



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Efectos del cambio climático en
comunidades metanogénicas de lagos en
Alaska”**

Daniela Alves Menoni

Orientador: Dra. Claudia Etchebehere

Co-orientador: Dra. Bruna Martins Dellagnezze

**Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Bioquímica y
Genómica Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas
Clemente Estable.**

PÁGINA DE APROBACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

El tribunal docente integrado por los abajo firmantes aprueba la Tesis de Investigación:

Título

.....
.....

Autor/s

.....
.....

Tutor

.....
.....

Carrera

.....
.....

Puntaje

.....
.....

Tribunal

Profesor.....
(Nombre y firma)

Profesor.....
(Nombre y firma)

Profesor.....
(Nombre y firma)

Fecha

Tabla de contenido

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. El ambiente Ártico.....	7
1.1.1. Permafrost	8
1.1.2. Calentamiento en el Ártico y consecuencias.....	11
1.2. Ciclo del Carbono en la naturaleza	14
1.2.1. Producción de metano por microorganismos.....	16
1.2.2. Desbalance del ciclo del carbono y emisiones de gases de efecto invernadero	17
1.3. Intercambio de metano	19
1.3.1. Metanotrofía.....	20
1.3.2. Metanogénesis.....	23
1.3.2.1. Factores que influyen en la metanogénesis.....	26
1.3.2.2. Actividad metanogénica en ambientes fríos.....	28
1.3.2.3. Métodos para evaluar la actividad metanogénica	32
1.3.3. Microorganismos metanogénicos	34
1.3.3.1. Microorganismos metanogénicos descritos a bajas temperaturas	35
1.4. Emisiones de metano en el contexto de cambio climático	37
1.5. Emisiones de metano en lagos	39
Proyecto marco de este trabajo	40
2. OBJETIVO GENERAL	42
2.1. Objetivos específicos	42
3. HIPÓTESIS.....	42
4. MATERIALES Y MÉTODOS	43
4.1. Extracción de muestras	43
4.2. Estrategia de trabajo	44

4.2.1. Ensayos en batch para determinar la producción de metano	45
4.2.2. Mediciones de concentración de metano por cromatografía de gases (GC).....	49
4.3. Cálculo de actividad metanogénica	50
4.4. Análisis estadísticos.....	53
5. RESULTADOS.....	54
6- DISCUSIÓN.....	62
Producción de metano en lagos y factores influyentes	62
7- CONCLUSIÓN.....	73
8- BIBLIOGRAFÍA.....	76
ANEXO 1	88
PROTOCOLOS ERANET	88

RESUMEN

El calentamiento global es un tema que nos concierne a todos, y como tal se ha hecho muy importante en los últimos tiempos conocer más sobre sus causas, sus consecuencias y las posibilidades de mitigar sus efectos a corto y largo plazo. La zona del Círculo Polar Ártico resulta de gran interés para la comunidad científica, dado que contiene grandes cantidades de C en forma de metano, uno de los gases de efecto invernadero más importantes. Este metano se encuentra almacenado en aguas y suelos congelados, y su liberación a la atmósfera se ve afectada especialmente por el aumento de las temperaturas. En un escenario de calentamiento global, se prevé que las temperaturas del Ártico aumenten entre 2°C y 5°C para 2100. Otra fuente de metano muy importante es el producido por microorganismos como parte de su actividad metabólica. Estos microorganismos, del dominio Archaea, presentan gran sensibilidad a las variaciones de temperatura. En zonas frías como el Ártico estos microorganismos sobreviven en los fondos de los lagos o suelos congelados y en las etapas de deshielo emiten metano. El aumento de la temperatura global ocasionará que estos microorganismos estén más activos y aumenten las emisiones de metano.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del incremento de la temperatura en la producción de metano en muestras extraídas de lagos del Ártico

Se analizaron muestras de sedimentos de lagos, extraídas de 4 lagos en Alaska. Se realizaron ensayos en batch para evaluar la actividad metanogénica a cuatro temperaturas (5°C, 10°C, 15°C y 20°C).

Los resultados mostraron que con temperaturas superiores la producción de metano también es mayor, resultando en una retroalimentación positiva para el calentamiento global. La velocidad de

producción de metano se vió afectada por la temperatura; a 15°C y 20°C la producción de metano alcanzó valores más altos en un período de tiempo más corto que a 5°C y 10°C.

Palabras clave; arqueas metanogénicas; Ártico; calentamiento global; gases de efecto invernadero; metano.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El ambiente Ártico

La gran región del Ártico se extiende por el norte de América del Norte, el norte de Europa y el norte de Asia, abarcando un total de ocho países y las extensiones de mar y océano en el medio. Los ambientes terrestres, de agua dulce y marinos que conforman esta área exhiben una variación considerable en cuanto al clima, la meteorología y la geografía física. Esta región puede delimitarse según su clima o según los límites definidos por temperatura, vegetación o mar. En general se la define como la región dentro del Círculo Polar Ártico ($66^{\circ}32'N$) (Figura 1).

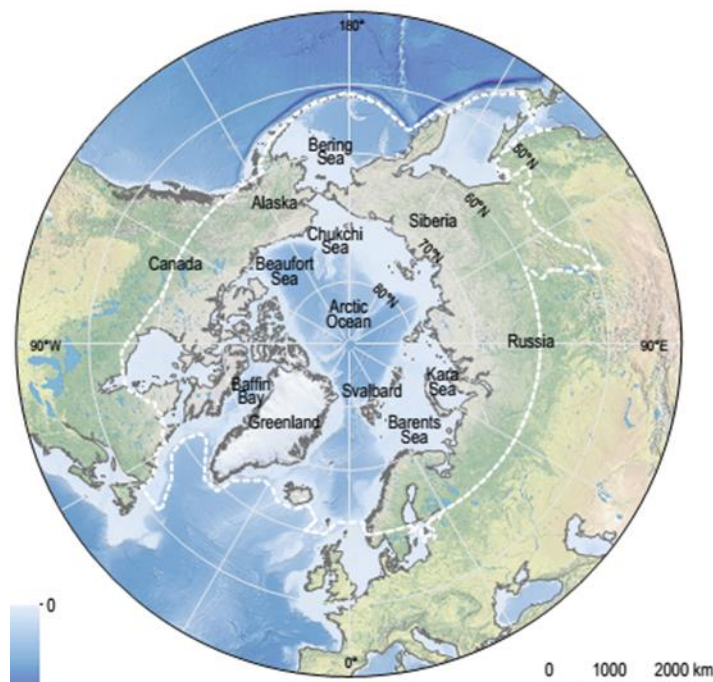


Fig.1 Región polar del Ártico y Océano Ártico. La línea blanca punteada refiere a la delimitación aproximada de la Región polar Ártica. Fuente: IPCC Special Report, Meredith et al., 2019.

1.1.1. Permafrost

El permafrost, es una mezcla de suelo, sedimento y rocas que se mantienen a 0°C o menos por al menos dos años. Su espesor puede variar de 1 hasta 1.000 metros. Actualmente, hay una atención significativa dedicada a los efectos del cambio climático en ambientes de permafrost, dado que esta formación tiene un rol crucial en el ciclo del carbono (NSIDC, 2017). El permafrost contiene hasta un 50% del reservorio de carbono orgánico de los suelos de entre 0 y 3 metros de profundidad a nivel global, del cual una parte significativa se podría liberar a la atmósfera dentro de los próximos 100 años debido al aumento global de temperatura. Ese reservorio de carbono es el resultado de la descomposición vegetal y animal acumulada en el suelo permanentemente congelado por miles de años. Se estima que las regiones de permafrost (norte y sur) contienen dos veces más carbono que la atmósfera actualmente (Schuur et al., 2015).

Uno de los ecosistemas presentes en esta región, la tundra, se caracteriza por la presencia de permafrost. La taiga, también llamada bosque boreal, es una zona de árboles perennes dispersos, y es el límite sur de la tundra ártica. Dependiendo de la zona, las temperaturas oscilan entre los -40°C en invierno y los 10°C en verano (AMAP, 1998).



Fig. 2 La zona de permafrost está presente en una larga porción del Ártico. En el mapa, zonas indicadas en color púrpura oscuro indican altos porcentajes de suelo permanentemente congelado; en púrpura más claro se indican zonas esporádicamente congeladas. Fuente: NSIDC, 2017

El permafrost consta de varias capas, que se definen en base al punto de congelación del agua (0°C) (Figura 3). La capa activa es la capa superior del suelo en un área de permafrost, sujeta a condiciones estacionales de congelación y descongelación. La capa que le sigue es la capa perenemente congelada, lo que sería el permafrost propiamente dicho. La capa más profunda, en la base del permafrost, se conoce como cryopeg, y tiene una temperatura inferior a 0°C pero el agua permanece sin congelar (Woo, 2012).

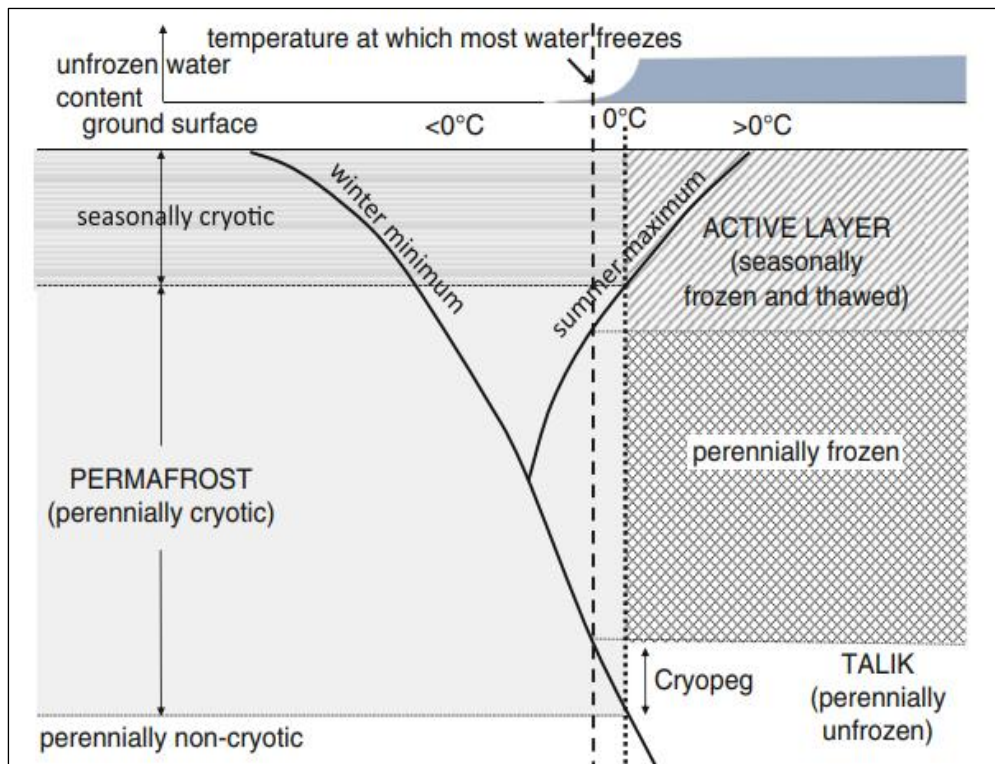


Fig. 3 Definición de permafrost y características asociadas. Fuente: Woo, 2012.

La mayor parte de los estudios proyectan que la temperatura promedio en el Ártico aumentará entre 2°C y 5°C para el año 2100 (Collins et al., 2013; van der Linden & Mitchell, 2009; Karl & Trenberth, 2003).

El Ártico contiene numerosos sistemas lénticos (“agua quieta”) extendiéndose desde los estanques superficiales de la tundra a los grandes lagos. Los cambios estacionales en el flujo, la cubierta de hielo, la precipitación/evapotranspiración y los aportes de sedimentos y nutrientes han sido identificados como factores relacionados con el clima, que controlan, en los lagos, su biodiversidad, su régimen de almacenamiento y su estado fuente/sumidero de carbono (en forma de CH₄). Un número significativo de registros paleolimnológicos de lagos en el Ártico circumpolar han demostrado cambios sincrónicos en la composición de la comunidad

biológica y parámetros sedimentológicos asociados con los cambios climáticos (Anisimov et al., 2007).

1.1.2. Calentamiento en el Ártico y consecuencias

En los sedimentos hay grandes cantidades de metano retenido en el permafrost, especialmente en las plataformas continentales Árticas. Cuando estas áreas se calientan este metano puede ser liberado, sumándose a la concentración de gases de efecto invernadero en la atmósfera (Denman et al., 2007; Walter Anthony et al., 2016; Knoblauch et al., 2018).

Se prevé que la descomposición de carbono en el Ártico aumente en condiciones climáticas más cálidas. El efecto que pueda tener el aumento en la tasa de descomposición del carbono sobre el forzamiento radiativo (alteración del equilibrio entre la energía que llega a la Tierra a través de la atmósfera y la cantidad de energía que se irradia desde el planeta) depende del equilibrio entre las cantidades de carbono emitidas como dióxido de carbono y metano. Algunos ecosistemas en el Ártico, incluidos los humedales, convierten parte del carbono que ha sido capturado fotosintéticamente de la atmósfera como dióxido de carbono a metano, que luego se libera como el producto de la descomposición orgánica del suelo. Debido a esto, incluso las áreas y los ecosistemas que funcionan como sumidero de carbono, como la tundra, pueden potenciar el forzamiento radiativo global si se emite una fracción suficiente de carbono como metano (Friborg et al., 2003; Rasilo et al., 2014; Elder et al., 2018).

El metano en los suelos del Ártico es producido por microorganismos (arqueas) en la zona anaeróbica de la capa activa (la capa superior del permafrost afectada por la descongelación estacional) debajo del nivel freático (nivel superior de la capa de agua). Luego se transporta a la

atmósfera por emisión de burbujas y difusión a través del agua, así como a través del sistema vascular de las plantas. Hasta el 80% del metano que se produce en la zona anaeróbica se oxida en la capa superior del suelo antes de que llegue a la atmósfera (Anisimov, 2007). En los humedales el nivel freático elevado favorece la producción de metano. Bajo las condiciones climáticas actuales, los humedales del norte, en promedio, actúan como sumideros netos de carbono, pero hay grandes fuentes de emisiones de metano, de materia orgánica que se deposita por debajo de la capa del permafrost que sufre descongelamiento estacional en el Ártico, que aunque actualmente no tiene mayor influencia en el ciclo del carbono, podría tenerla en el caso del clima más cálido (Anisimov, 2007).

Estimativas recientes sobre cambio climático predicen aumentos de hasta 9°C en la temperatura media del aire en el Ártico para el próximo siglo. Además del descongelamiento del permafrost y desprendimiento del carbono, este factor también influye en el calentamiento de aguas continentales y períodos más largos sin hielo (ice-free seasons) (Wik et al., 2016). Además del permafrost, los cuerpos de agua, como lagos y lagunas son también fuentes extensas de emisión de metano y se estima que las emisiones generadas por ellos se incrementarán entre 20–54% antes del fin del siglo, si los períodos de descongelamiento se extendieran por más tiempo (Wik et al., 2016).

En el Ártico, el aumento de las temperaturas tiene el potencial de aumentar la liberación de metano de fuentes naturales. Se sabe que hay depósitos muy grandes de metano y carbono orgánico en el fondo marino del Ártico, y en tierra en los suelos y sedimentos lacustres (AMAP, 2015). La descomposición del carbono en estos depósitos puede conducir a la emisión de dióxido de carbono o metano, dependiendo de las condiciones bajo las cuales se produce la descomposición, siendo la humedad y las condiciones anaerobias de esta zona las favorecedoras de la formación de metano. Estos depósitos están contenidos (total o parcialmente) por hielo,

suelo y sedimento congelados, y el intercambio aire-superficie está parcialmente mediado por la capa de hielo. Como el metano es un poderoso gas de efecto invernadero, y dado el tamaño de los yacimientos de carbono del Ártico, existe un potencial reconocido para las emisiones de metano climáticamente significativas del Ártico, lo que representaría una retroalimentación positiva y amplificadora para el sistema climático global (AMAP, 2015).

La llanura ártica de Alaska es un paisaje complejo de lagos, arroyos y humedales dispersos en la tundra de bajo relieve, con grandes extensiones de permafrost. Esta región del Ártico ha experimentado una tendencia al calentamiento en las últimas tres décadas (Pearce et al., 2012), lo que ha llevado a la descongelación del permafrost en tierra y la reducción del hielo marino a un ritmo sin precedentes. La pérdida de hielo marino ha aumentado la acción de las olas oceánicas, lo que lleva a mayores tasas de erosión e inundación de agua salada hacia los hábitats costeros. Las temperaturas de calentamiento también han influenciado la fenología general de la región, incluyendo el deshielo más temprano de las capas de nieve, el deshielo de los lagos y el crecimiento de las plantas. Como resultado, muchas especies migratorias ahora llegan al Ártico varios días antes en la primavera que en la década de 1970. Las tendencias de calentamiento previstas para el futuro continuarán alterando el crecimiento de las plantas, el deshielo y otros procesos básicos del paisaje. Estos cambios indudablemente darán como resultado diferentes respuestas por parte de la vida silvestre (peces, aves y mamíferos) y la comida de la que dependen (plantas, invertebrados y peces). Sin embargo, el tipo de respuesta de diferentes poblaciones de vida silvestre y sus hábitats sigue siendo en gran medida desconocido (Pearce et al., 2012).

