 1, 2 y 3). Esto se sostiene además por el hecho de que la tasa de consumo de CH_4 es similar tanto al aplicar metano con o sin tratamiento (Figura 28, $P > 0,05$ en todas las comparaciones). El aislado ε , por su parte, sólo mostró una leve disminución de la metanotrofia al ser tratado con H_2S (Figura 27 B 1), mientras que la combinación de H_2S y de NH_3 , o sólo este último, no afectaron significativamente la oxidación de CH_4 por parte de este aislado (Figura 27 B, 2 y 3). Así mismo, la tasa en el consumo de CH_4 sólo se ve afectada por H_2S en el aislado mencionado y a su vez, resultó ser la menor tasa de los cuatro cultivos probados, bajo todos los tratamientos (Figura 28, $P < 0,05$ sólo en caso de H_2S). El mismo comportamiento de ε se observó en la cepa *Methylocystis* sp. ATCC 49242 (MOB tipo II), pero con una tasa de

consumo mayor al primero en todos los tratamientos (Figura 28, $P < 0,05$ sólo en caso de H_2S), lo que coincide con lo descrito con anterioridad para el género *Methylocystis* (Lee et al., 2011). La cepa *Methylomicrobium album* ATCC 33003 (MOB tipo I) fue afectada por todos los tratamientos de este estudio (Figura 27 D 1, 2 y 3; Figura 28), aunque su tasa de consumo de CH_4 fue la mayor de los cultivos estudiados al no usar tratamiento (Figuras 28, $P < 0,05$ en todos los casos), similar a lo informado previamente en cultivos líquidos de la especie (Cáceres et al., 2014). El efecto menor de los gases estudiados sobre la metanotrofia en MOBs tipo II, en comparación con MOBs tipo I coincide con lo descrito por otros investigadores con anterioridad (Nyerges y Stein, 2009). Estas observaciones sugieren fuertemente que el aislado β tiene un gran potencial para ser aplicado en biofiltración, puesto que su eficiencia es equivalente o superior a otras MOBs, tipo I y II (Figura 28), y además no se ve afectada por el H_2S y por el NH_3 , a diferencia de las demás MOBs de este estudio y de las descritas en la literatura hasta ahora (Dam et al., 2014).

VII.4. En biopelículas de MOBs sobre polietileno, el tratamiento con H_2S y NH_3 no afecta la expresión de *pmoA1* y disminuye la expresión de *pmoA2*, mientras que en cultivos planctónicos, algunos tratamientos producen una disminución de la expresión de *pmoA1* y todos provocan la disminución de la expresión de *pmoA2*. En biopelículas del aislado β , sólo el tratamiento con NH_3 produce un leve aumento de la expresión del ARNm *pmoA1* y un aumento significativo de *pmoA2* (Figuras 29 A y 30 A respectivamente). Este estímulo sugiere inespecificidad de la enzimas de alta y baja afinidad para la que codifican estos

genes respectivamente. Esto se debe al gran parecido molecular entre NH_3 y CH_4 y a la competencia que puede darse entre estas dos especies químicas por la enzima pMMO (Nyerges y Stein, 2009), dado que la enzima pMMO tiene un gran parecido con la enzima amonio mono oxigenasa (AMO) de las bacterias nitrificantes (que oxidan NH_3), por lo que este comportamiento ya ha sido reportado por otros investigadores (Mandernack et al., 2009). Aunque esto parece explicar las tendencias en la tasa de consumo de CH_4 observadas en la Figura 28, el coeficiente de Pearson indicó que no hay correlación entre ambas mediciones: la expresión relativa de los ARNm de ambos *pmoA* y la tasa de consumo de CH_4 (Tabla 14 y Tabla 15), excepto una covariación positiva entre la síntesis de ARNm del gen *pmoA2* bajo tratamiento con NH_3 ($r=0,6461$; $P=0,0232$). Es decir, en el aislado β sólo la aplicación de NH_3 estimula el consumo de CH_4 lo que se explica por una sobrerregulación del gen *pmoA2*. Los demás tratamientos no afectan significativamente al mencionado cultivo.

El aislado ε aumentó la expresión de *pmoA1* al ser tratada con NH_3 , mientras que no hubo efecto bajo los demás tratamientos (Figura 29 B). Esta sobrerregulación se correlacionó negativamente con la tasa de consumo ($r=-0,8801$; $P=0,0207$; Tabla 9). La expresión del gen *pmoA2* fue menor en todos los tratamientos para el aislado bacteriano mencionado (Figura 30 B). Dicha expresión covarió positivamente con la tasa de consumo de CH_4 (Tabla 14). Ambos comportamientos de este cultivo en cuanto a la expresión de los mensajeros estudiados siguen la misma tendencia que en la cepa *Methylocystis* sp. ATCC 49242 (Figuras 29 C y 30 C) y concuerdan con lo hallado en cuanto a tratamiento con NH_3 para el género *Methylocystis* (Dam et