1.2. Ciclo del Carbono en la naturaleza

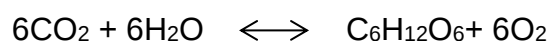
La biósfera contiene una mezcla compleja de compuestos de carbono en un estado continuo de generación, transformación y descomposición. Este estado dinámico se mantiene a través de las diferentes etapas del ciclo del carbono, involucrando organismos y microorganismos diversos en sistemas terrestres y acuáticos (Bolin, 1970).

El ciclo global del carbono puede verse como una serie de depósitos de carbono en el sistema terrestre, conectados por flujos de intercambio de carbono. Conceptualmente, se pueden distinguir dos dominios en el ciclo global del carbono. El primero es un dominio rápido con grandes flujos de intercambio y rotaciones de reservorios relativamente "rápidos", que consiste en carbono en la atmósfera, en el océano, en los sedimentos oceánicos superficiales, y en la tierra en la vegetación, los suelos y en cuerpos de agua dulce. Los tiempos de rotación de los reservorios (masa del reservorio de carbono dividida por el flujo de intercambio), van desde unos pocos años para la atmósfera hasta décadas o milenios para los principales reservorios de carbono de la vegetación terrestre y el suelo y los diversos dominios del océano. Un segundo dominio lento consiste en las enormes reservas de carbono en rocas y sedimentos que intercambian carbono con el dominio rápido a través de emisiones volcánicas de CO_2 , meteorización química (la eliminación gradual de CO_2 atmosférico mediante la disolución de rocas de silicato y carbonato), erosión y formación de sedimentos en el fondo del mar (IPCC, 2013).

En el ciclo de carbono los depósitos inorgánicos consisten en carbono en su estado oxidado como CO_2 gaseoso, en la atmósfera y disuelto en el agua, y HCO_3^- y CO_3^{2-} , principalmente disuelto en aguas superficiales y marinas, y como minerales carbonatados en rocas, suelos y sedimentos. Las reservas orgánicas comprenden carbono en estados reducidos confinado principalmente en la biomasa de organismos vivos, en

materia orgánica sedimentaria antigua enterrada profundamente (carbón, entre otros) y en materia orgánica recientemente muerta disuelta o suspendida en aguas superficiales y océanos y en sedimentos superficiales. Una fuente importante de dióxido de carbono atmosférico es la respiración, junto con la combustión y la descomposición de materia orgánica. A su vez, un sumidero importante del mismo es la fotosíntesis (Bashkin, 2003).

En la Figura 4 se representa esquemáticamente el ciclo del carbono, diferenciando procesos que ocurren en anaerobiosis de los que se dan en presencia de oxígeno. En el mundo previo a la industrialización, se presume que la absorción de dióxido de carbono de la atmósfera a través de la fotosíntesis estuvo más o menos en equilibrio con la liberación de dióxido de carbono a través de la respiración. En condiciones aeróbicas, considerando la glucosa como ejemplo de materia orgánica, este estado “estacionario” sería el siguiente:



De izquierda a derecha (con el aporte de energía solar) ocurre la fotosíntesis, en sentido inverso, la respiración. En la fotosíntesis oxigénica, los organismos fotosintéticos absorben la energía del sol y la utilizan para escindir el agua. El hidrógeno del agua es el poder reductor para convertir el CO_2 en glucosa. El oxígeno se escapa a la atmósfera como subproducto (Grace, 2013).

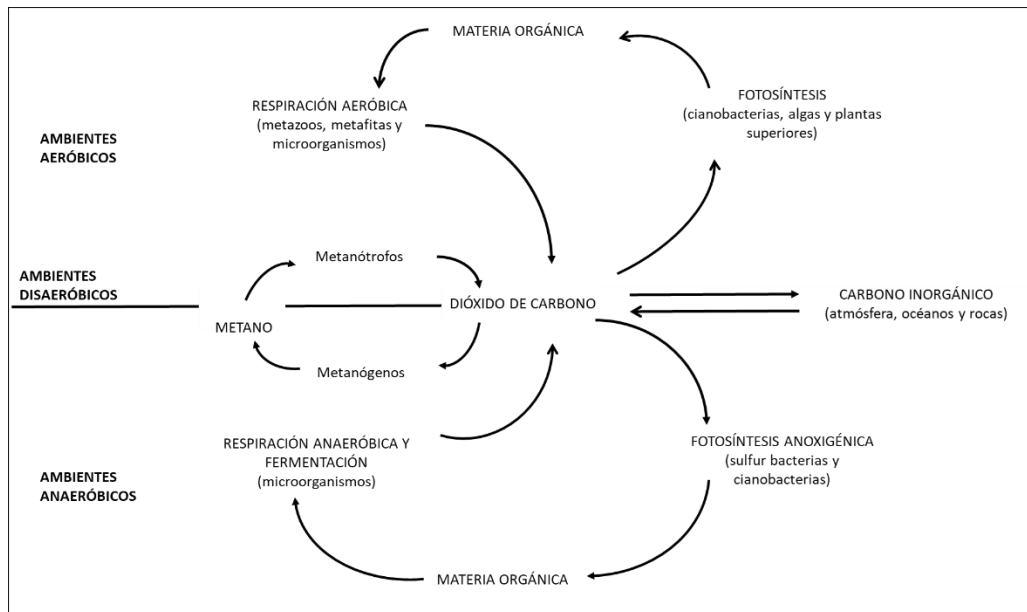


Fig. 4 Representación esquemática del ciclo de carbono, diferenciando los procesos que ocurren en aerobiosis y anaerobiosis. Fuente: Bashkin, 2003.

1.2.1. Producción de metano por microorganismos

El metano se produce como último producto de la degradación de la materia orgánica en condiciones anaerobias. La cadena de degradación anaeróbica consiste en una serie de procesos metabólicos que ocurren en ausencia de oxígeno molecular y de aceptores externos de electrones como NO_3^- , Fe^{3+} y SO_4^{2-} , y depende de la actividad de al menos tres grupos distintos de microorganismos para promover la fermentación de la materia orgánica, que resulta finalmente en metano y dióxido de carbono (ver Figura 5). Estos grupos de microorganismos incluyen bacterias acidogénicas, bacterias acetogénicas y arqueas metanogénicas (Moraes et al., 2015).

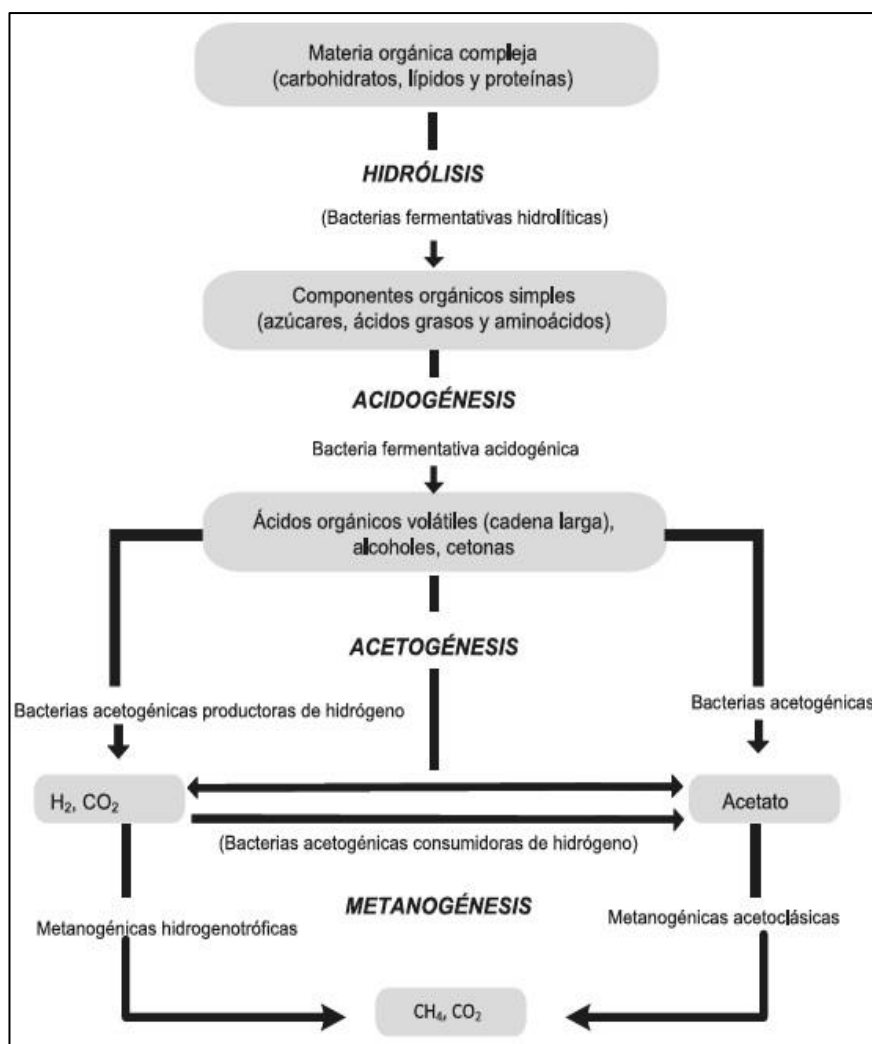


Fig. 5 Esquema de la cadena de degradación anaeróbica de materia orgánica. Fuente: Moraes et al., 2015.

1.2.2. Desbalance del ciclo del carbono y emisiones de gases de efecto invernadero

El ciclo del carbono se ha visto perturbado por las actividades humanas. Desde la Revolución Industrial (1760-1830), el uso generalizado de combustibles fósiles, como el carbón, el petróleo y el gas, ha provocado un aumento sustancial de la concentración de CO_2 en la atmósfera. Además, el carbono de la biomasa se devuelve a la atmósfera como CO_2

cuando se talan bosques y se reemplazan por agricultura. En la actualidad, existe una comprensión generalizada entre los gobiernos nacionales y entre los científicos de que estas emisiones antropogénicas de CO₂ y otros gases están aumentando el efecto invernadero y provocando el calentamiento global. Al mismo tiempo, se ha descubierto que la superficie terrestre y el océano absorben una fracción sustancial de las emisiones de combustibles fósiles. Sin embargo, estos son sumideros inciertos y es posible que su absorción de CO₂ no persista por mucho más tiempo (Grace, 2013).

Los gases de efecto invernadero (GHG por su sigla en inglés) son componentes gaseosos de la atmósfera, de origen tanto natural como antropogénico, que absorben radiación en longitudes de onda específicas dentro del espectro de radiación terrestre, y que luego es emitida por la superficie de la Tierra, la atmósfera misma y las nubes. Esta propiedad es la responsable del efecto invernadero. El vapor de agua, el dióxido de carbono, el óxido nitroso, el metano y el ozono son los principales gases de efecto invernadero en la atmósfera terrestre. Las propiedades radiativas de la atmósfera están fuertemente influenciadas por la abundancia de gases de efecto invernadero, principalmente dióxido de carbono, metano y óxido nitroso. Los GHG y gases no GHG como el N₂ bien mezclados representan la fase gaseosa de los ciclos biogeoquímicos globales, que controlan los complejos flujos y transformaciones de los elementos entre los diferentes componentes del sistema terrestre (atmósfera, océano, tierra, litosfera) mediante procesos bióticos y abióticos. Dado que la mayoría de estos procesos dependen del ambiente predominante, los cambios en el clima y los impactos humanos en los ecosistemas (por ejemplo, el uso de la tierra y el cambio de uso de la tierra) también modifican las concentraciones atmosféricas de CO₂, CH₄ y N₂O. Durante los ciclos glacial-interglaciares, en ausencia de impactos humanos directos significativos, las grandes variaciones climáticas también afectaron la concentración de CO₂, CH₄ y

N₂O y viceversa. En los períodos siguientes hasta la actualidad, la situación resultó bastante diferente debido al predominio de las emisiones antropogénicas que afectan los ciclos biogeoquímicos globales y, a su vez, el cambio climático, con lo que los ciclos biogeoquímicos constituyen retroalimentaciones en el sistema terrestre (IPCC, 2013).

1.3. Intercambio de metano

El intercambio de metano entre el suelo y la atmósfera es regulado por la actividad de dos grupos de microorganismos, los metanogénicos y los metanotróficos (Figura 6).

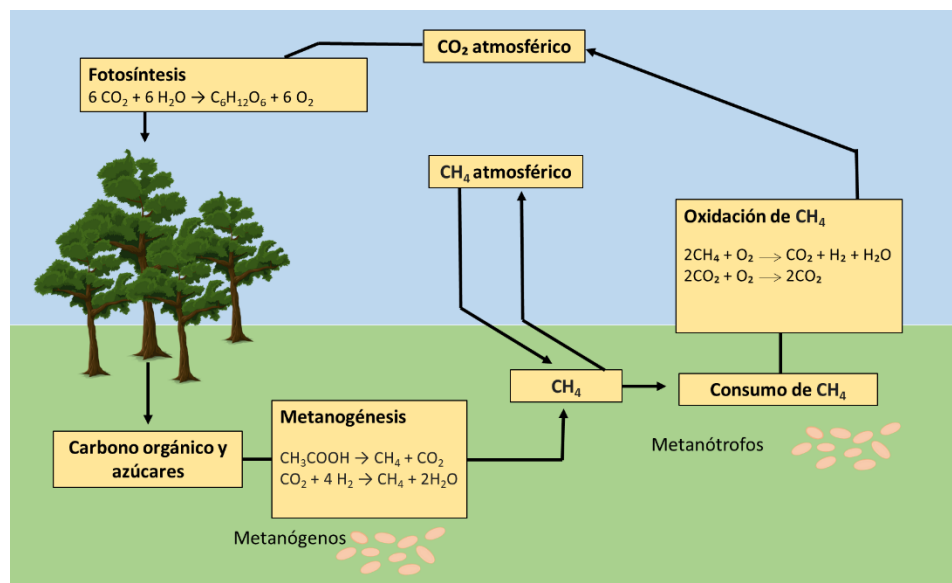


Fig. 6 Emisiones globales de CH₄, involucrando arqueas metanogénicas y bacterias metanotróficas. Fuente: adaptado de Singh et al., 2010.

El flujo de metano de un ecosistema dado, está determinado por los requerimientos ambientales dispares de estos organismos (concentración de oxígeno, temperatura, contenido de agua, y disponibilidad de nutrientes). Las arqueas metanogénicas (productoras de metano), están

activas en condiciones anaeróbicas, producen metano como un producto de su metabolismo, siendo la principal fuente de metano en sistemas naturales, vertederos y sistemas agrícola-ganaderos. Las bacterias metanotróficas (consumidoras de metano) están activas principalmente en condiciones aeróbicas, mediante la oxidación de metano producen CO₂ (Aronson et al., 2013.). Las bacterias metanotróficas sirven como amortiguadores cruciales para las enormes cantidades de metano producidas en algunos de estos ambientes (Singh et al., 2010).

1.3.1. Metanotrofía

Las bacterias metanotróficas, o metanótrofos, son un subconjunto fisiológicamente distinto de un grupo de bacterias conocidas como metilótrofos. Los metanótrofos son únicos en su capacidad para utilizar el metano como única fuente de carbono y energía. Las bacterias metilotróficas son aquellas bacterias aeróbicas que utilizan compuestos de un carbono (metano, metanol, aminas metiladas, halometanos y compuestos metilados que contienen azufre) más reducidos que el ácido fórmico como fuentes de carbono y energía y asimilan el formaldehído como una fuente principal de carbono celular. Una característica definitoria de los metanótrofos es el uso de enzimas específicas, como la metano monooxigenasa, para catalizar la oxidación de metano a metanol (Hanson & Hanson, 1996).

El grupo más conocido de consumidores de metano son los metanótrofos aeróbicos (methane oxidizing bacteria - MOB). Estas bacterias se encuentran generalmente en ambientes óxicos o en micrositios dentro de ambientes anóxicos. Las MOB son el único sumidero biológico de metano conocido, siendo organismos clave en comunidades microbianas que procesan metano (Aronson et al., 2013).

Las bacterias metanotróficas poseen una enzima, la metano monooxigenasa (MMO), que les permite crecer con el metano como única fuente de carbono. Es la primera de las cuatro enzimas requeridas para la transformación de metano a CO₂ y existe en dos formas; soluble (sMMO) o particulada asociada a membrana (pMMO). La mayoría de los metanótrofos poseen ambas formas, aunque ciertas especies carecen de la forma soluble (Tabla 1). La pMMO convierte el metano en metanol utilizando oxígeno molecular como co-sustrato (Cohen, 2014).

Los metanótrofos se dividen en al menos dos grupos funcionalmente distintos (Reay et al., 2005); i) el grupo de alta afinidad que usa metano en concentraciones muy bajas y ii) el grupo de baja afinidad que solo usa metano en concentraciones altas. La mayoría de los metanótrofos cultivables son reportados como de baja afinidad, tendiendo a ubicarse en torno a fuentes de metano. Ambos grupos son muy importantes para el balance global de metano en el ciclo de carbono. Los metanótrofos de alta afinidad son responsables de la captación directa de metano atmosférico, y los metanótrofos de baja afinidad eliminan gran parte del metano producido en las áreas de origen, antes de que pueda alcanzar la atmósfera (Reay et al., 2005).

Tabla 1 Características de grupos taxonómicos de bacterias metanotróficas. Fuente: Semrau et al., 2010.

Familia	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylocystaceae</i>	<i>Beijerinckaceae</i>	<i>Methylococcaceae</i>
Género	<i>Methylobacter</i> , <i>Methylococcus</i> , <i>Methylocaldum</i> , <i>Methylohalobius</i> , <i>Methylomicrobium</i> , <i>Methylomonas</i> ,	<i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i>	<i>Methylocapsa</i> , <i>Methylocella</i>	<i>Methylococcoides</i>

	<i>Methylosoma,</i> <i>Methylosarcina,</i> <i>Methylosphaera,</i> <i>Methylothermus,</i> <i>Crenothrix,</i> <i>Clonothrix</i>			
Rubisco	Raramente	-	-	+
sMMO	+ 0 -	+ 0 -	+ 0 -	-
pMMO	+	+	+ 0 -	+
Fijación de Nitrógeno	+ 0 -	+ 0 -	+	+ 0 -
Formación de membrana intra citoplasmática	Haces de disco perpendiculares a la superficie	Pilas de membrana paralelas a la periferia celular	<i>Methylocapsa</i> : vesículas de membrana paralelas al eje largo en un lado de la membrana celular. <i>Methylocella</i> : invaginaciones citoplasmáticas de membrana	-
Fases latentes	Varía: quistes o ninguna	Varía: quistes, esporas o ninguna	Quistes o esporas	Ninguna
G+Cmol%	43-65	62-67	60-63	41-46
Facultativo	-	-	+ 0 -	-

Aunque lo más común son los metanótrofos aerobios, también existen metanótrofos capaces de oxidar el metano en condiciones anóxicas

(Cohen, 2014). Esto ocurre en consorcios de microorganismos formados por bacterias (en su gran mayoría) y arqueas. Hay dos mecanismos por los que este proceso se puede dar. Uno es dependiente de nitrato, en la interfaz óxica-anóxica, y el otro se acopla a la reducción de sulfato. La oxidación anaeróbica de metano es muy importante para controlar el flujo de metano en ambientes anóxicos (Cohen, 2014).

La temperatura y otras condiciones ambientales, como las concentraciones de CH₄ y O₂, pH y estrés de nitrógeno afectan la estructura y la actividad de la comunidad metanotrófica. La temperatura además influye en la actividad enzimática de los metanótrofos (He et al., 2012).

1.3.2. Metanogénesis

El metano es el producto final de la descomposición microbiológica de materia orgánica, en ambientes anaeróbicos como sedimentos de lagos, la capa anóxica de suelos y el tracto intestinal de animales (Thauer, 1998; Bodelier & Steenbergh, 2014; Malyan et al., 2016).

En sedimentos de lagos, material de origen vegetal, como la glucosa derivada de la celulosa, se descompone completamente a CO₂ y CH₄:



Esta reacción es catalizada por asociaciones de microorganismos incluyendo relaciones sintróficas. Primero ocurre la fermentación de glucosa, que proporciona, entre otros, los compuestos necesarios para la metanogénesis: acetato, CO₂ e H₂, o acetato, formato e H₂, llevada a cabo por microorganismos anaerobios fermentativos y sintróficos obligados. En un segundo paso, los productos de la fermentación de glucosa son

convertidos en metano. Los organismos que median la generación de metano son las arqueas metanogénicas, microorganismos altamente especializados que utilizan acetato, CO_2 e H_2 o compuestos metilados como sustrato (Thauer, 1998; Bodelier & Steenbergh, 2014; Malyan et al., 2016).

Las tres vías principales para la producción de metano, según se muestra en la Figura 7, son: (i) reducción de CO_2 (hidrogenotrófica), (ii) acetoclástica y (iii) metanogénesis metilotrófica. El último paso en la metanogénesis, la reducción de la metilcoenzima M a CH_4 realizada por la metilcoenzima M reductasa (Mcr) y la formación de la coenzima M-coenzima B heterodisulfuro (CoM-SS-CoB), está conservada en las tres vías (Söllinger & Urich, 2019).

(i) La reducción de CO_2 a CH_4 también se llama metanogénesis hidrogenotrófica, ya que el hidrógeno (H_2) es el donante de electrones predominante. Alternativamente, el formiato y, más raramente, los alcoholes secundarios, el etanol y el monóxido de carbono también se usan como donantes de electrones. La metanogénesis hidrogenotrófica es la vía de metanogénesis más común dentro de las arqueas metanogénicas conocidas hasta el momento. Ocurre en seis de los ocho órdenes de arqueas metanogénicos descritos: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales* y *Methanocellales* (Söllinger & Urich, 2019).

(ii) En la metanogénesis acetoclástica, el acetato ($\text{CH}_3\text{-COO}^-$) se divide y el grupo carboxilo se oxida a CO_2 mientras que el grupo metilo se reduce a CH_4 . La metanogénesis acetoclástica es la vía de metanogénesis menos común y solo está presente dentro del orden *Methanosarcinales*. Sin embargo, la metanogénesis acetoclástica representa aproximadamente dos tercios de la producción global de CH_4 biogénico (Söllinger & Urich, 2019; Le Mer & Roger, 2001).

(iii) En la metanogénesis metilotrónica, los grupos metilo de compuestos metilados como metanol, metilaminas y sulfuros metilados se transfieren a proteínas corrinoides específicas del sustrato y luego a CoM para finalmente reducirse a CH₄. En los metanógenos metilotrónicos descritos (principalmente del orden Methanosarcinales), los electrones necesarios para la reducción de los grupos metilo se obtienen mediante la oxidación de grupos metilo adicionales a CO₂, con la excepción de *Methanomicrococcus blatticola* (Methanosarcinales) y el género *Methanosphaera* (Methanobacteriales), que son metanógenos metilotrónicos que emplean H₂ externo como donante de electrones. Los metanógenos metilotrónicos son los principales contribuyentes a la producción de CH₄ en sedimentos marinos donde los metanógenos hidrogenotróficos y acetoclásticos son superados por las bacterias reductoras de sulfato (Söllinger & Ulrich, 2019).

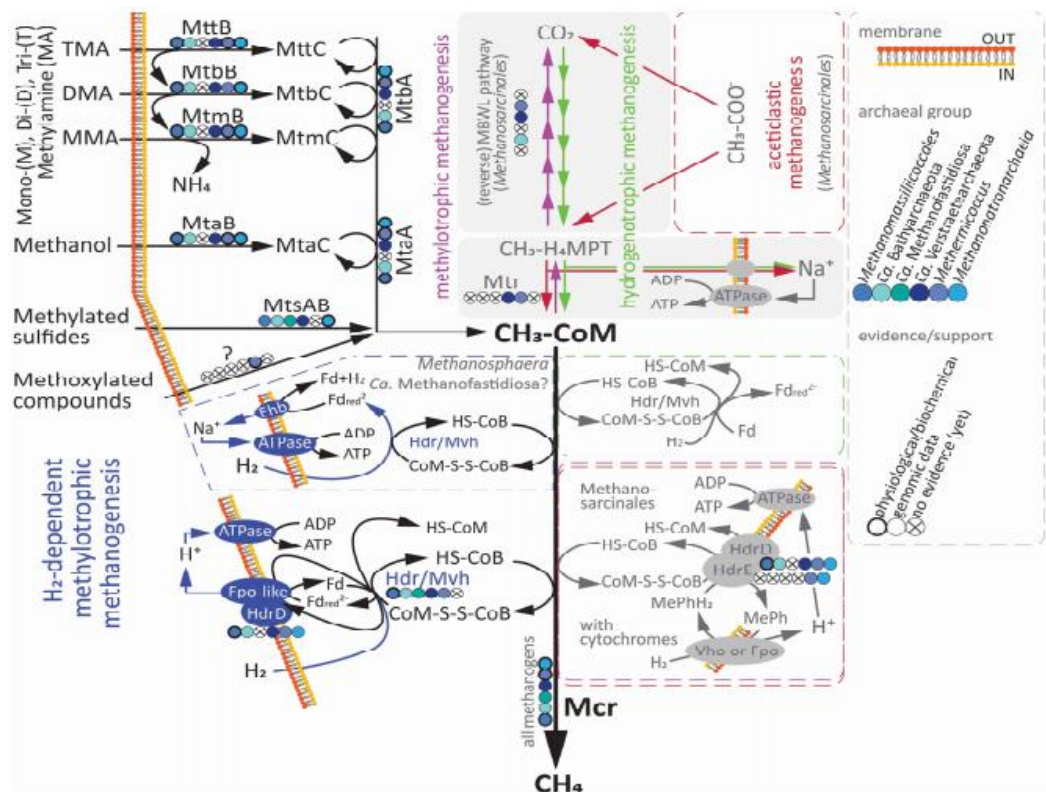


Fig. 7 Esquema de las tres vías metanogénicas partiendo de CO₂/H₂, acetato y metanol. Fuente: Söllinger & Ulrich, 2019.

La mayor parte del metano atmosférico se origina por metanogénesis microbiana, a cargo de arqueas metanogénicas. Esto ocurre típicamente en sitios donde la materia orgánica se descompone en condiciones anóxicas, y en ausencia de otros oxidantes como nitrato o sulfato (Conrad, 2009).

1.3.2.1. Factores que influyen en la metanogénesis

Las tasas de producción de metano se ven afectadas por varios factores, algunos impactan directamente a los metanógenos y otros indirectamente, al afectar la estructura de la comunidad microbiana circundante. Uno de estos factores es el oxígeno, que en una concentración por encima de 10 ppm inhibe completamente a los metanógenos, porque varias enzimas y cofactores involucrados en su metabolismo son sensibles al oxígeno. En condiciones anóxicas también va a influir en la producción de metano la disponibilidad de aceptores de electrones alternativos como NO_3^- , Fe^{3+} y SO_4^{2-} , importantes para la respiración anaeróbica de otros grupos metabólicos, que van a competir con los metanógenos por el acetato y el H_2 (Borrel et al., 2011).

Un factor que impacta de forma importante en la producción y liberación de metano a la atmósfera es la temperatura. En climas más fríos los metanógenos no están en sus temperaturas óptimas (Borrel et al., 2011), siendo el verano la temporada en la que hay mayor ocurrencia de emisiones de metano. Los cambios de temperatura tienen un gran efecto en la producción de metano, afectando no solamente las emisiones de metano sino también la dinámica del ciclo de carbono. Las consecuencias de las variaciones en la temperatura también se ven afectadas por otras variables, como la disponibilidad de materia orgánica y el tipo de hábitat (Schulz et al., 1997; Borrel et al., 2011; Greene et al., 2014; Rasilo et al., 2014; Sepulveda-Jauregui et al., 2015).

Respecto a producción de metano en suelos, hay otros factores que afectan el proceso, como son el tipo de suelo y su capacidad de retención de agua, así como la pendiente, características que afectan indirectamente en la metanogénesis por determinar la humedad y la presencia o no de oxígeno del suelo. El pH es también un factor importante, afectando al proceso de metanogénesis según sean las preferencias de los microorganismos presentes en el medio (Aronson et al., 2013).

Los microorganismos metanogénicos tienen un rango limitado de sustratos, por lo que dependen de bacterias fermentadoras que convierten una amplia variedad de compuestos orgánicos en sustratos para la metanogénesis. Por esta razón, factores que limitan el metabolismo de bacterias fermentadoras limitarán indirectamente la metanogénesis (Whitman et al., 2014). Dos de estos factores, que afectan tanto a bacterias fermentadoras como a metanogénicas, son la materia orgánica y el pH. Hábitats ricos en materia orgánica y con pH más bien cercano a 7 son los ideales para la producción de metano. La disponibilidad de materia orgánica es también importante, y es uno de los factores que se ha visto que aumenta la potencial emisión de metano a la atmósfera, dado que en zonas de muy bajas temperaturas, donde hay mucha materia orgánica retenida en suelos o sedimentos congelados, el deshielo deja a disposición de los microorganismos metanogénicos grandes cantidades de materia orgánica, potenciando la metanogénesis (Zandt et al., 2020).

La metanogénesis puede estar limitada en cualquier eslabón en la cadena de reacciones que comienza con el suministro del producto de descomposición de organismos fermentadores. La falta de producción de CH_4 en presencia de O_2 puede deberse a una combinación de factores, de los cuales la toxicidad del oxígeno es solo uno. Los productos oxidados de la desnitrificación, NO y N_2O , tienen un efecto tóxico sobre los metanógenos similar al del O_2 (Megonigal et al., 2005)

La cantidad y calidad (es decir, la composición química) de los compuestos de carbono orgánico es una variable maestra que regula la metanogénesis. La fermentación de carbono orgánico es la fuente última tanto de los donantes de electrones como de los aceptores de electrones requeridos por las dos principales vías metanogénicas. Existen fuentes inorgánicas de CO_2 , pero este sustrato es abundante en comparación con el H_2 y no limita la metanogénesis hidrogenotrófica. El carbono orgánico también ejerce una fuerte influencia sobre otro regulador clave de la metanogénesis, el suministro de compuestos inorgánicos que son tóxicos para los metanógenos (O_2 , NO_3^-) o más favorables energéticamente como aceptores de electrones para organismos competidores (NO_3^- , Fe (III) , ácidos húmicos, SO_4^{2-}). La metanogénesis es más vigorosa cuando la tasa de consumo de aceptores de electrones alternativos excede su tasa de suministro. Debido a que los organismos que consumen estos sustratos alternativos son heterótrofos y generalmente limitados por carbono, es más probable que tales condiciones se desarrollen en sistemas con un alto suministro de compuestos orgánicos lábiles de carbono (Meronigal et al., 2005).

1.3.2.2. Actividad metanogénica en ambientes fríos

La mayor parte de la biosfera de la Tierra está expuesta a temperaturas inferiores a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante todo el año. Los ecosistemas fríos son muy diversos y van desde montañas hasta océanos profundos, la región polar y las cuevas subterráneas. Incluyen ecosistemas acuáticos y terrestres, como el mar (el 90% del volumen del océano se encuentra a una temperatura inferior a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$), el hielo marino, el hielo de lagos, la nieve y los entornos glaciares, los lagos de agua fría, el permafrost, los suelos fríos y los desiertos fríos, e incluso la atmósfera y las nubes. Incluso los ambientes más fríos y helados albergan poblaciones microbianas diversas y metabólicamente activas (Margesin & Collins, 2019). Los microorganismos

en hábitats fríos (psicrófilos, picrótrofos) enfrentan una serie de desafíos y, a menudo, muestran múltiples adaptaciones a las bajas temperaturas. Además de las bajas temperaturas, en las que los procesos físicos y biológicos se ralentizan, también pueden tener que hacer frente a condiciones de bajos nutrientes, alta salinidad, sequedad y baja actividad del agua, o incluso alta irradiación UV y estrés oxidativo en altitudes elevadas y alta presión en las profundidades del mar (Margesin & Collins, 2019).

La capacidad de ciertos psicrófilos para crecer a temperaturas más altas podría ser ecológicamente relevante. Por ejemplo, los microorganismos presentes en el permafrost están sujetos a ciclos estacionales de temperatura de congelación y descongelación que varían de -45°C a 25°C . A pesar de las aparentes condiciones extremas e inadecuadas para el crecimiento, una gran cantidad de metano se acumula durante el invierno en la tundra helada y se libera a la atmósfera durante el deshielo de verano, lo que sugiere que los metanógenos pueden desarrollarse en condiciones de congelación y también pueden sobrevivir a temperaturas elevadas en verano. Los metanógenos son ubicuos en humedales, sedimentos de agua dulce, vertederos, biorreactores anaeróbicos, permafrost y en las capas de hielo basal de los glaciares. El permafrost cubre más del 25% de la superficie terrestre, y se ha estimado que los metanógenos en el permafrost contribuyen con $\sim 25\%$ de la liberación de metano de fuentes naturales. A pesar de la imposición de la temperatura sobre un metanógeno individual, la metanogénesis y las principales vías energéticas y biosintéticas no están restringidas por la temperatura de crecimiento; es decir, la adaptación al frío (o al calor) no necesariamente requiere el desarrollo de nuevas vías y procesos celulares (Cavicchioli, 2006).

La producción de metano en los suelos ricos en carbono de la tundra ártica tiene lugar como resultado de la actividad metabólica microbiana.