al., 2014), sin embargo no se ha descrito la expresión de los mensajeros mencionados bajo tratamiento con H₂S. A su vez, la tendencia en la disminución de la metanotrofia bajo tratamiento con H₂S se explica por la disminución de la expresión del gen *pmoA2*, que covarió fuertemente de manera positiva con la tasa de consumo de CH₄, tanto para el aislado ϵ (r=0,9580; P=0,0026), como para la cepa *Methylocystis* sp. ATCC 49242 (r=0,9725; 0,0011), mientras que en el caso de *pmoA1* no hubo cambios significativos bajo la mencionada condición (Figura 29 C). Por su parte, la cepa *Methylomicrobium album* ATCC 33003 mostró un aumento significativo en la expresión del gen *pmoA1* en todas las condiciones de perturbación (Figura 29 D), mientras que se observó sólo un descenso significativo de la expresión de *pmoA2* cuando se trató las biopelículas de la cepa con NH₃ (Figura 30 D), algo que no ha sido informado para bacterias de esta especie, ni MOBs tipo I hasta la fecha. Sólo los resultados hallados en la expresión de *pmoA1* para *Methylomicrobium album* se correlacionan fuertemente de manera negativa con la tasa de consumo de CH₄ en todas las condiciones. Así, en esta cepa, al agregar alguno de los gases inhibidores en estudio, se produce una disminución de la tasa de consumo de CH₄, que conlleva un aumento en la síntesis del ARNm del gen *pmoA1*. Esto sugiere que la cepa antes nombrada aumenta la síntesis de ARNm del gen *pmoA1* para compensar la inhibición ejercida por H₂S o NH₃.

Estos hallazgos sugieren, según lo descrito en las Tablas 14 y 15, que en las biopelículas de MOBs tipo II la expresión *pmoA2* es directamente proporcional a la tasa de consumo de CH₄, bajo perturbación con H₂S, NH₃ y su mezcla, mientras que en biopelículas de MOBs tipo I tratadas con los mencionados gases, se da una

expresión de *pmoA1* inversamente proporcional a la tasa de consumo de CH₄. Sin embargo, cabe destacar que este último planteamiento es a modo global y que la síntesis del ARNm de los genes *pmoA1* y *pmoA2* de una MOB es dependiente de la especie que del grupo en el que esté clasificada la bacteria (Nyerges y Stein, 2009). Estudios con mayor número de réplicas son necesarios para aplicar test estadísticos mejor aproximados.

En cultivos planctónicos del aislado β (MOB tipo II), sólo el tratamiento con H₂S produce una leve disminución de la expresión de *pmoA1* (Figura 31 A), mientras que todos los tratamientos produjeron una disminución significativa de la expresión de *pmoA2* (Figura 32 A). Este resultado concuerda con lo antes informado por otros investigadores en cultivos líquidos (Dam et al., 2014). En el aislado ϵ disminuyó la expresión de *pmoA1* y *pmoA2* en todas las condiciones de perturbación (Figura 31 B y 32 B respectivamente). Esta tendencia es diferente a la encontrada para *pmoA1* en la cepa *Methylocystis* sp. ATCC 49242 (Figura 31 C), pero similar en cuanto a *pmoA2*, respecto al tratamiento con NH₃. A su vez *Methylocystis* sp. ATCC 49242 mostró un comportamiento idéntico en cuanto a la expresión de *pmoA1* y *pmoA2* bajo perturbación con NH₃ (Figura 31 C y 32 C respectivamente) según lo ya descrito en literatura (Dam et al., 2014). La cepa *Methylomicrobium álbum* ATCC 33003 sólo mostró una disminución significativa de *pmoA1* cuando el NH₃ estuvo presente (Figura 31 D), mientras que se observó un descenso significativo de la expresión de *pmoA2* en todos los tratamientos (Figura 32 D). Dichos resultados no constan de informes previos con los que se puedan contrastar. Como se mencionó

con anterioridad para biopelículas, tampoco se ha descrito la expresión de los mensajeros mencionados bajo tratamiento con H₂S en cultivos líquidos para alguna especie de MOB.

Finalmente, se rechaza la hipótesis de esta tesis planteada para la expresión de *pmoA1* y se acepta para *pmoA2* bajo perturbación con H₂S y NH₃ en biopelículas. Además, se encontró una cepa del género *Methylocystis* (β) que es más eficiente, en el consumo de metano, que sus contrapartes de las MOB tipo II e igual de eficiente que las MOB tipo I, pero con la ventaja que no es afectada por la perturbación con H₂S y NH₃.



IX. CONCLUSIÓN

1) En biopelículas de MOBs sobre polietileno, el H₂S (500 ppm) y NH₃ (500 ppm), no afectan la expresión de *pmoA1*, pero si disminuyen la expresión de *pmoA2*.