Como tal, la metanogénesis en estos suelos (“turberas”) es un proceso anaeróbico obligado que tiene lugar dentro de las capas anóxicas más profundas del suelo, generalmente por debajo del nivel freático. La producción de metano a estas profundidades crea gradientes de concentración que conducen a la difusión ascendente del metano a través del suelo a la superficie (Howard et al., 2020).

En las turberas con características de permafrost, las aguas contienen altas concentraciones de materia orgánica coloreada disuelta derivada del suelo descongelado. Por lo tanto, los lagos son muy coloreados y absorben la radiación solar durante el período de aguas abiertas en verano, lo que lleva a una estratificación térmica y aguas anóxicas al fondo. Estas condiciones anóxicas favorecen el metabolismo y el desarrollo de microorganismos anaeróbicos, tal como la degradación de la materia orgánica por microorganismos metanogénicos. Específicamente, las condiciones anaeróbicas en el agua, la acidificación por los musgos acuáticos y las bajas temperaturas reducen la velocidad de descomposición de la materia orgánica, lo que resulta en una producción primaria que excede la descomposición de la materia orgánica y conduce a la acumulación y sedimentación sustancial de turba o materia orgánica descompuesta de manera incompleta. Un subproducto de este proceso es la generación de sustratos para bacterias anaeróbicas y metanógenos, cuyo metabolismo conduce a la liberación de metano a la atmósfera (Vigneron et al., 2019).

La descongelación del permafrost da como resultado la entrada de elementos biogénicos enterrados como compuestos orgánicos y minerales en los ecosistemas de agua dulce, donde se concentran y quedan disponibles para su removilización. Los ecosistemas de agua dulce del Ártico ocupan ~ 16% del área de permafrost e incluyen lagos de origen diverso (tectónico, glacial, llanura aluvial y termokarst). Los lagos termokársticos constituyen una parte importante del sistema de agua dulce

del Ártico y son responsables de las características específicas de la tundra y sus paisajes. Están muy extendidos en Siberia, Alaska, Canadá y el norte de Escandinavia. Estos lagos se forman como resultado del proceso de termokarst, el deshielo del permafrost que provoca el desarrollo de depresiones de la tierra que en áreas planas se llenan de agua en el caso de un balance hídrico positivo. Las comunidades microbianas complejas que se desarrollan en estos lagos están adaptadas a la exposición prolongada a bajas temperaturas y varían en sus tasas de metabolismo aeróbico y anaeróbico según la composición de los sedimentos del fondo, el contenido y la composición cualitativa de materia orgánica, minerales e iones disueltos y en suspensión, así como sobre las propiedades limnológicas e hidroquímicas del lago. Los lagos termokársticos se encuentran entre las fuentes más importantes de metano, son responsables por el ~ 25% de las emisiones anuales de metano de los ecosistemas de agua dulce del norte. La descongelación del permafrost da como resultado cambios en el componente metanogénico predominante dentro de la comunidad, y la metanogénesis cambia de la vía hidrogenotrófica a la acetoclástica. En respuesta al deshielo del permafrost, la cantidad de metanógenos activos aumenta drásticamente, lo que resulta en una mayor emisión de metano (Kallistova et al., 2019).

Los lagos y estanques termokársticos han aumentado en tamaño y número durante las últimas tres décadas en respuesta al rápido calentamiento (Crevecoeur et al., 2016). Las aguas del fondo de los estanques de deshielo subárticos son generalmente hipóxicas y algunas veces anóxicas durante el verano, lo que proporciona las condiciones para la actividad metanogénica. Además, la anoxia prolongada ocurre en toda la columna de agua durante el invierno, cuando los estanques están cubiertos de hielo. Eventos de mezcla episódica ocurren especialmente durante el otoño antes de la congelación, también en primavera y ocasionalmente durante el verano. Es probable que estos eventos de mezcla aceleren la

ventilación de CH_4 a la atmósfera y oxigenen la columna de agua, lo que interrumpiría las condiciones redox que conducen a la metanogénesis anaeróbica. Los sustratos disponibles para los metanógenos en los estanques de deshielo pueden variar según las características del paisaje de la cuenca circundante. La extensión del deshielo y la erosión asociada del permafrost influirán en la cantidad de materia orgánica alóctona, mientras que las propiedades del suelo influirán en la naturaleza y labilidad de la materia orgánica. Es probable que los suelos de palsa erosionados y ricos en carbono liberen grandes cantidades de materia orgánica, algunas de las cuales pueden descomponerse biológica o fotoquímicamente en sustratos que podrían estimular la actividad microbiana, incluida la metanogénesis de las arqueas (Crevecoeur et al., 2016).

1.3.2.3. Métodos para evaluar la actividad metanogénica

La tasa de producción de metano es un parámetro importante que aporta información sobre todo el proceso anaeróbico y se utiliza a menudo para cuantificar o caracterizar procesos de digestión anaeróbica, como el tratamiento de aguas residuales o la remediación del suelo, o, para evaluar procesos anaeróbicos en entornos naturales como suelos, turberas o ecosistemas acuáticos. Los métodos de determinar la actividad metanogénica generalmente se basan en uno de estos tres: (i) la recuperación y medición del volumen de biogás producido, combinado con la determinación del contenido de CH_4 del biogás, (ii) la medición del CH_4 producido en viales cerrados por cromatografía de gases (GC) o (iii) la medición del aumento de presión en viales cerrados, combinado con la determinación del contenido de CH_4 del biogás. Estos métodos se utilizan en gran medida en innumerables aplicaciones y brindan resultados confiables. Los métodos basados en la recuperación y medición del volumen de biogás producido requieren un dispositivo de medición para

cada prueba de actividad metanogénica y se limitan a la medición de actividades metanogénicas relativamente altas, por lo que se utiliza en casos en que se produzcan grandes volúmenes de gas. Los métodos basados en la cromatografía de gases son muy sensibles pero requieren mucho tiempo, lo que limita el número de viales de prueba que se pueden procesar juntos. Los métodos basados en la presión pueden aplicarse a un gran número de muestras, pero requieren la cuantificación del contenido de CH₄ del biogás producido y están limitados a actividades metanogénicas relativamente altas, aunque se han desarrollado sensores de presión de alta sensibilidad. Los métodos basados en presión también tienen un interés limitado para las pruebas de actividades metanogénicas hidrogenotróficas (Martínez-Cruz et al., 2012).

Para la evaluación de la actividad metanogénica con fines ecológicos, la técnica mayormente utilizada es la de medición del CH₄ producido en viales cerrados por cromatografía de gases. Previamente se realizan incubaciones en anaerobiosis, con condiciones variables según el objetivo de la investigación y el tipo de muestra utilizada. En caso de que la evaluación se centre en los efectos de la temperatura en la producción de metano, se realizan incubaciones a diferentes temperaturas. El agregado o no de sustratos específicos también dependerá de los fines de la investigación, la utilización de diferentes sustratos implica la posterior evaluación de los efectos de la temperatura en los diferentes tipos de metanogénesis (Jong et al., 2018; Liu et al., 2018). El no agregado de sustratos intenta imitar las condiciones *in situ* de las muestras extraídas (Barbier et al., 2012). Las muestras de turberas o suelos de humedales, se incuban en viales o en cámaras de crecimiento con sistema de irrigación de agua (para evaluar el efecto de la humedad/disponibilidad de agua del suelo) (Bohdalkova et al., 2014; Høj et al., 2008). En muestras de suelo y de sedimentos de lagos se utilizan incubaciones en viales, con medios adaptados al tipo de muestra y tipo de metanogénesis que se quiera o no

favorecer (Jong et al., 2018; Liu et al., 2018; Matheus Carnevali et al., 2015; Marotta et al 2014; Lofton et al., 2014; Barbier et al., 2012; Duc et al., 2010; Ganzert et al 2007).

Los cálculos de acumulación de metano pueden basarse en la concentración de la fase gaseosa, si se considera que la concentración de metano disuelto en la fase líquida es casi nula (Høj et al., 2018; Barbier et al., 2012); o tomando en cuenta la sumatoria de la concentración del gas disuelto en fase líquida, calculadas a partir del coeficiente de solubilidad y la Ley de Henry, y su concentración en fase gaseosa (Jong et al., 2018; Lofton et al., 2014). Las tasas de producción de metano se pueden determinar por regresiones lineales de acumulación de CH₄ vs tiempo (Jong et al., 2018; Matheus Carnevali et al., 2015; Marotta et al., 2014; Lofton et al., 2014; Barbier et al., 2012).

1.3.3. Microorganismos metanogénicos

Los microorganismos metanogénicos son un grupo diverso con tres características generales: son miembros del dominio Archaea, son anaerobios estrictos, y generan grandes cantidades de metano como principal producto de su metabolismo energético, siendo la metanogénesis su único mecanismo para obtener energía para su crecimiento (productores de metano obligados). Son parte del phylum Euryarchaeota, y se clasifican dentro de varias clases: *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanomicrobia* y *Methanopyri* (Whitman et al., 2014).

Estos microorganismos son abundantes en hábitats donde los aceptores de electrones como O₂, NO₃⁻, Fe³⁺ y SO₄²⁻ son limitantes, tales como los digestores anaeróbicos, los sedimentos anóxicos, los suelos inundados y los tractos gastrointestinales. Generalmente no están presentes en la columna de agua de ríos y lagos no estratificados, porque las corrientes de convección oxigenan el agua, impidiendo su desarrollo

(Whitman et al., 2014). En lagos estratificados la difusión de O₂ entre sus capas es demasiado lenta, sumado a que la estructura física de los sedimentos dificulta los mecanismos de dispersión, las capas inferiores se mantienen en condiciones anóxicas, ideales para el crecimiento de las bacterias metanogénicas (Whitman et al., 2014).

La vía de la producción de metano muestra una clara dependencia de la composición microbiana, con la metanogénesis acetoclástica dependiente de *Methanosarcina* y *Methanosaeta*, y la reducción de dióxido de carbono impulsada por grupos tales como las *Methanobacteriales* y *Methanosaeta*, que son sensibles a la temperatura y dominan la producción de metano por la vía CO₂/H₂ a temperaturas más altas (Fey & Conrad, 2000; Conrad et al., 2009).

1.3.3.1. Microorganismos metanogénicos descritos a bajas temperaturas

En climas fríos se ha detectado la presencia de Archaeas metanogénicas de las familias *Methanosarcinaceae*, *Methanosaetaceae*, *Methanomicrobiaceae* y *Methanobacteriaceae*, su abundancia varía de acuerdo al ecosistema. En suelos (permafrost) predominan microorganismos de las familias *Methanosarcinaceae*, *Methanobacteriaceae* y *Methanomicrobiaceae*, con preferencias por metanogénesis acetoclástica e hidrogenotrófica (Whitman et al., 2014; Barbier et al., 2012; Ganzert et al., 2007). En turberas y sedimentos de lagos predominan miembros de las familias *Methanoacetaceae*, *Methanobacteriaceae* y *Methanosarcinaceae*, con preferencias por metanogénesis acetoclástica en gran parte, y en menor medida, metanogénesis hidrogenotrófica (Kallistova et al., 2019; Jong et al., 2018; Blake et al., 2015; Whitman et al., 2014).

Metanomicrobiales y *Methanosarcinales* se encuentran en ambientes planctónicos, incluidos los lagos boreales. Los dos órdenes también se han encontrado en turberas y humedales del norte, lo que implica plasticidad por la preferencia de hábitat. Estos metanógenos se encuentran normalmente en gran abundancia en ambientes donde el oxígeno y otros aceptores de electrones están ausentes. Se han detectado también en los estanques de deshielo de permafrost, donde la saturación de oxígeno puede llegar hasta un 37%. Esto implica que no sólo a bajas temperaturas y condiciones anóxicas se encuentran estos microorganismos, sino que pueden estar presentes en condiciones más variables, preparados para una actividad metanogénica completa una vez las condiciones ideales de anoxia se reestablezcan, lo que ocurre poco después de la congelación del invierno. Los *Methanomicrobiales* en suelos árticos y turberas pueden ser tolerantes a condiciones redox variables, lo que puede contribuir a su ocurrencia y éxito en estanques de deshielo subárticos. Este grupo de metanógenos hidrogenotróficos también puede verse favorecido por las altas concentraciones de CO₂ que se acumulan en las aguas del fondo de los lagos de deshielo del permafrost. Los ambientes de temperaturas extremadamente bajas favorecen los metanógenos acetotróficos sobre los taxones hidrogenotróficos, en sedimentos y suelos (Crevecoeur et al., 2016). En la Tabla 2 se resumen las características de localización de los metanógenos en los diferentes ecosistemas de climas fríos.

Tabla 2 Resumen de Archaeas metanogénicas registradas en ecosistemas de climas fríos

Ecosistema	Clasificación	Metanogénesis	Referencia
Permafrost	Familia <i>Methanosarcinaceae</i>	Acetoclástica e hidrogenotrófica	Whitman et al., 2014; Barbier et al., 2012; Ganzert et al., 2007
	Familia <i>Methanobacteriaceae</i>	Acetoclástica e hidrogenotrófica	
	Familia <i>Methanomicrobiaceae</i>	Acetoclástica e hidrogenotrófica	
Turberas	Familia <i>Methanosarcinaceae</i>	Mayormente Acetoclástica	Kallistova et al., 2019; Jong et al., 2018; Crevecoeur et al., 2016; Blake et al., 2015; Whitman et al., 2014
	Familia <i>Methanobacteriaceae</i>	Mayormente Acetoclástica	
Lagos	Familia <i>Methanosarcinaceae</i>	Mayormente Acetoclástica	
	Familia <i>Methanobacteriaceae</i>	Mayormente Acetoclástica	

1.4. Emisiones de metano en el contexto de cambio climático

El metano tiene 25 veces el potencial de calentamiento global del dióxido de carbono, por lo que pequeños cambios en su concentración atmosférica tienen grandes implicaciones para el clima futuro. El metano es responsable de aproximadamente el 34% del forzamiento radiativo global, lo que lo convierte en el segundo gas de efecto invernadero más importante después del CO₂ (AMAP, 2015).

El forzamiento radiativo ocurre cuando se altera el equilibrio entre la energía que llega a la Tierra a través de la atmósfera y la cantidad de energía que se irradia desde el planeta. La palabra radiativo se refiere al flujo de energía que tiene lugar a través de la radiación solar entrante y los

rayos infrarrojos salientes. El término forzar implica que el desequilibrio es forzado, o causado por influencias externas, en los sistemas atmosféricos y climáticos de nuestro planeta. Este desequilibrio se mide en unidades de energía neta incidente por unidad de área de la superficie del planeta, generalmente vatios por metro cuadrado (W/m^2). Un valor positivo para el forzamiento radiativo se asocia con un aumento, o calentamiento, de las temperaturas de la superficie. Las sustancias que absorben la radiación solar o atrapan la radiación infrarroja son responsables del forzamiento positivo. Estas sustancias incluyen gases con alto potencial de calentamiento global (GWP). Por el contrario, el forzamiento radiativo negativo es un efecto de enfriamiento y se asocia con sustancias que reflejan la radiación incidente. Si la tasa de energía entrante es igual a la tasa a la que se pierde energía, entonces el valor del forzamiento radiativo será cero y la temperatura del planeta permanecerá en equilibrio (Kapur, 2019).

El metano no es solamente radiactivamente activo por sí mismo, sino que también es químicamente activo y tiene una gran influencia en la composición química de la atmósfera; por ejemplo es responsable, junto con otros compuestos químicos presentes en la atmósfera, de las reacciones fotoquímicas que dan lugar al ozono troposférico. Además, las fuentes de metano son sensibles a los cambios de temperatura por lo que se espera que el cambio climático y el subsecuente calentamiento de la superficie terrestre, lleve a un aumento de las emisiones de metano, acelerando el aumento de la temperatura. Una gran cantidad de metano se almacena como hidrato de metano, en los suelos de permafrost y en el lecho marino. El suelo de permafrost almacena alrededor de 100 veces la carga actual de metano en la atmósfera, y los hidratos de metano oceánicos almacenan incluso 1000 veces (Winterstein et al., 2019).

El metano también se emite durante la producción y distribución de gas natural y petróleo, y se libera como un subproducto de la minería del

carbón y la combustión incompleta de combustibles fósiles y biomasa (Saunois et al., 2016).

Los lagos termokársticos, resultantes de la fusión del hielo del permafrost, contribuyen significativamente a la cantidad global de metano. Una gran proporción de este metano puede derivarse de depósitos antiguos, atrapados profundamente dentro o debajo del permafrost. Además la gran cantidad de materia orgánica almacenada en la capa de descongelación sirve como una fuente de carbono importante para la metanogénesis *in situ* (Matheus Carnevali et al., 2015).

La mayor fuente natural de metano son los humedales, incluido un conjunto importante presentes en las regiones de latitudes altas que contienen permafrost. Existen altas tasas de liberación de metano en el Ártico en el lecho marino costero, en los suelos de permafrost y en los lagos. En los últimos la liberación es principalmente por evaporación, con una variabilidad significativa dentro y entre lagos. El metano en estos lagos se produce por metanogénesis microbiana, en la columna de agua y/o en sedimentos anaeróbicos del mismo (Paytan et al., 2015).

1.5. Emisiones de metano en lagos

Los lagos del norte (Ártico) son termokársticos y surgieron como resultado del colapso de la superficie, causado por el deshielo del permafrost. Son características importantes y conspicuas de los paisajes del Ártico y Subártico, en las regiones de tundra y taiga. Debajo de la zona de permafrost descongelado se encuentran los sedimentos de estos lagos. La emisión de metano desde estos sedimentos es un factor importante que afecta la cantidad global de este gas (Semiletov et al., 1996). Estas emisiones aumentan en épocas más cálidas, lo que demuestra su importancia para el calentamiento global (Semiletov et al., 1996; Schulz et al., 1997; Rasilo et al., 2014).

Los lagos pequeños y poco profundos son una característica prominente en el paisaje de Alaska, y estas características los hacen más importantes para contribución al calentamiento global, dado que emiten más metano que los lagos con mayor superficie y volumen (Bastviken et al., 2004).

En los sistemas lacustres estos microorganismos utilizan las vías acetoclásticas e hidrogenotróficas para producir metano. El metano que difunde desde los sedimentos hacia la columna de agua es típicamente oxidado por bacterias metanotróficas, en condiciones aeróbicas. La oxidación aeróbica de metano es un proceso biogeoquímico que en lagos de latitudes altas, puede consumir entre un 1% (invierno) y un 28% (verano) del metano producido (Martínez-Cruz et al., 2015).

En estos lagos de climas fríos, la presencia de permafrost ha mantenido relativamente al margen las emisiones de metano, dado que la emisión por evaporación disminuye en presencia de la capa de hielo. Al quedar el metano atrapado bajo la capa de hielo, puede ser oxidado por los metanótrofos, lo que disminuye su concentración. El descongelamiento del permafrost no sólo permite que las burbujas de metano escapen, sino que además contribuye con materia orgánica, quedando esta disponible para ser utilizada por los organismos metanogénicos, aumentando la producción de metano (Sepulveda-Jauregui et al, 2015; Greene et al., 2014).

Proyecto marco de este trabajo

En el marco del proyecto METHABASE (METHAnogenic Biodiversity and activity in Arctic and Subantarctic Ecosystems affected by climate change) dirigido, en Uruguay, por la Dra. Claudia Etchebehere, se realizó una campaña de muestreo (Julio, 2016) en varios ecosistemas de Alaska (muestreo de suelos, lagos, sedimento de lagos y turberas). El presente trabajo se centró en el análisis correspondiente a las muestras de

sedimentos de lagos. El proyecto METHABASE se realizó con el objetivo de aproximarse al conocimiento sobre la biodiversidad asociada al ciclo del metano y la comprensión de su función en el contexto del cambio climático.

2. OBJETIVO GENERAL

Dilucidar el efecto del cambio climático en las emisiones de metano en ecosistemas lacustres de latitudes altas.

2.1. Objetivos específicos

- ✓ Estudiar el efecto del incremento de temperatura sobre la producción de metano (velocidad de producción y rendimiento).
- ✓ Determinar las variaciones en el potencial de producción de metano de diferentes lagos de Alaska y evaluar cuales son las variables ambientales que determinan estas variaciones.

3. HIPÓTESIS

El aumento de temperatura se traducirá en un incremento en la velocidad de producción de metano por parte de los microorganismos metanogénicos. A mayor temperatura más rápida será la metanogénesis.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Extracción de muestras

Las muestras fueron extraídas por las Dras. Claudia Etchebehere y Bruna Martins, en diferentes puntos de cuatro lagos de Alaska. En la tabla 3 se detallan las coordenadas y ubicación de las muestras, están identificadas como Lago Killarney (lago 1 - L1), Lago Otto (lago 2 - L2), Lago Nutella (lago 3 - L3) y Lago Goldstream (lago 4- L4)

Tabla 3 Coordenadas y ubicación de las muestras

Muestras	Coordenadas	Ubicación	Bioma	Pofundidad máxima (m)**
L1	64.869879 N, 147.901824 W	Lago Killarney*	Bosque boreal	2.1
L2	63.846202 N 149.036019 W	Lago Otto		3.1
L3	63.214548 N, 147.677642 W	Lago Nutella *	Tundra	9.4
L4	64.915801 N, 147.847705 W	Lago Goldstream *	Bosque boreal	3.3

*Nombres populares

**Fuente: Sepulveda-Jauregui et al, 2015

El muestreo de sedimentos fue realizado al centro de cada lago, en la profundidad máxima en triplicado, cada zona de muestreo separada por unos pocos metros, para las incubaciones posteriores se consideraron dos puntos (A y B), por cuestiones de organización y tiempo. Las muestras de sedimento se colocaron en botellas de plástico estériles (1L, Nalgene®) y se subdividieron para análisis fisicoquímicos y moleculares, así como para los ensayos de actividad metanogénica. Para determinar los parámetros fisicoquímicos se midieron los sólidos totales y volátiles (ST, SV) y el contenido de materia orgánica (MO) a través del secado de las muestras. El secado se llevó a cabo durante la noche a 105°C (para establecer la masa seca) y luego se calentaron a 550°C durante aproximadamente tres

horas en mufla. La pérdida de peso se utilizó para determinar el porcentaje de sólidos totales (ST, peso seco: obtenido por secado a 105°C), sólidos volátiles (SV: obtenido luego de calentar a 550°C) y contenido de materia orgánica por peso seco (MO: g SV g⁻¹ ST) para cada muestra. El agua del sedimento se extrajo mediante filtración, para evaluar los principales aniones y cationes y el carbono orgánico disuelto (COD) según Jones y Willett (2006). La fase líquida se filtró a través de un muestreador microRhizon (Rhizosphere, Holanda) después de equilibrar 40 g de muestra con 200 mL de agua desionizada agitada con un agitador magnético a temperatura ambiente durante 1 h. Luego se midió el pH usando el pHmetro de una sonda multiparamétrica (HI9829, Hanna). Las características como carbono orgánico disuelto (COD), temperatura, pH, porcentaje de sólidos volátiles en el peso total de la muestra (%SV/TOT) y contenido de materia orgánica (MO), datos recabados *in situ* para cada muestra, están detallados en la tabla 4.

Tabla 4 Características fisicoquímicas de las muestras *in situ*

MUESTRAS	TEMPERATURA in situ (°C)	pH (in situ)	SV/TOT (%)	MO (g SV g ⁻¹ ST)	COD (mg L ⁻¹)
Killarney	10,1	7,1	4,5	0,1	21,8
Otto	13,9	6,9	3,8	0,1	3,0
Nutella	12,4	6,1	2,6	0,2	4,8
Goldstream	20,0	6,8	2,0	0,2	12,3

4.2. Estrategia de trabajo

En este trabajo se determinó el efecto del aumento de la temperatura en la velocidad de producción de metano mediante la implementación de ensayos en batch de las muestras de sedimentos de lagos recolectadas, en condiciones de anaerobiosis. Las incubaciones se realizaron a cuatro

temperaturas diferentes (5, 10, 15 y 20°C), utilizando siempre el mismo medio de cultivo, con acetato como sustrato en condiciones anaerobias.

La producción de metano se determinó mediante la medida de la presión generada y la determinación de la concentración de metano en el gas producido mediante cromatografía gaseosa.

4.2.1. Ensayos en batch para determinar la producción de metano

Las muestras fueron manipuladas para el montaje de los ensayos en una cámara anaerobia (Pyramid GloveBox, Captair) (Figura 8), de acuerdo al protocolo descrito en el proyecto METHABASE (modificado de Shelton & Tiedje, 1984) (Anexo 1).



Fig. 8 Cámara anaerobia utilizada para las incubaciones (Pyramid GloveBox, Captair). Previo al uso la cámara se llena con gas Nitrógeno.

Las muestras se incubaron en frascos con capacidad para 10 mL, con un “headspace” de 1 mL. El medio de cultivo utilizado fue un medio mineral

con acetato como sustrato (30 mM), para posibilitar la metanogénesis acetoclástica. La cantidad de muestra agregada se basó en la concentración de sólidos volátiles presentes, totalizando 8 g SV L⁻¹. La composición del medio de cultivo, así como la solución mineral utilizada se detalla en la tabla 5.

Tabla 5 Composición del medio mineral de cultivo: A) composición del medio mineral (g/L) y B) detalle de la composición de la solución mineral añadida en el medio mineral.

Composición del medio de cultivo (A)		Composición de la solución mineral*	
	Concentración final (g/L)		Concentración final (g/L)
KH ₂ PO ₄	0,27	FeCl ₃ , 4H ₂ O	0,02
K ₂ HPO ₄	0,35	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,02
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,1	MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,005
NH ₄ Cl	0,53	CuCl ₂ , H ₂ O	0,0003
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,075	ZnCl ₂	0,0005
NaCl	0,6	H ₃ BO ₃	0,0005
Solución mineral (20 mL) *		(NH ₄) ₂ gMo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0,001
Ácido acético	30 mM	Na ₂ SeO ₃ , H ₂ O	0,001
Cisteína	0,5	NiCl ₂ , 6H ₂ O	0,0005
Na ₂ S.9H ₂ O	0,1	EDTA	0,01
NaHCO ₃	1,5	HCl (36%)	0,00001
		Resazurina	0,005

Se preparó el medio de cultivo a partir de sus primeros componentes (KH₂PO₄; K₂HPO₄; MgCl₂, 6H₂O; NH₄Cl; CaCl₂, 2H₂O; NaCl y la solución de minerales). Luego de la adición de agua ultrapura en cantidad suficiente se realizó la esterilización en autoclave (20 minutos a 121°C) del medio conteniendo solamente las sales. El ácido acético, cisteína, Na₂S y NaHCO₃, fueron incorporados después de ese proceso. Para asegurar las

condiciones anóxicas el medio fue gaseado con N₂ dentro de la cámara anaeróbica en dos etapas; la primera antes de la esterilización y la última después del medio completo listo para ser usado para el montaje de los ensayos. Entre los procesos de gaseado de dos minutos cada uno, se ajustó el pH de cada muestra de acuerdo al que fue medido *in situ*.

Previo al agregado de la muestra se esterilizaron y pesaron los viales vacíos. Se registraron además los pesos luego de agregar la muestra y nuevamente una vez añadido el medio de cultivo, en la Figura 9 se detallan los pasos llevados a cabo dentro y fuera de la cámara anaerobia



Fig. 9 Representación esquemática del proceso de preparación de los ensayos, identificando etapas realizadas dentro y fuera de la cámara anaerobia

La limpieza de la cámara anaerobia se realizó con etanol 70% previo y posteriormente a su uso; una vez en condiciones se colocaron los elementos necesarios para realizar los ensayos en batch, se quitó el aire del interior, se cerró y llenó con N₂.

La manipulación en la cámara se realizó en dos etapas, dado que el pesado de los viales se llevó a cabo fuera de ella. En la primera etapa se añadió la muestra, cantidad basada en la concentración de sólidos volátiles

presentes, totalizando 8 g SV L⁻¹. Posterior al pesado de los viales+muestra se agregó el medio de cultivo concluyendo la segunda etapa en la cámara. Para ello se preparó previamente un vial con 10 mL de medio de cultivo utilizado como modelo para el llenado de los viales con la muestra, comparando con el modelo se evitó superar los 10 mL de volumen en cada vial y tener suficiente “headspace”. Finalmente a las 16 réplicas de cada muestra (4 réplicas para 4 temperaturas) se les registró el último peso y se cerraron los viales (tapón de goma + sello de aluminio). Cabe destacar que los viales fueron cerrados, sin precintarse, cada vez que se los retiraba de la cámara para evitar el contacto con el aire.

Las incubaciones se realizaron para cuatro temperaturas: 5°C, 10°C, 15°C y 20°C, en incubadoras (Punktal-PK EV8L) para 10°C, 15°C, y 20°C, y en cuarto frío para 5°C. Se chequeó previamente la temperatura de cada incubadora. De cada muestra y a cada temperatura se hicieron ensayos por cuadruplicado, en estos ensayos se determinó la presión y la concentración de metano mediante cromatografía de gases.

A partir del montaje de los ensayos, pasadas entre 5 y 24 h se procedió a una purga para eliminar la presión generada por gases no relacionados a los procesos de metanogénesis (“punto cero”). A partir de este punto (T0) se realizaron mediciones de presión (mBar) en el headspace de los viales a lo largo del tiempo, disminuyendo el tiempo entre mediciones conforme aumentaban los valores de presión. Para ello se utilizó un manómetro (Sper Scientific) a fin de medir la presión generada (Figura 10).



Fig. 10 Manómetro utilizado para monitorear la producción de metano en los ensayos de actividad metanogénica realizados a diferente temperatura.

4.2.2. Mediciones de concentración de metano por cromatografía de gases (GC)

La medida de la concentración de metano por cromatografía gaseosa se comenzó cuando los valores de presión alcanzaban los 40 mBar, semanalmente o cada 3 días si la producción era alta (arriba de 40 mBar). Se utilizó un cromatógrafo de gases (SRI Instruments, modelo 310C), equipado con detector tipo TCD y columna (Hayesep-D Packed Column 6' X1/8" SRI Instruments, US) utilizando argón como gas carrier (99,9% Linde, Uruguay). Se tomaron muestras del biogás generado utilizando una jeringa Hamilton especial para el muestreo de gases, extrayendo 250 μ L de gas por medición.

Para la extracción de la muestra se procedió a pinchar en el septo con la jeringa Hamilton de 500 μ L cerrada, abrir y extraer 300 μ L sin tocar el líquido y cerrar. Se tomó un volumen mayor para equilibrar presiones. Para evitar la acumulación de presión dentro de la jeringa, se abrió y se bajó hasta el volumen de 250 μ L, y se inyectó en el cromatógrafo de gases de forma inmediata. En caso de muestras muy concentradas se realizó una dilución, tomando 100 μ L de muestra y completando el volumen con aire hasta 250 μ L.

Las condiciones para la determinación de metano mediante cromatografía gaseosa fueron: temperatura del inyector: 40°C, de la columna: 150°C y detector: 40°C. Las áreas de los picos y los tiempos de retención se evaluaron utilizando el software *Peak Simple* (versión 3,93).

La construcción de la curva de calibración fue realizada basándose en siete puntos de concentración de gas metano (5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100%). Se utilizaron bolsas plásticas de propileno sin presión (FlexFoil PLUS, USA) para hacer las diluciones del metano (CH₄: 99.9% Linde) en nitrógeno (N₂: 100%, Linde), y fue inyectada una alícuota de 250 µL (0,25 mL) para cada concentración en el cromatógrafo de gases, utilizando jeringa tipo “sample lock” (Jeringa Hamilton, modelo 1750SL, USA). Las curvas fueron calculadas a través de una regresión lineal, basadas en las áreas de pico generadas, correspondientes a las distintas concentraciones.

4.3. Cálculo de actividad metanogénica

El cálculo para evaluar la actividad metanogénica se basó en el cálculo para gases ideales y en los valores de presión acumulada. Para estimar la producción total en moles de metano, se consideró el metano producido en la fase gaseosa y la parte diluida en la fase líquida (calculada por el coeficiente de Henry- “Henry’s Law”).

Luego, el cálculo de la tasa de producción de metano (metano por gramo de sólidos totales por día) se basó en la regresión lineal de la cinética acumulada de metano, considerando la pendiente máxima de la curva.

Para la fase gaseosa se aplicó la fórmula:

$$nCH_4_{gas} = \% \frac{CH_4}{100} * \left(vol \frac{headspace}{1000000} * P_{acumulada} * \frac{100}{8,3145} * (273 + T^\circ) \right) * 1000000$$

En dónde:

% CH₄= valor calculado a partir de GC.

P acumulada= presión medida con el manómetro (mbar) acumulada.

Vol headspace= volumen de espacio de cabeza (mL).

T°= temperatura de incubación (°C).

Para la fase líquida:

$$nCH_4_{liq} = vol\ de\ líquido * \%CH_4/100 * P_{acumulada} * 100 * 1,77e - 05 * \exp (1743,75 * (1/T^\circ + 273,15) - 1/298,15)) * 1000000$$

En dónde:

Vol. de líquido= volumen total de líquido agregado (mL)

% CH₄= valor previo calculado de GC

T°= temperatura de incubación (°C)

Hcp= 1,77e – 05: constante de solubilidad de Henry (para CH₄) definida por concentración (mol/(m³Pa⁻¹)) con la concentración en fase acuosa (mol.m⁻³) y presión parcial de CH₄ en fase gas (Pa).

A partir de la suma de las concentraciones de CH₄ en fases líquida y gaseosa se graficó la concentración total vs tiempo (días) y se calcularon las pendientes, obteniendo así la concentración de CH₄ producida por día.