2) En cultivos planctónicos, el tratamiento con H₂S (500 ppm), produce una disminución de la expresión de *pmoA1* y *pmoA2*, mientras que, tanto el H₂S (500 ppm) como el NH₃ (500 ppm) provocan la disminución de la expresión de *pmoA2*.

3) El aislado bacteriano β es una especie del género *Methylocystis*, procedente de un bosque de Ránquil (VIII región, Chile), es más eficiente en la oxidación de metano que las MOBs tipo II, igual de eficiente que las MOBs tipo I y su consumo de CH₄ no es afectado por el H₂S y NH₃.

4) El aislado bacteriano ε corresponde a la especie *Methylocystis parvus* y muestra un típico comportamiento de MOB tipo II en la oxidación de CH₄ ante la perturbación con H₂S (500 ppm) y NH₃ (500 ppm), siendo el menos eficiente del estudio.

5) Las MOBs tipo I son más eficientes que las MOBs tipo II en la oxidación de CH₄, pero las últimas son más resistentes a la perturbación con H₂S (500 ppm) y NH₃ (500 ppm).

6) La expresión de los genes *pmoA1* y *pmoA2* se ve menos afectada por la perturbación con H₂S, NH₃ o su mezcla, cuando las MOBs están al estado de biopelículas.



X. REFERENCIAS

Ali H., Scanlan J., Dumont M. y Murrell J. 2006. Duplication of the *mmoX* gene in *Methylosinus sporium*: cloning, sequencing and mutational analysis. *Microbiology*. 152: 2931–2942.

Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z. y Miller, W. 1997. Gapped Blast and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–402.

Anuliina Putkinen^{1*}, Tuula Larmola^{2†}, Tero Tuomivirta¹, Henri M. P. Siljanen³, Levente Bodrossy^{4,5}, Eeva-Stiina Tuittila^{2,6} and Hannu Fritze. 2012. Water dispersal of methanotrophic bacteria maintains functional methane oxidation in *Sphagnum* mosses. *Front Microbiol.* 3: 1-10.

Belova S., Baani M., Suzina N., Bodelier P., Liesack W., Dunfield P. y Dedys S. 2011. Acetate utilization as a survival strategy of peat-inhabiting *Methylocystis* spp. *Environ Microbiol Reports.* 3: 36–46.

Benstead J., King G. y Williams H. 1998. Methanol Promotes Atmospheric Methane Oxidation by Methanotrophic Cultures and Soils. *Appl Environ Microbiol.* 64: 1091–1098.

Boden R., Cunliffe M., Scanlan J., Moussard H., Kits D., Klotz M., Jetten M., Vuilleumier S., Han J., Peters L., Mikhailova N., Teshima H., Tapia R., Kyrpides N., Ivanova N., Pagani I., Cheng J-F., Goodwin L., Han C., Hauser L., Land M., Lapidus A., Lucas S., Pitluck S., Woyke T., Stein L. y Murrell J. 2011. Complete Genome Sequence of the Aerobic Marine Methanotroph *Methylomonas methanica* MC09. J Bacteriol. 193: 7001–7002.

Boon N., De Windt W., Verstraete W. y Top E. 2002. Evaluation of nested PCR^DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. FEMS Microbiol Ecol. 39: 101-112.

Bowman J., Sly L., Nichols P. y Hayward A. 1993. Revised Taxonomy of the Methanotrophs: Description of *Methylobacter* gen. nov., Emendation of *Methylococcus*, Validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* Species, and a Proposal that the Family Methylococcaceae Includes Only the Group I Methanotrophs. Int J Syst Bacteriol. 43: 735-753.

Dam B., Dam S., Kim Y. y Liesack W. 2014. Ammonium induces differential expression of methane and nitrogen metabolism-related genes in *Methylocystis* sp. strain SC2. Environ Microbiol. 16: 3115-27.

Garrity G., Brenner D., Krieg N. y Staley J. 2005a. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Segunda edición. Volumen 2. Parte B (*Gammaproteobacteria*). Springer, Alemania.

Garrity G., Brenner D., Krieg N. y Staley J. 2005b. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Segunda edición. Volumen 2. Parte C (*Alpha-, beta-, delta- y epsilonproteobacteria*). Springer, Alemania.

Buck J. 1982. Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria. Appl Environ Microbiol. 44: 992-993.

Cáceres M., Gentina J., Aroca G. 2013. Oxidation of methane by *Methylomicrobium album* and *Methylocystis* sp. in the presence of H₂S and NH₃. Biotechnol Lett. En espera de impresión.

Campbell M., Nyerges G., Kozlowski J., Poret-Peterson A., Stein L y Klotz M. 2011. Model of the molecular basis for hydroxylamine oxidation and nitrous oxide production in methanotrophic bacteria. FEMS Microbiol Lett. 322: 82–89.

Chi Fru E., Gray N., McCann C., Baptista J., Christgen B., Talbot H., El Ghazouani A., Dennison C. Y Graham D. 2011. Effects of copper mineralogy and methanobactin on cell growth and sMMO activity in *Methylosinus trichosporium* OB3b. Biogeosciences. 8: 2887–2894.

Chistoserdova L., Chen S., Lapidus A. y Lidstrom M. 2003. Methylo-trophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. *J Bacteriol.* 185: 2980–2987.

Costello A. y Lidstrom M. 1999. Molecular Characterization of Functional and Phylogenetic Genes from Natural Populations of Methanotrophs in Lake Sediments. *Appl Environ Microbiol.* 65: 5066–5074.

Culpepper M. y Rosenzweig A. 2012. Architecture and active site of particulate methane monooxygenase. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 47:483-92.

Dalton H. 2005. The Leeuwenhoek Lecture 2000 The natural and unnatural history of methane oxidizing bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360: 1207–1222.

Dam B., Dam S., Kube M., Reinhardt R. y Liesack W. 2012. Complete Genome Sequence of *Methylocystis* sp. Strain SC2, an Aerobic Methanotroph with High-Affinity Methane Oxidation Potential. *J Bacteriol.* 194(: 6008–6009.

Dedysh S. y Dunfield P. 2011. Facultative and Obligate Methanotrophs: How to Identify and Differentiate Them. *Methods Enzymol.* 495: 31-44.

Dedysh S., Knief C. y Dunfield P. 2005 . *Methylocella* species are facultatively methanotrophic. *J Bacteriol.* 187: 4665–4670.

Dedysh S., Liesack W., Khmelenina V., Suzina N., Trotsenko Y., Semrau J., Bares A., Panikov N. y Tiedje J. 2000. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 955-969.

DeLong E. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 89: 5685–5689.

Dianou D., Ueno C., Ogiso T., Kimura M. y Asakawa S. 2012. Diversity of Cultivable Methane-Oxidizing Bacteria in Microsites of a Rice Paddy Field: Investigation by Cultivation Method and Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Microbes Environ.* 27: 278-87.

Dunfield P., Belova S., Vorob'ev A., Cornish S., y Dedysh S. 2010. *Methylocapsa aurea* sp. nov., a facultatively methanotrophic bacterium possessing a particulate methane monooxygenase. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 2659–2664.

Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H., Stackebrandt E. 2006. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria.* 3ª Edición. Springer. 5: 266-289; 6: 766.

El Ghazouani A., Baslé A., Gray J., Graham D., Firbank S. y Dennison C. Variations in methanobactin structure influences copper utilization by methane-oxidizing bacteria. PNAS. 109: 8400–8404.

Erikstad H., Jensen S., Keen T., Birkeland N. 2012. Differential expression of particulate methane monooxygenase genes in the verrucomicrobial methanotroph 'Methylophilum kamchatkense' Kam1. Extremophiles. 16:405–409.

Etiopé G. y Klusman R. 2002. Geologic emissions of methane to the atmosphere. Chemosphere 49: 777–789.

Jagadevan S. y Semrau J. 2013. Priority pollutant degradation by the facultative methanotroph, Methylocystis strain SB2. Appl Microbiol Biotechnol. 97: 5089–5096.

Lee E., Yi T., Moon K., Park H., Ryu H. y Cho K. 2011. Characterization of Methane Oxidation by a Methanotroph Isolated from a Landfill Cover Soil, South Korea. J. Microbiol. Biotechnol. 21: 753–756.

Lee J., Kim T. y Cho K. 2012. Isolation and characterization of a facultative methanotroph degrading malodor-causing volatile sulfur compounds. J Hazard Mater. 235-236: 224– 229.

Flemming H., Neu T. y Wozniak D. 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *J Bacteriol.* 189: 7945–7947.

Foster J. y Davis R. 1966. A Methane-Dependent Coccus, with Notes on Classification and Nomenclature of Obligate, Methane-Utilizing Bacteria. *J Bacteriol.* 91: 1924-1931.

Gaudin F., Andres Y. y Le Cloirec P. 2007. Packing material formulation for odorous emission biofiltration. *Chemosphere.* 70: 958-66.

González-Sánchez A. y Revah S. 2009. Biological sulfide removal under alkaline and aerobic conditions in a packed recycling reactor. *Water Sci Technol.* 59: 1415-21.

Grenfell J., Rauer H., Selsis F., Kaltenecker L., Beichman C., Danchi W., Eiroa C., Fridlund M., Henning T., Herbst T., Lammer H., Léger A., Liseau R., Lunine J., Paresce F., Penny A., Quirrenbach A., Röttgering H., Schneider J., Stam D., Tinetti G. y White G. *Astrobiology.* 10: 77-88.

Hakemian A., Kondapalli K., Telser J., Hoffman B., Stemmler T. y Rosenzweig A. 2008. The metal centers of particulate methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochem.* 47: 6793–6801.

Hakemian A. y Rosenzweig A. 2007. The Biochemistry of Methane Oxidation. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 223–41.