Aplicando la fórmula:

$$pend./(\text{peso muestra} * (\% \frac{ST}{\text{peso}}))$$

se obtuvo la concentración de CH₄ producida por gramo de sólidos totales por día (μmoles CH₄ g⁻¹ ST d⁻¹)

Dónde:

Pend= concentración de CH₄ producido por día (μmol/d)

Peso muestra= peso de la muestra agregada (g)

%ST/peso= porcentaje de sólidos en el peso total (g/g)

Se calculó además el rendimiento máximo generado, resultado de la razón entre la cantidad máxima de metano producida (real) sobre la cantidad máxima teórica que se puede producir si se consume todo el sustrato (acetato); esto es:

$$\text{Máx. teórico CH}_4(\mu\text{mol}) = n_{\text{Acetato}} * \text{vol. liq.} * 1000000$$

$$\text{Rendimiento máx.} = \frac{\text{Producción máxima real } (\mu\text{mol CH}_4)}{\text{Máx. teórico } (\mu\text{mol CH}_4)}$$

Dónde:

nAcetato= concentración de acetato agregado (mmol/L)

Vol.liq.= Volumen de líquido total agregado (L)

También se calculó el período de latencia para cada muestra, considerado como el período de tiempo que llevó a cada muestra alcanzar el 10% de la producción máxima de metano.

4.4. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software PAleontological STatistics (PAST, versión 4.02). Se aplicó el análisis de varianza (ANOVA de una vía, varianzas homogéneas y con distribución normal) para evaluar el efecto de las diferentes temperaturas en la producción de metano.

Se realizaron además pruebas de correlación de Pearson para verificar la relación entre los parámetros fisicoquímicos y la producción de metano.

5. RESULTADOS

Los resultados de las medidas de metano mostraron que en casi todas las muestras se produjo metano (Figuras 11-14), con la excepción de las muestras del punto B del Lago Otto cuando fueron incubadas a 5°C (Figura 12). Se observó también una gran variación en las curvas sobre todo en las muestras del lago Nutella (Figura 13).

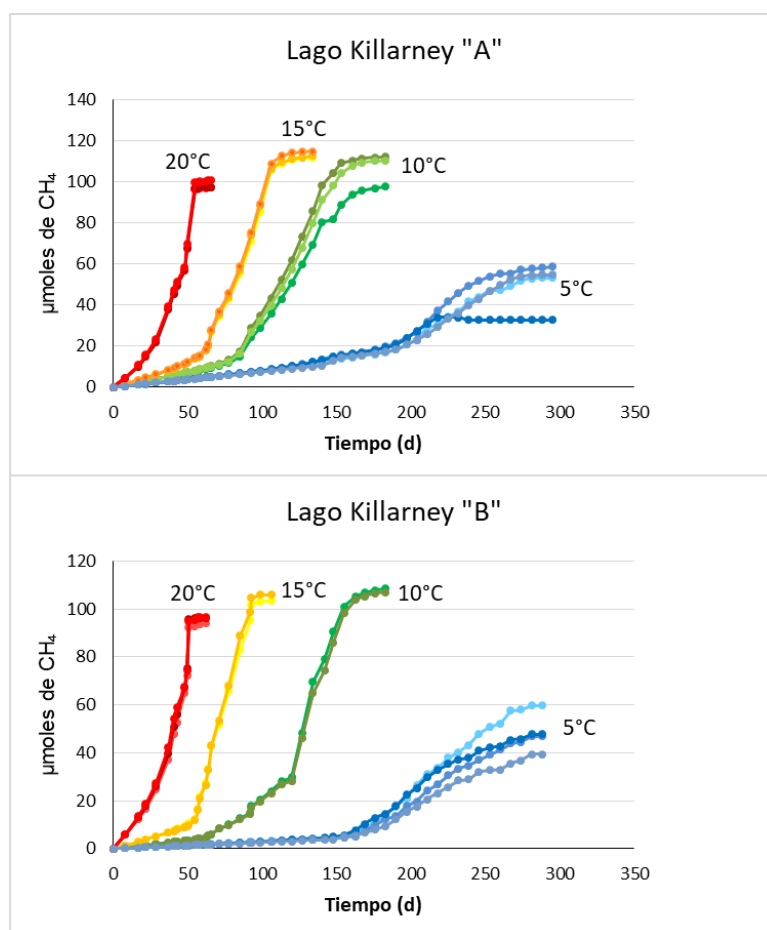


Fig. 11 Producción de CH₄ (µmol) en función del tiempo (días) para las muestras extraídas de los puntos A y B del lago Killarney. En tonos de azul, verde, amarillo y rojo se representan los µmolesCH₄/día para las réplicas incubadas a 5, 10, 15 y 20°C, respectivamente.

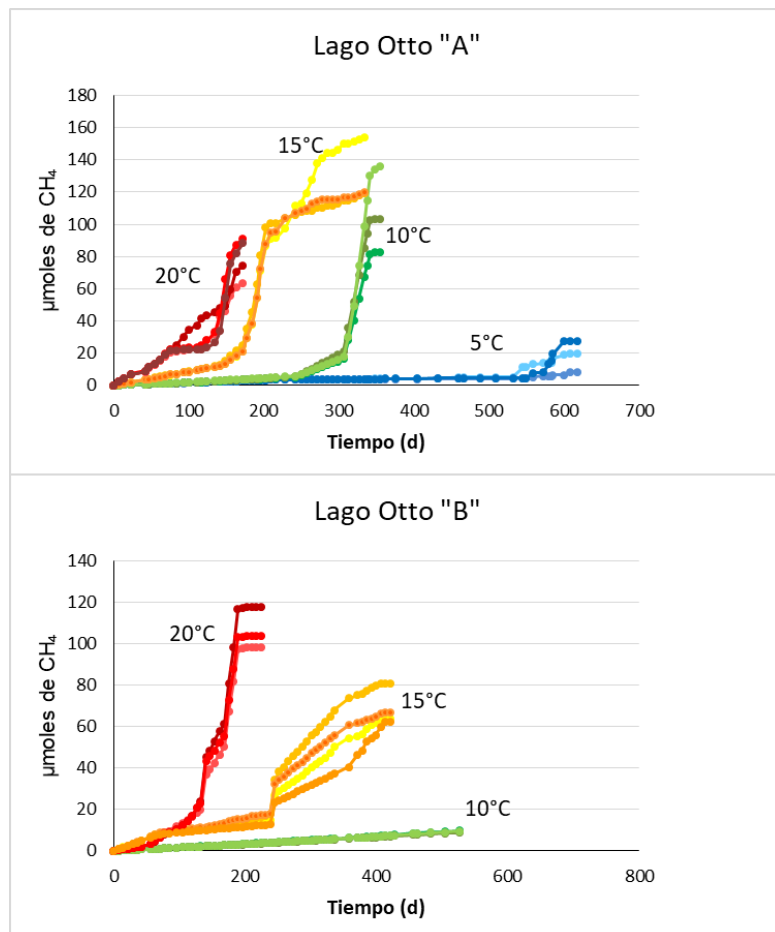


Fig. 12 Producción de CH₄ (μmol) en función del tiempo (días) para las muestras extraídas de los puntos A y B del lago Otto. En tonos de azul, verde, amarillo y rojo se representan los μmolesCH₄/día para las réplicas incubadas a 5, 10, 15 y 20°C, respectivamente.

Cabe destacar que, si bien las incubaciones se realizaron por cuadruplicado, en el protocolo original se realizaban mediciones de presión de tres de las réplicas, y una estaba destinada solamente a la medición de la concentración de metano en GC. Posteriormente se ajustó el protocolo, dado que no todas las réplicas se comportaban de igual manera, como se puede observar en las Figuras 11-14.

En el protocolo nuevo se realizaron mediciones de presión de todas las réplicas y GC de las dos con presiones más altas. Es por esta razón que en los gráficos de producción de CH₄ vs tiempo no todas las muestras tienen representados las cuatro réplicas para cada temperatura, principalmente las réplicas incubadas a 15°C y 20°C, cuya producción de metano comenzó y finalizó antes, y no se llegó a aplicar el protocolo nuevo.

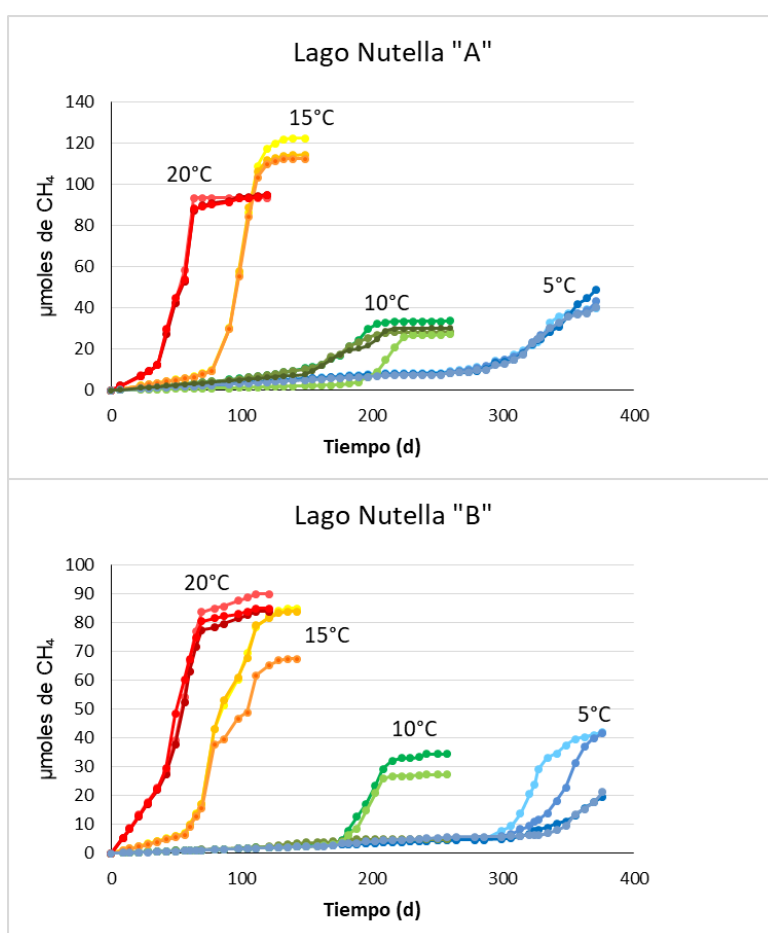


Fig. 13 Producción de CH₄ (µmol) en función del tiempo (días) para las muestras extraídas de los puntos A y B del lago Nutella. En tonos de azul, verde, amarillo y rojo se representa producción de CH₄ en función del tiempo para las réplicas incubadas a 5, 10, 15 y 20°C, respectivamente.

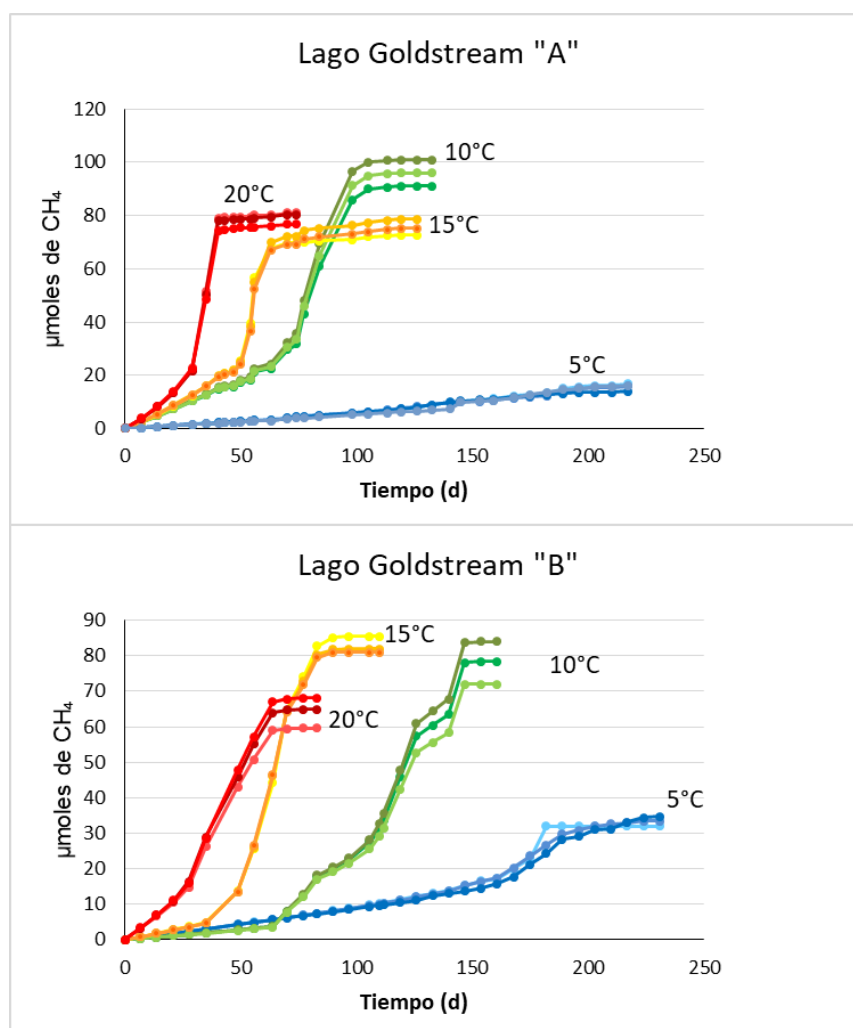


Fig. 14 Producción de metano (μmol) en función del tiempo (días) para las muestras extraídas de los puntos A y B del lago Goldstream. En tonos de azul, verde, amarillo y rojo se representa la producción de CH_4 en función del tiempo para las réplicas incubadas a 5, 10, 15 y 20°C, respectivamente.

A partir de los datos de producción de metano a lo largo del tiempo se calculó la actividad metanogénica ($\mu\text{moles CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ ST d}^{-1}$) de las muestras incubadas a diferentes temperaturas (Figura 15).

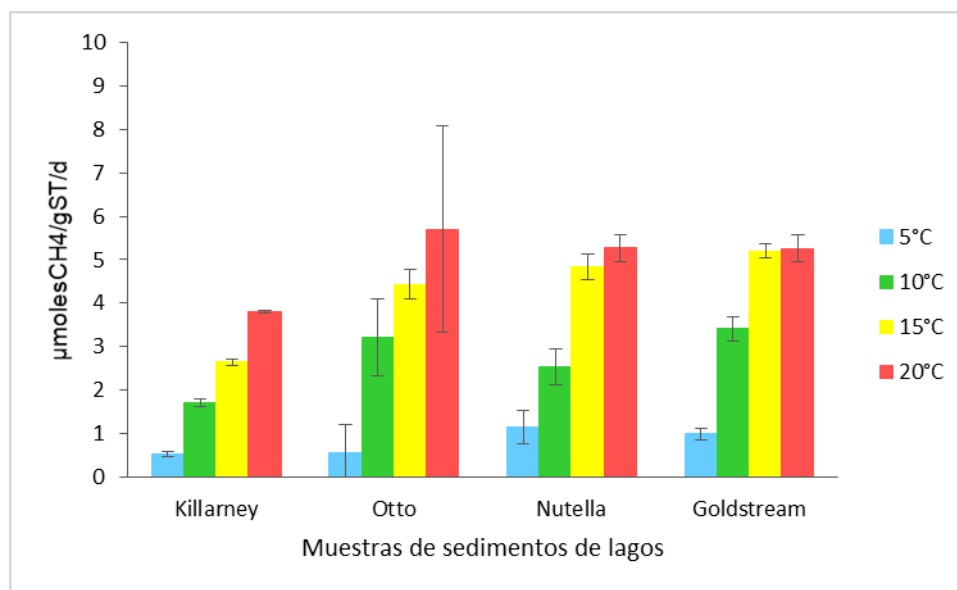


Fig. 15 Actividad metanogénica acetoclástica específica de las muestras de los lagos incubadas a cuatro temperaturas diferentes (5, 10, 15 y 20°C). Los valores son promedios de las cuatro réplicas de ambos puntos de extracción de muestra (A y B) y la barra de dispersión muestra la desviación estándar.

Los resultados de la actividad metanogénica acetoclástica muestran una gran dependencia de la temperatura, con los valores mayores asociados a las temperaturas más altas. La mayor producción corresponde a las muestras incubadas a 20 °C, variando de 3,8 (Lago Killarney) a 5,7 $\mu\text{moles CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ ST d}^{-1}$, (Lago Otto). Los valores de actividad metanogénica a 20°C de las demás muestras fueron similares al valor más alto (5,266 $\mu\text{moles CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ ST d}^{-1}$ (Lago Nutella), 5,3 $\mu\text{moles CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ ST d}^{-1}$ (Lago Goldstream)).

Los valores menores de actividad metanogénica acetoclástica corresponden a los ensayos incubados a 5°C, siendo el menor valor el de las muestras del lago Killarney, (0,5 $\mu\text{moles CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ ST d}^{-1}$) y el mayor (1,15 $\mu\text{moles CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ ST d}^{-1}$) del Lago Nutella. Las muestras de los lagos Otto y Goldstream presentaron resultados de actividad de 0,5 y 0,99 $\mu\text{moles CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ ST d}^{-1}$, respectivamente. Una vez finalizada la producción de metano, se calculó el período de latencia para cada muestra (Figura 16).