Han J., Lontoh S. y Semrau J. 1999. Degradation of chlorinated and brominated hydrocarbons by *Methylomicrobium album* BG8. *Arch Microbiol.* 172: 393–400

Han J. y Semrau J. 2004. Quantification of gene expression in methanotrophs by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Environ Microbiol.* 6: 388–399.

Hanna L. y Taylor R. 1996. Attachment/Detachment and Trichloroethylene Degradation-Longevity of a Resting Cell *Methylosinus trichosporium* OB3b Filter. *Biotechnol Bioeng.* 51: 659-672.

Hanson R. y Hanson T. 1996. Methanotrophic Bacteria. *Microbiol Rev.* 60: 439–471.

Henneberger R., Lüke C., Mosberger L. y Schroth M. 2011. Structure and function of methanotrophic communities in a landfill-cover soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 81: 1–14.

Hernández M. 2010. Suelos de humedales como sumideros de carbono y fuente de metano. *Terra Latinoamericana.* 28: 139-147.

Hettiarachchi V., Hettiaratchi P., Mehrotra A. y Kumar S. 2011. Field-scale operation of methane biofiltration systems to mitigate point source methane emissions. *Environ Pollut.* 159: 1715e1720.

Hirai M., Kamamoto M., Yani M. y Shoda M. 2001. Comparison of the biological H₂S removal characteristics among four inorganic packing materials. *J Biosci Bioeng.* 91: 396–402.

Hoefman S., van der Ha D., De Vos P., Boon N. y Heylen K. 2011. Miniaturized extinction culturing is the preferred strategy for rapid isolation of fast-growing methane-oxidizing bacteria. *Microb Biotechnol.* 5: 368-78.

Hoefman S., van der Ha D., Boon N., Vandamme P., De Vos P. y Heylen K. 2013. Customized media based on miniaturized screening improve growth rate and cell yield of methane-oxidizing bacteria of the genus *Methylomonas*. *Antonie van Leeuwenhoek. En impression.*

Holmes, A., Owens N. y Murrell J. 1995. Detection of novel marine methanotrophs using phylogenetic and functional gene probes after methane enrichment. *Microbiology* 141: 1947–1955.

Hutchens H., Radajewski S., Dumont M., McDonald I. y Murrell J. 2004. Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing. *Environ Microbiol.* 6: 111–120.

Hwang J., Choi Y., Park S., Choi C. y Lee E. 2007. Development and mathematical modeling of a two-stage reactor system for trichloroethylene degradation using *Methylosinus trichosporium* OB3b . *Biodegradation.* 18: 91–101.

Iguchi H., Yurimoto H. y Sakai Y. 2011. Stimulation of Methanotrophic Growth in Cocultures by Cobalamin Excreted by Rhizobia. *Appl Environ Microbiol.* 77: 8509–8515.

Im, J., Lee, S.-W., Yoon, S., Dispirito, A. A., and Semrau, J. D. 2011. Characterization of a novel facultative *Methylocystis* species capable of growth on methane, acetate and ethanol. *Environ Microbiol Reports.* 3: 174–181.

IPCC Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007. *Climate change 2007: synthesis report.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Jagadevan S. y Semrau J. 2012. Priority pollutant degradation by the facultative methanotroph, *Methylocystis* strain SB2. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 5089-96.

Karlsen O., Berven F., Bagstevold J., Larsen Ø. y Jensen H. 2011. *Methylococcus capsulatus* (Bath): From Genome to Protein Function, and Vice Versa. *Methods Enzymol.* 495: 63-79.

Kato N., Yurimoto H. y Thauer R. 2006. The physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and Archaea. *Biosci Biotech Biochem.* 70: 10–21.

Kelly D., Anthony C. y Murrell J. 2005. Insights into the obligate methanotroph *Methylococcus capsulatus*. *Trends Microbiol.* 13: 195-198.

Kennes C. y Veiga M. 2001. *Bioreactors for Waste Gas Treatment*. Kluwer Academic Publishers. 47–98. The Netherlands.

Kickert R. 1989. The Greenhouse effect: Impacts of ultraviolet-B (UV-B) radiation, carbon dioxide (CO₂), and ozone (O₃) on vegetation. *Environ pollut.* 61: 263–393.

Kisten A. y Kurdish I. 2002. Effect of gas mixture component composition on the process of hard materials colonization by methanotrophic bacteria. *Mikrobiol Z.* 64: 67-74.

Kisten A., Roř A., Kurdish I. 2004. Features of solid materials' colonization by pure and mixed cultures of methanotrophs. *Mikrobiol Z.* 66: 64-71.

Kitmitto A., Myronova N., Basu P. y Dalton H. 2005. Characterization and structural analysis of an active particulate methane monooxygenase trimer from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochem.* 44: 10954–10965.

Knief C., Kolb S., Bodelier P., Lipski A. y Dunfield P. 2006. The active methanotrophic community in hydromorphic soils changes in response to changing methane concentration. *Environ Microbiol.* 8: 321–333.

Korotkova N. y Lidstrom M. 2002. Glyoxylate regeneration pathway in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* 184: 1750–1758.

Kozubal M., Macur R., Korf S., Taylor W., Ackerman G., Nagy A. y Inskeep W. 2008. Isolation and Distribution of a Novel Iron-Oxidizing Crenarchaeon from Acidic Geothermal Springs in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol.* 74: 942-949.

Lee S-Y., Lee S., Jang J. y Cho K-S. 2011. Comparison of Methanotrophic Community and Methane Oxidation between Rhizospheric and Non-Rhizospheric Soils. *Geomicrobiol J.* 28: 676–685.

Lieberman R. y Rosenzweig A. 2005a. Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* 434: 177–182.

Lieberman R. y Rosenzweig A. 2005b. The quest for the particulate methane monooxygenase active site. *Dalton Trans.* 21: 3390–3396.

Lieberman, R. L., and Rosenzweig, A. C. (2004). Biological methane oxidation: Regulation, biochemistry and active site structure of particulate methane monooxygenase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39(3): 147–164.

Lüke C. y Frenzel P. 2011. Potential of *pmoA* Amplicon Pyrosequencing for Methanotroph Diversity Studies. *Appl Environ Microbiol.* 77: 6305–6309.

Macalady J., McMillan A., Dickens A., Tyler S. y Scow K. 2002. Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils. *Environ Microbiol.* 4: 148–157.

Madigan M., Martinko J. y Parker J. 2004. Brock: Biología de los microorganismos. 10ª Edición. Pearson. USA. 354, 366, 598.

Maestre J., Rovira R., Álvarez-Hornos F., Fortuny M., Lafuente J., Gamisans X. y Gabriel D. 2010. Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach. *Chemosphere.* 80: 872–880.

Malashenko Y., Pirog T., Romanovskaya V., Sokolov I. y Grinberg T. 2001. Search for Methanotrophic Producers of Exopolysaccharides. *Appl Biochem Micro.* 37: 599–602.

Krüger M., Blumenberg M., Kasten S., Wieland A., Känel L., Klock J-H, Michaelis W. y Seifert R. 2008. A novel, multi-layered methanotrophic microbial mat system growing on the sediment of the Black Sea. *Environ Microbiol.* 10: 1934–1947.

Mandernack K., Mills T., Johnson C., Rahn T. y Kinney C. 2009. The $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values of N_2O produced during the co-oxidation of ammonia by methanotrophic bacteria. *Chem Geol.* 267: 96–107

McDonald I., Miguez C., Rogge G., Bourque D., Wendlandt K., Groleau D. y Murrell J. 2006. Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 255: 225–232.

Mount D. 2004. *Bioinformatics: sequence and genome analysis*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.

McEntyre J. y Ostell J. 2002. *The NCBI Handbook*. National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD), USA.

Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H. y Waver C. (1998). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds). *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda. 1–27.

Muyzer G., de Waal E y Uittierlinden A. (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: 695-700.

Myronova N., Kitmitto A., Collins R., Miyaji A. y Dalton H. 2006. Threedimensional structure determination of a protein supercomplex that oxidizes methane to formaldehyde in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochem.* 45: 11905–11914.

Narihiro T., Hori T., Nagata O., Hocino T., Yumoto I. y Kamagata Y. 2011. The impact of aridification and vegetation type on changes in the community structure of methane-cycling microorganisms in Japanese wetlands soils. *Biochem.* 75: 1727-1734.

Narihiro T., Hori T., Nagata O., Hoshino T., Yumoto I. y Kamagata Y. 2011. The Impact of Aridification and Vegetation Type on Changes in the Community Structure of Methane-Cycling Microorganisms in Japanese Wetland Soils. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 1727–1734.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) Pubmed. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Búsqueda realizada con las frases “methanotrophic biofilter”, “methylococcus capsulatus biofilm”, “methylosinus trichosporium biofilm”, “methylosinus trichosporium biofilter”. Consultado el 5/9/2012 (17:43 hrs.).

Nguyen H., Elliott S., Yip J. y Chan S. 1998. The particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme. *J Biol Chem.* 273: 7957–7978.

Nyerges & Lisa Y. Stein. 2009. Ammonia cometabolism and product inhibition vary considerably among species of methanotrophic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 297: 131–136.

Nyerges G., Han S. y Stein L. 2010. Effects of Ammonium and Nitrite on Growth and Competitive Fitness of Cultivated Methanotrophic Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 76: 5648–5651.

Perry R., Green D. y Maloney J. 1997. *Perry's chemical engineers' handbook*. McGraw-Hill. New York. 2640.

Pflugger A., Wub W., Pieja A., Wanb J., Rostkowski K. y Criddle C. 2011. Selection of Type I and Type II methanotrophic proteobacteria in a fluidized bed reactor under non-sterile conditions. *Bioresour Technol.* 102: 9919–9926.