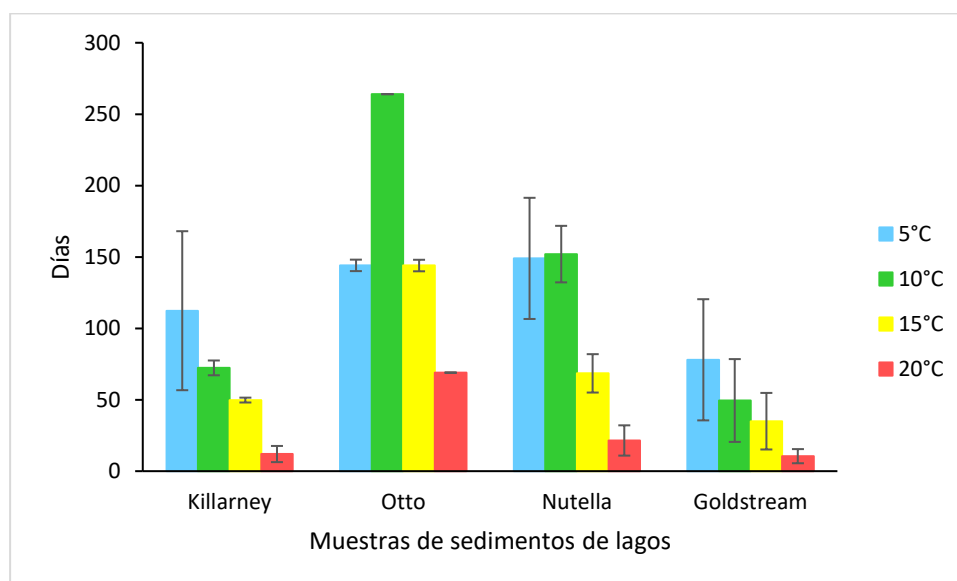


Fig. 16. Período de latencia en los ensayos de actividad metanogénica para las muestras incubadas a cuatro temperaturas diferentes. Los valores son promedios de las cuatro réplicas de ambos puntos de extracción de muestra (A y B) y la barra representa la desviación estándar.

El período de latencia indica el tiempo (días) que tardó la muestra en alcanzar el 10% de la producción total de metano, calculada al final de cada ensayo, los resultados muestran que la temperatura tiene una influencia en la duración de este período, y se establecen dos patrones de comportamiento diferentes. En general, las muestras presentaron un período de latencia más corto a temperaturas más altas (15 y 20°C) y más largo a temperaturas más bajas (5 y 10°C). Las muestras del lago Otto reportaron como período más largo el correspondiente a las incubaciones realizadas a 10°C (264 días) y a 15°C (144 días). Las muestras del lago Nutella presentaron los tiempos de latencia más largos a 5°C (149 días) y más cortos a 20°C (22 días). Las muestras de los lagos Otto y Nutella presentaron un período de latencia mayor para las muestras de 5°C (143 días y 149 días, respectivamente). Las muestras de los lagos Goldstream,

y Killarney presentaran el período de latencia más corto a 20°C, con 11 y 12 días, respectivamente.

En cuanto a los análisis estadísticos, el test de ANOVA con post hoc de Tukey resultó en una relación estadísticamente significativa entre la actividad metanogénica y la temperatura, temperaturas más altas (10, 15 y 20°C en comparación a 5°C) tuvieron un impacto significativo en la actividad metanogénica ($p < 0,005$).

Tabla 6 Correlación de Pearson entre actividad metanogénica, parámetros fisicoquímicos y período de latencia.

	Act. 5°C	Act. 10°C	Act. 15°C	Act. 20°C	pH	OM	DOC	PL 5°C	PL 10°C	PL 15°C	PL 20°C
Act. 5°C		0,703	0,26818	0,61719	0,13275	0,16316	0,64017	0,94726	0,72658	0,56118	0,5626
Act. 10°C	0,297		0,14035	0,11912	0,90144	0,23062	0,34791	0,807	0,70644	0,69899	0,59431
Act. 15°C	0,73182	0,85965		0,1295	0,42598	0,015568	0,27181	0,9439	0,83995	0,93225	0,86585
Act. 20°C	0,38281	0,88088	0,8705		0,58784	0,22007	0,067012	0,72197	0,38888	0,45083	0,39626
pH	-0,86725	-0,098564	-0,57402	-0,41216		0,34312	0,4368	0,55444	0,89044	0,90867	0,85705
OM	0,83684	0,76938	0,98443	0,77993	-0,65688		0,35289	0,9005	0,97362	0,91554	0,97282
DOC	-0,35983	-0,65209	-0,72819	-0,93299	0,5632	-0,64711		0,401	0,22628	0,32679	0,31845
PL 5°C	-0,05274	-0,193	-0,0561	0,27803	-0,44556	-0,0995	-0,599		0,19681	0,29859	0,39144
PL 10°C	-0,27342	0,29356	0,16005	0,61112	-0,10956	0,02638	-0,77372	0,80319		0,020575	0,042994
PL 15°C	-0,43882	0,30101	0,067754	0,54917	0,091333	-0,08446	-0,67321	0,70141	0,97942		0,008692
PL 20°C	-0,4374	0,40569	0,13415	0,60374	0,14295	-0,02718	-0,68155	0,60856	0,95701	0,99131	

**Act. (5°C, 10°C, 15°C, 20°C)"- Actividad metanogénica ($\mu\text{moles CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ ST d}^{-1}$); OM- Contenido de materia orgánica ($\text{g SV g}^{-1} \text{ ST}$); DOC-Carbono orgánico disuelto (mg L^{-1}); PL (5°C, 10°C, 15°C, 20 °C)"- Período de latencia (días). En azul, valores del estadístico "r", en negro el p-valor. Las celdas en celeste indican las correlaciones positivas ($r > 0,8$), y la celda en verde indica la única correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

La correlación de Pearson (Tabla 6) entre actividad metanogénica, los parámetros fisicoquímicos y los períodos de latencia para cada temperatura reportó resultados estadísticamente significativos para pocas muestras. Se observó fuerte correlación positiva ($r > 0,8$) significativa entre el contenido de materia orgánica y la actividad metanogénica a 15° ($p < 0,05$).

A partir de la razón entre la producción máxima de metano observada (valor máximo real) y la producción máxima teórica de metano,

se calcularon los rendimientos máximos para todas las muestras a cada temperatura de incubación (Figura 17).

La temperatura también resultó una variable importante para el rendimiento, siendo los rendimientos más bajos los correspondientes a 5°C, para todas las muestras (entre 13% y 19%). El mayor rendimiento lo alcanzaron las muestras del lago Goldstream incubadas a 10°C (51,08%). Para ninguna muestra se reportó como mayor rendimiento el de las muestras incubadas a la temperatura de 20°C, todas mostraron un mayor rendimiento a 10°C (lagos Otto y Goldstream) o a 15°C (lagos Killarney y Nutella).

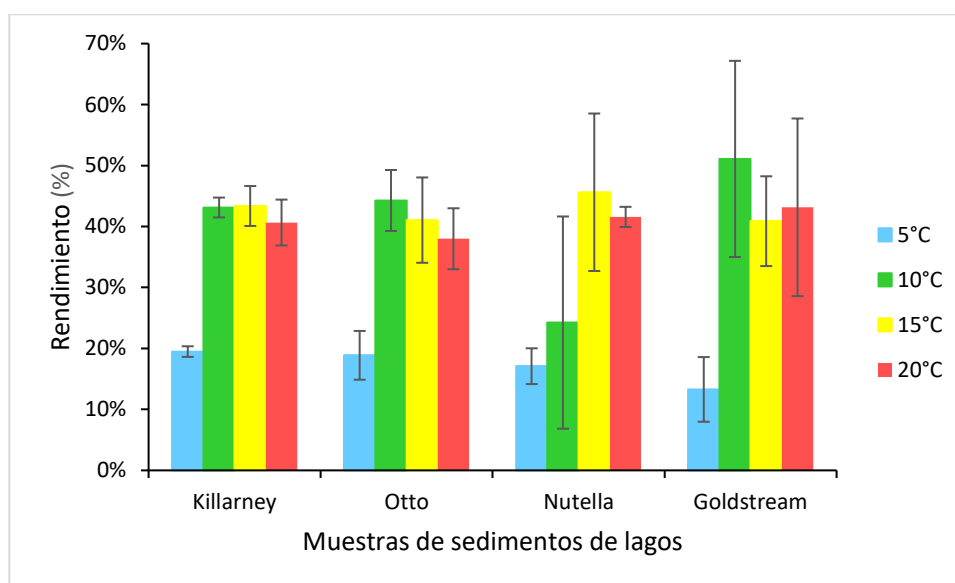


Fig. 17 Rendimiento máximo en metano obtenido en los ensayos de actividad metanogénica a las cuatro temperaturas diferentes. Los valores indican el promedio entre las cuatro réplicas de ambos puntos de extracción de muestra (A y B) y las barras la desviación estándar.

6- DISCUSIÓN

El cambio climático es un problema actual que nos afecta a todos, desde el microorganismo más pequeño hasta el mamífero más grande. En menor o mayor medida los cambios que suceden y continuarán sucediendo afectan el equilibrio natural de cada ecosistema, por lo que resulta de gran importancia investigar las causas de este fenómeno, para trabajar en revertirlo o, al menos, reducir sus consecuencias.

Al hablar de calentamiento global siempre se menciona al dióxido de carbono como el mayor responsable, y causante del aumento de la temperatura global. El CO₂ es un gas de efecto invernadero muy importante, pero no es el único. A partir de mediados del siglo XX, la comunidad científica comenzó a centrar sus esfuerzos en conocer y difundir un poco más sobre el segundo gas de efecto invernadero más importante, el metano. Este trabajo de grado fue una pequeña parte de una investigación más amplia y completa que involucró a muchos científicos en varios puntos del planeta, con el objetivo de recabar más información sobre este gas, sus orígenes naturales y sus efectos en un escenario de calentamiento global.

El presente trabajo se realizó en el ámbito de los efectos del calentamiento global en ecosistemas lacustres de Alaska, enfocándose principalmente en el efecto directo de la temperatura sobre la producción acetoclástica de metano, así como en las variables ambientales que puedan influir en dicho proceso.

Producción de metano en lagos y factores influyentes

Dentro de los resultados de este trabajo se constató que la temperatura afecta la velocidad de producción acetoclástica de metano, se observó un aumento de 6 veces en la velocidad de producción acetoclástica de metano a temperaturas mayores (10°C, 15°C y 20°C) respecto a la

temperatura más baja (5°C). La temperatura es un factor limitante y dirige las funciones metabólicas de los organismos vivos, esto fue comprobado en este trabajo, obteniéndose resultados que van en línea con varios trabajos previos (Schulz et al., 1997; Duc et al., 2010; Carnevali et al., 2015; Jong et al., 2018).

En las emisiones de metano específicamente, el aumento de la temperatura resulta en una retroalimentación positiva, dado que a mayor temperatura la producción de metano se favorece, y siendo el metano un gas de efecto invernadero, a mayor emisión de metano, más se incrementará la temperatura, constituyéndose un ciclo altamente perjudicial para la vida actual en el planeta. Si a esto se suma el deshielo y su consecuente aumento de la disponibilidad de sustratos para la metanogénesis (además de la liberación del metano contenido por el hielo), las consecuencias no resultan alentadoras (Greene, et al., 2014; AMAP, 2015; Carnevali et al., 2015; Rasilo et al., 2014; Sepulveda-Jauregui A. et al, 2015; Knoblauch et al., 2018).

En investigaciones realizadas en lagos de Alaska, en las que se llevaron a cabo mediciones *in situ* de emisiones de metano, a mayor temperatura se reportó mayor flujo de metano. Esos trabajos no tuvieron en cuenta la temperatura en la que se produjo la metanogénesis (temperatura de los sedimentos), sino la temperatura superficial del agua. Los resultados obtenidos por Greene et al. (2014), se basaron en las consecuencias del deshielo de los lagos por el aumento de las temperaturas; la capa de hielo mantiene las burbujas ricas en metano atrapadas, dando más tiempo a la comunidad metanotrófica de oxidar parte del metano. Al aumentar las temperaturas la capa de hielo está presente por menos tiempo y el metano escapa por evaporación antes de dar tiempo a los metanótrofos de oxidarlo. La investigación llevada a cabo por Sepulveda-Jauregui et al. (2015), también en lagos de Alaska, incluyó una cantidad y variedad mayor de lagos (40), incluidos los cuatro muestreados para el presente trabajo. Las mediciones de emisiones de metano *in situ* se

realizaron durante invierno y verano, teniendo en cuenta todos los mecanismos de liberación de este gas. Las emisiones fueron mayores durante las épocas de temperaturas más altas, registrándose un efecto dos veces mayor del aumento de la temperatura en las emisiones de CH₄ en comparación con las de CO₂.

Los resultados obtenidos respecto a la influencia de la temperatura en la actividad metanogénica también fueron similares a los obtenidos en investigaciones llevadas a cabo previamente (ver resumen en Tabla 7). Schulz y colaboradores (1997) realizaron incubaciones de sedimentos de un lago (Alemania), cuya temperatura promedio *in situ* era de 4°C. Las incubaciones fueron llevadas a cabo en un gradiente de temperaturas, de 2°C a 49°C, con intervalos de temperatura de 2-3°C. La producción de CH₄ reportó una dependencia de la temperatura, demostrando que la temperatura óptima para la metanogénesis (cercana a los 40°C para metanogénesis acetoclástica) era superior a la temperatura registrada *in situ*. Carnevali et al. (2015) y Jong et al. (2018) reportaron que la producción de metano ocurre de forma dependiente de la temperatura. En ambos casos se realizaron incubaciones de muestras de sedimentos de lagos de Alaska, en el caso de Carnevali, sin adición de sustrato, a 2°C y a 10°C; y en el trabajo de Jong y colaboradores, sí se le adicionó sustrato, realizando incubaciones a 4°C y 10°C. A 10°C, con y sin adición de sustrato (acetato, TMA o MeOH/H₂) para potenciar metanogénesis acetoclástica, hidrogenotrófica, o metilotrófica, respectivamente) la actividad metanogénica fue superior a la registrada para las temperaturas inferiores.

La actividad metanogénica también mostró una relación directa, con resultados estadísticamente significativos ($r > 0,9$; $p < 0,05$) con el contenido de materia orgánica (OM) para el caso de las muestras incubadas a 15°C; a 5°C se observó relación sin relevancia estadística ($r > 0,9$; $p > 0,05$). Con

el resto de los parámetros recabados *in situ* (pH, Carbono orgánico Disuelto) no se observó relación a una mayor o menor actividad metanogénica.

En trabajos previos Juutinen et al. (2009) y Northington & Saros (2016) realizaron investigaciones de concentración de metano en lagos, ambos en climas fríos (Finlandia y Groenlandia, respectivamente), y se registró la concentración de metano *in situ*. Ambos trabajos realizaron comparaciones entre diferentes lagos y constataron una relación positiva entre la producción de metano y el contenido de materia orgánica (COD y contenido de nutrientes).

Duc y su equipo (2010) llevaron a cabo un experimento similar al realizado en este trabajo, incubaciones de muestras de lagos de clima frío (Suecia), en anaerobiosis, a diferentes temperaturas (4°C, 10°C, 20°C y 30°C). La diferencia residió en que no se adicionó ningún sustrato al medio de cultivo. En este trabajo, al igual que en de Carnevali et al. (2015) se observó una relación positiva entre la producción de metano y el contenido de carbono orgánico (COD, carbono orgánico disuelto, o TOC, carbono orgánico total).

Teniendo en cuenta los resultados de las investigaciones mencionadas previamente, y los resultados expuestos en este trabajo, podría decirse que a pesar de no observarse correlaciones estadísticamente significativas entre el contenido de carbono disuelto (COD) y la actividad metanogénica, se constataron fuertes correlaciones con el contenido de materia orgánica (MO). Por lo tanto, además de la temperatura, factores como el pH y la materia orgánica podrían tener una influencia en la producción de metano. Agregando el sustrato al medio nos aseguramos de que el sustrato no fuera limitante para la producción de metano. Pero, se debe tener en cuenta que en la naturaleza los sustratos para la metanogénesis son obtenidos directamente de los sedimentos, en este trabajo se agregó sustrato, por lo que la cantidad de carbono orgánico

presente en cada muestra puede haber tenido influencia en la proporción de microorganismos metanogénicos en los sedimentos, aumentando así la actividad metanogénica específica.

Tabla 7. Resumen de datos recabados en bibliografía consultada y este trabajo.