Reiner K. 2010. Catalase Test protocol. ASM Microbe Library. Actualizado en Abril del 2013. Consultado el 30 de Agosto del 2013. 13:58 hrs. <http://www.microbelibrary.org/index.php/library/laboratory-test/3226-catalase-test-protocol>

Rutledge R y Stewart D. 2008a. A kinetic-based sigmoidal model for the polymerase chain reaction and its application to high-capacity absolute quantitative real-time PCR. BMC Biotechnol. 8. doi:10.1186/1472-6750-8-47.

Rutledge R y Stewart D. 2008b. Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR. BMC Mol Biol. 9. doi:10.1186/1471-2199-9-96.

Rutledge R y Stewart D. 2010. Assessing the Performance Capabilities of LRE-Based Assays for Absolute Quantitative Real-Time PCR. PLoS One. 5: e9731.

Rutledge R 2011. A Java Program for LRE-Based Real-Time qPCR that Enables Large-Scale Absolute Quantification. PLoS One. 6: e17636.

Peter Ricke,¹ Christoph Erkel,¹ Michael Kube,² Richard Reinhardt,² and Werner Liesack¹. 2004. Comparative Analysis of the Conventional and Novel pmo (Particulate Methane Monooxygenase) Operons from Methylocystis Strain SC2. Appl Environ Microbiol. 70: 3055–3063.

Riebeek H. 2011. The Carbon Cycle. Herat Observatory. NASA.
<http://earthobservatory.nasa.gov/Features/CarbonCycle> (consultado el 29/3/2012).

Saitou N. y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406-25.

Salo-Zieman V., Sivonen T., Plumb J., Haddad C., Laukkanen K., Kinnunen P., Kaksonen A., Franzmann P. y Puhakka J. 2006. Characterization of a thermophilic sulfur oxidizing enrichment culture dominated by a *Sulfolobus* sp. obtained from an underground hot spring for use in extreme bioleaching conditions. *Journal Ind Microbiol Biot.* 33: 984-994.

Schopf S., Wanner G., Rachel R. y Wirth R. 2008. An archaeal bi-species biofilm formed by *Pyrococcus furiosus* and *Methanopyrus kandleri*. *Arch Microbiol.* 190: 371–377.

Sene L., Converti A., Felipe M. y Zilli M. 2002. Sugarcane bagasse as alternative packing material for biofiltration of benzene polluted gaseous streams: A preliminary study. *Bioresource Technol.* 83: 153–157.

Sercu, B., Boon, N., Vander Beken, S., Verstraete, W. y Van Langenhove, H. 2006. Performance and Microbial Analysis of Defined and Non-Defined Inocula for the Removal of Dimethyl Sulfide in a Biotrickling Filter. *Biotechnol Bioeng.* 96: 661-672.

Shima S., Krueger M., Weinert T., Demmer U., Kahnt J., Thauer R. y Ermiler U. 2012. Structure of a methyl-coenzyme M reductase from Black Sea mats that oxidize methane anaerobically. *Nature*. 481:98-101.

Shrestha M., Shrestha P., Frenzel P. y Conrad R. 2010. Effect of nitrogen fertilization on methane oxidation, abundance, community structure, and gene expression of methanotrophs in the rice rhizosphere. *ISME J.* 4: 1545–1556.

Singh B., Tate K., Kolipaka G., Hedley C., Macdonald C., Millard P. y Murrell C. 2007. Effect of Afforestation and Reforestation of Pastures on the Activity and Population Dynamics of Methanotrophic Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 73: 5153–5161.

Singh J. 2011. Methanotrophs: the potential biological sink to mitigate the global methane load. *Curr Sci.* 100: 29-30.

Smith S., Rawat S., Telser J., Hoffman B., Stemmler T. y Rosenzweig A. 2011. Crystal Structure and Characterization of Particulate Methane Monooxygenase from *Methylocystis* species Strain M. *Biochem.* 50: 10231–10240.

Sulzman E. 2000. The carbon cycle. University Corporation for Atmospheric Research. National Center for Atmospheric Research. USA. 1–28.

Summers W. 1970. A simple method for extraction of RNA from *E. coli* utilizing diethyl pyrocarbonate. *Anal Biochem.* 33: 459–463.

Suntharalingam P. y Cvitkovitch D. 2005. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol.* 13: 3-6.

Svenning M., Warttainen I., Hestnes A. y Binnerup S. 2003. Isolation of methane oxidising bacteria from soil by use of a soil substrate membrane system. *FEMS Microbiol Ecol.* 44: 347-354.

Tamura K., Nei M. y Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 101: 11030-11035.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. y Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Tanthachoon N., Chiemchaisri C., Chiemchaisri W., Tudsri S. y Kumar S. 2008. Methane Oxidation in Compost-Based Landfill Cover with Vegetation during Wet and Dry Conditions in the Tropics. *J Air & Waste Manage Assoc.* 58: 603–612.

Theisen A., Ali M., Radajewski S., Dumont M., Dunfield P., McDonald I., Dedysh S., Miguez C. y Murrell J. 2005. Regulation of methane oxidation in the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2. *Mol Microbiol.* 58: 682–692.

Tinberg C y Lippard S. 2010. Dioxygen Activation in Soluble Methane Monooxygenase. *Acc Chem Res.* 44:280–288.

Trotsenko Y. y Khmelenina V. 2005. Aerobic methanotrophic bacteria of cold ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol.* 53: 15–26.

Trotsenko Y. y Murrell J. 2008. Metabolic Aspects of Aerobic Obligate Methanotrophy. *Adv Appl Microbiol.* 63: 183-229.

US Department of Energy. 2008. Carbon Cycling and Biosequestration: Integrating Biology and Climate Through Systems Science. Report from the March 2008 Workshop. DOE/SC-108, U.S. Department of Energy Office of Science. 1-133.

Ve T., Mathisen K., Helland R., Karlsen O., Fjellbirkeland A., Røhr Å, Andersson K., Pedersen R., Lillehaug J. y Jensen H. 2012. The *Methylococcus capsulatus* (Bath) Secreted Protein, MopE*, Binds Both Reduced and Oxidized Copper. *PLoS ONE* 7: e43146.

Veillette M., Avalos A. y Heitz M. 2012. Biofiltration of air polluted with methane at concentration levels similar to swine slurry emissions: Influence of ammonium concentration. *J Environ Sci Heal A*. 47: 1053–1064.

Vitaly V. Kadnikov¹, Andrey V. Mardanov¹, Alexey V. Beletsky¹, Olga V. Shubenkova², Tatiana V. Pogodaeva², Tamara I. Zemskaya², Nikolai V. Ravin¹ & Konstantin G. Skryabin. 2011. Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal. *FEMS Microbiol Ecol*. 79: 348–358.

Vorholt J. 2002. Cofactor-dependent formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Arch Microbiol*. 178: 239–249.

Vorholt J., Kalyuzhnaya M., Hagemeyer C., Lidstrom M. y Chistoserdova L. 2005. MtdC, a novel class of methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenases. *J Bacteriol*. 187: 6069–6074.

Ward N., Larsen Ø., Sakwa J., Bruseth L., Khouri H., Durkin A., Dimitrov G., Jiang L., Scanlan D., Kang K. H., Lewis M., Nelson K., Methé B., Wu M., Heidelberg J., Paulsen I., Fouts D., Ravel J., Tettelin H., Ren Q., Read T., DeBoy R., Seshadri R., Salzberg S., Jensen H., Birkeland N., Nelson W., Dodson R., Grindhaug S., Holt I., Eidhammer I., Jonassen I., Vanaken S., Utterback T., Feldblyum T., Fraser C., Lillehaug J., Eisen J. 2004. Genomic insights into methanotrophy: The complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *PloS Biol*. 2: 1616–1628.

Welander P. y Summons R. 2012. Discovery, taxonomic distribution, and phenotypic characterization of a gene required for 3-methylhopanoid production. PNAS. 109: 12905–12910.

Whittenbury R., Phillips K. y Wilkinson J. 1970. Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria. J Gen Microbiol. 61: 205-218.

Wilshusen J., Hettiaratchi J., De Visscher A. y Saint-Fort R. 2004. Methane oxidation and formation of EPS in compost: effect of oxygen concentration. Environ Pollut. 129: 305–314.

Wilshusena J., Hettiaratchia J.,*, De Visscherb A. y Saint-Fort R. 2004. Methane oxidation and formation of EPS in compost: effect of oxygen concentration. Environ Pollut. 129: 305–314.

Wittenbury R., Phillips K., y Wilkinson J. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria. J Gen Microbiol 61: 205-218.

Yang N., Lü F., He P y Shao L. 2011. Response of methanotrophs and methane oxidation on ammonium application in landfill soils. Appl Microbiol Biotechnol. 92: 1073–1082.

Yoon S., Carey J. y Semrau J. 2009. Feasibility of atmospheric methane removal using methanotrophic biotrickling filters. *Appl Microbiol Biotechnol.* 83: 949–956.

Yurimoto H., Kato N. y Sakai Y. 2009. Genomic organization and biochemistry of the ribulose monophosphate pathway and its application in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84:407–416.

Zahn J., Bergmann D., Boyd J., Kunz R. y DiSpirito A. 2001. Membraneassociated quinoprotein formaldehyde dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Bacteriol.* 183: 6832–6840.

Zhang X., Reddy S. y Bruice T. 2007. Mechanism of methanol oxidation by quinoprotein methanol dehydrogenase. *PNAS.* 104: 745–749.

Zheng Y., Yang W., Sun X., Wang S-P., Rui Y-C. Luo C-Y. y Guo L-D. 2012. Methanotrophic community structure and activity under warming and grazing of alpine meadow on the Tibetan Plateau. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93: 2193–2203.