Lugar	Temperatura	Determinación	Efecto	Referencia
Alemania	Entre 2°C y 49°C, en intervalos de 2°C-3°C	Actividad metanogénica con adición de sustrato	Incremento de actividad metanogénica al aumentar la temperatura. Pico de producción a 36-40°C	Schulz et al., 1997
Suecia	4°C, 10°C, 20°C y 30°C	Actividad metanogénica sin agregado de sustrato	Aumento de 11 y 5 veces en la actividad metanogénica, 20° respecto a 5° y 10°C respectivamente	Duc et al., 2010
Alaska	2°C y 10°C	Actividad metanogénica sin adición de sustrato	Actividad metanogénica 3 veces mayor a 10°C que a 2°C	Carnevali et al., 2015
Alaska	4°C y 10°C	Actividad metanogénica con y sin adición de sustrato	Actividad metanogénica 1,5 veces más alta a 10°C que a 4°C	Jong et al., 2018

Alaska	5°C, 10°C, 15°C y 20°C.	Actividad metanogénica agregando acetato	Incremento de 6 veces la actividad metanogénica a 20°C respecto a 5°C	Este trabajo
--------	----------------------------	--	--	--------------

En climas fríos, grandes cantidades de materia orgánica se encuentran almacenadas debajo del permafrost. A pesar de no poder confirmar con seguridad, cuándo y en qué cantidades estará disponible esta materia orgánica para los metanógenos, sí se sabe que si continúan aumentando las temperaturas globales, especialmente en el Ártico, la mayor disponibilidad de materia orgánica pueda ser un efecto indirecto que potencie la metanogénesis. Se han reportado varias hipótesis y resultados respecto a qué puede determinar este efecto. El aumento de la velocidad de la reacción es una de las posibilidades, en este trabajo se comprobó que a temperaturas más altas la producción comenzó y terminó antes que a temperaturas más bajas. Esto también se reportó en los trabajos de Jong et al. (2018) y Carnevali Carnevali et al. (2015). Otra posibilidad es el cambio en la preferencia por los diferentes sustratos de los metanógenos, que el aumento de la temperatura propicie diferentes mecanismos de metanogénesis que puedan resultar en mayor producción de metano. Jong reporta resultados concordantes con otros trabajos (Allan et al., 2014; McCalley et al., 2014; Coolen & Orsi, 2015) de un cambio en la preferencia de sustrato con el aumento de la temperatura, favoreciéndose la metanogénesis acetoclástica por sobre la hidrogenotrófica a temperaturas más altas. Carnevali (Carnevali et al., 2015) comprobó además que el aumento de la actividad metanogénica es proporcional al aumento de la disponibilidad de carbono orgánico, la temperatura y el número de copias del gen *mcrA*, marcador que se utiliza para cuantificar las archaeas productoras de metano. Este trabajo no incluyó análisis moleculares, pero

resulta valioso e interesante lograr comprobar esta hipótesis de la correlación entre la cantidad del marcador mcrA, la actividad metanogénica y la temperatura. Este mismo experimento realizando análisis por qPCR previos y posteriores a la etapa de incubación, utilizando primers específicos para mcrA, puede aportar mucho a una conclusión más detallada y a investigaciones futuras.

A pesar de no observarse relaciones estadísticamente significativas entre el pH y la producción, ha sido previamente reportado que el pH y la temperatura son factores limitantes para el proceso de metanogénesis (Dunfield et al., 1993; Whitman et al., 2014). En el presente trabajo los ensayos de actividad metanogénica que presentaron producción de metano fueron realizados al mismo pH medido in situ, que en su mayoría correspondía a valores cercanos al pH neutro, entre 6,5 y 7.

Recientemente en una investigación llevada a cabo por Zhang et al. (2020) se evaluó el efecto del pH en la producción de metano. Los experimentos se llevaron a cabo de forma similar a la expuesta en este trabajo, en cámara anaerobia, pero se evaluaron diferentes variables, entre ellos el pH. Las muestras extraídas fueron de turberas. Como resultado obtuvieron que a pH bajo (3,8) la metanogénesis fue inhibida, o se vió favorecida la metanogénesis hidrogenotrófica por sobre la acetoclástica. A pH cercano al neutro la metanogénesis se vió favorecida, y un aumento del pH y de la temperatura a la vez, potencia aún más la actividad metanogénica.

Vale destacar que en el presente proyecto se evaluaron varias muestras además de las utilizadas para este trabajo de grado. Se realizaron los mismos ensayos para muestras de turberas y de suelos, con los que se procesaron un total de 49 muestras (entre turberas, suelos y lagos). Si bien las muestras de lagos presentaban un pH muy similar cercano al neutro, otras muestras presentaron un pH ácido de entre 4 y 5; en esos casos se observó claramente la influencia del pH en la producción de

metano, comprobando que un pH más bajo resultaba en una inhibición de la metanogénesis. En el caso de las muestras de lagos utilizadas, el pH neutro o casi neutro tuvo una influencia positiva en la producción, por lo que tiene sentido que la producción de metano a pH poco variable sea similar.

Se comprobó que la producción de metano aumenta acorde al aumento de la temperatura, pero esto no implica que las emisiones a la atmósfera también aumenten (en condiciones *in situ*). Según lo reportado por He (He et al., 2012) en ambientes naturales los microorganismos metanotróficos también presentan mayor actividad a temperaturas más altas, con una temperatura óptima de 25°C. Por lo tanto, resultaría de gran interés comprobar qué porcentaje del metano producido en las condiciones de incubación puede ser efectivamente oxidado por los microorganismos metanótrofos, para así evaluar el efecto real de la temperatura en el balance producción-consumo-emisión de metano. Respecto a lo anterior se ha reportado también (Sepulveda et al., 2015; Wik et al., 2016) que la evaporación es el mecanismo de liberación de metano predominante en los lagos, mecanismo que no puede ser mitigado por los organismos metanótrofos. Wik y colaboradores (2016) destacan la importancia de las temporadas libres de hielo, en las que la liberación de metano se ve potenciada, además de que el aumento de la temperatura aumenta la productividad microbiana. Estos son factores a tener en cuenta para el balance antes mencionado resultando de gran interés para una evaluación más completa del efecto del calentamiento global en las emisiones de metano.

En este trabajo se adicionó acetato a la composición del medio de cultivo para favorecer la metanogénesis acetoclástica, considerando que este tipo de metanogénesis es la más común en los ambientes estudiados (Casper et al., 2000; Hedderich & Whitman, 2006; Jong et al., 2018), aunque no es el único, por lo que representa una limitante para concluir acerca del efecto del sustrato en la metanogénesis. En este sentido, Schulz y colaboradores (Schulz et al., 1997) demostraron que a temperaturas más

bajas predominó la metanogénesis acetoclástica; lo que no indica que también predomine a temperaturas superiores. De hecho en la misma investigación se comprobó que el pico de producción de metano ocurrió en las incubaciones realizadas a 40°C. En el trabajo de Schulz y colaboradores, se realizó la evaluación de la producción de metano en muestras de sedimentos de lagos a un rango de temperatura entre 2°C a 49°C, intentando comprobar la dependencia de la disponibilidad de sustrato y del aumento de la temperatura en la metanogénesis. No solamente se comprobó que a mayor temperatura la metanogénesis se veía favorecida (con adición de sustrato o no) sino también que la metanogénesis acetoclástica era la favorecida para todo el rango de temperaturas evaluadas. En el trabajo de Jong (Jong et al., 2018) se reportó que la metanogénesis hidrogenotrófica se vio influenciada positivamente por el aumento de la temperatura, no solamente la metanogénesis acetoclástica; también se comprueba que con el aumento de la temperatura hay un cambio de metanogénesis hidrogenotrófica a acetoclástica, lo que reafirma la importancia de la utilización de acetato como sustrato en investigaciones de este tipo. Se evaluó además la influencia de otros sustratos monocarbonados, como TMA (trimetilamina) y metanol; la mayor producción se reportó en muestras de sedimentos con TMA y acetato como sustratos, comprobando que en estos ecosistemas es efectivamente el acetato el sustrato más utilizado por los metanógenos para la producción de metano (50% de TMA convertido a CH_4 vs 73% de acetato convertido a CH_4). A pesar de todo lo expuesto, para poder corroborar cuál de las vías metanogénicas es más importante en estos ecosistemas será necesario realizar otros estudios. Una investigación más completa puede incluir las incubaciones realizadas en este trabajo pero con más opciones de sustratos, favorecer los tres tipos de metanogénesis y evaluar qué sucede a diferentes temperaturas. También se hace necesario controlar posteriormente el consumo de los sustratos realizando HPLC, para comprobar cuánto se consume del sustrato agregado y cuánto se utiliza del

que estaba ya presente en la muestra. Y para todos los casos realizar controles (sin adición de sustrato) que permitan tener una base con la cual comparar, respetando lo que serían condiciones más similares a las naturales.

Las temperaturas evaluadas permitieron considerar lo que puede pasar en escenarios donde la temperatura global aumente varios grados. Resulta valioso poder incluir más datos con temperaturas no tan alejadas unas de otras, preguntarse qué sucedería si la temperatura aumenta 2 o 3°C, evaluar las variaciones en intervalos más chicos puede dar una idea de lo que puede pasar en un tiempo más acotado, a medida que sigue aumentando la temperatura global y no tanto hacia el largo plazo. Realizar una investigación con múltiples temperaturas en las condiciones en las que se llevó a cabo este trabajo tendría varias dificultades técnicas, se necesitan más equipos, muchas incubadoras para cada temperatura específica y más personas que realicen el trabajo, además de multiplicar todos los materiales utilizados por la cantidad de temperaturas a evaluar. Más allá de las dificultades, aportaría mucho a la información sobre los efectos del calentamiento global en un tiempo acotado.

Dada la importancia que tiene el cambio climático en la actualidad, cabe preguntarse qué sucedería en un escenario de calentamiento global si se modificaran otras condiciones. En este trabajo no se logró comprobar el efecto de otras variables en la metanogénesis, pero en varios artículos consultados se destaca la importancia del contenido de carbono orgánico disuelto, la disponibilidad de nutrientes y el tipo de suelo circundante a los lagos, el cual aporta materia orgánica, así como la profundidad y extensión de estos (Rasilo et al., 2014; Carnevali et al., 2015, Sepulveda et al., 2015; Jong et al., 2018).

En el presente trabajo no fueron incluidos análisis moleculares y resultaría de utilidad conocer qué microorganismos estaban presentes antes y después de las incubaciones, lo que permitiría detectar especies centinela, así como enfocar esfuerzos en conocer las especies más sensibles a los cambios de temperatura. Son reportados los grupos como *Methanosarcinaceae*, *Methanoacetaceae* y *Methanoregulaceae* en lagos de ambientes articos (Kallistova et al., 2019). Igualmente, en lagos de Alaska los mismos grupos de metanogenos son reportados; *Methanomicrobiaceae*, *Methanosarcinaceae*, *Methanoacetaceae* y *Methanoregulaceae* (Jong et al., 2018; Matheus Carnevali et al., 2018).

7- CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se pudo comprobar que la velocidad de producción acetoclástica de metano fue mayor a mayores temperaturas en muestras tomadas de sedimentos de lagos de Alaska, comprobándose la hipótesis planteada.

Entre las variables evaluadas la temperatura afectó significativamente la actividad metanogénica acetoclástica. Con los aportes de investigaciones previas y las realizadas como parte de este mismo proyecto (METHABASE) se puede concluir que además de la temperatura, son varios los factores que pueden potenciar o inhibir la producción de metano por parte de los microorganismos metanogénicos.

Con lo expuesto partiendo de la bibliografía y los resultados de este trabajo, se puede reafirmar la importancia de los lagos, y más específicamente los lagos de climas fríos en un escenario de calentamiento global, que dista de estar tan lejos en el tiempo. En el Ártico la abundancia de lagos es importante, y las consecuencias del aumento de la temperatura son graves para los ecosistemas circundantes y también para todo el planeta. El metano producido allí afecta a la atmósfera en general, y potencia el aumento de las temperaturas, generando una retroalimentación que sólo puede empeorar las condiciones climáticas actuales.

Alaska es actualmente un enorme reservorio de metano, y sus lagos en el futuro podrían emitir mayores cantidades de metano (Wik et al., 2016), si las temperaturas continúan aumentando el metano producido por los microorganismos metanogénicos se sumará al conservado en las grandes plataformas de hielo, y los resultados distan de ser favorables.

Partiendo de las respuestas obtenidas en este trabajo resulta evidente que quedan aún muchas cosas por hacer. Resultaría de gran interés evaluar el efecto de la temperatura en la actividad metanogénica

variando el sustrato a agregar, la metanogénesis hidrogenotrófica es también importante en los sedimentos, por lo que el agregado de H_2/CO_2 a las incubaciones puede arrojar información relevante.

Sumado a la evaluación de diferentes sustratos, los análisis moleculares para evaluar la presencia y/o abundancia de archaeas metanogénicas, enfocados en el gen *mcrA*, pueden aportar datos sobre los cambios en las comunidades metanogénicas asociados al aumento de la temperatura y/o la disponibilidad de sustratos. Saber qué archaeas se ven favorecidas por el aumento de la temperatura abriría más posibilidades de investigar específicamente esas poblaciones, para buscar especies centinela, o bien saber qué se puede esperar de la producción de metano por parte de estos microorganismos tomando en cuenta las variables específicas que puedan afectarlos.

Considerando también otras disciplinas además de la biología, resultaría muy interesante evaluar cómo afectaría el aumento de la temperatura la disponibilidad de los diferentes sustratos para la metanogénesis. Tener más claro las cantidades, los tipos y los momentos en los que los diferentes sustratos estarían disponibles sería crucial para determinar puntos críticos de producción de metano, siempre pensando en cómo contrarrestarlos.

Más allá del conocimiento generado para colaborar con la mitigación del efecto del calentamiento global, los resultados obtenidos en este trabajo pueden también aportar nuevas perspectivas para el tratamiento de desechos en países de climas fríos. Una de las tantas aplicaciones de la microbiología y la biotecnología es el tratamiento de desechos y aguas residuales, utilizando microorganismos que pueden degradar determinados compuestos en condiciones controladas, dentro de bioreactores. La producción de metano a bajas temperaturas podría resultar una buena herramienta para la utilización de bioreactores en países de climas fríos, y

de esta manera también colaborar a la disminución de las emisiones de metano a la atmósfera, generando biogás que pueda utilizarse posteriormente.

Este trabajo respondió algunas preguntas, corroborando el efecto del aumento de la temperatura en las emisiones de metano. Aun así el trabajo permite abrir otro abanico de preguntas y posibilidades que hacen visible la necesidad de continuar investigando en este tema, y destaca la importancia de sumar más esfuerzos en conocer causas y consecuencias de este fenómeno global, para intentar mitigar o revertir -en un escenario ideal- sus efectos.

8- BIBLIOGRAFÍA

Allan, J., Ronholm, J., Mykytczuk, N. C. S., Greer, C. W., Onstott, T. C., and Whyte, L. G. (2014) *Methanogen community composition and rates of methane consumption in Canadian High Arctic permafrost soils*. Environ Microbiol Rep, 6, 136–144.

AMAP (1998). *AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Issues*. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo, Norway. xii+859.

AMAP Assessment (2015). *Methane as an Arctic climate forcer*. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo, Norway. vii + 139.

Anisimov, O. A. (2007). Potential feedback of thawing permafrost to the global climate system through methane emission. *Environmental Research Letters*, 2(4), 045016–045022.

Anisimov, O.A., D.G. Vaughan, T.V. Callaghan, C. Furgal, et al.(2007). Polar regions (Arctic and Antarctic). Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. En: *M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds.*, Cambridge University Press, Cambridge, 653-685.

Aronson, E.L., Allison, S.D. and Helliker, B.R. (2013). *Environmental impacts on the diversity of methane-cycling microbes and their resultant function*. Frontiers in Microbiology. 4 (225), 1-15

Barbier, B. A., Dziduch, I., Liebner, S., Ganzert, L., et al (2012) *Methane-cycling communities in a permafrost-affected soil on Herschel Island, Western Canadian Arctic: active layer profiling of mcrA and pmoA genes*, FEMS microbiology ecology, 82(2), 287–302.

Bashkin, V.N. (2003). Biogeochemical Cycling of Macroelements. En: *Modern Biogeochemistry*. Springer, Dordrecht, 73-160

Bastviken, D., Cole, J., Pace, M., & Tranvik, L. (2004). *Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate*. Global Biogeochemical Cycles, 18(4), n/a.

Blake, L.I., Tveit, A., Øvreås, L., Head, I.M., et al (2015) *Response of Methanogens in Arctic Sediments to Temperature and Methanogenic Substrate Availability*. PLoS ONE, 10(6), e0129733.

Bodelier, P. L., & Steenbergh, A. K. (2014). *Interactions between methane and the nitrogen cycle in light of climate change*. Current Opinion in Environmental Sustainability, 9–10, 26–36.

Bohdalkova, L., Novak, M., Buzek, F., Kreisinger, J., et al. (2014) *The response of a mid- and high latitude peat bog to predicted climate change: methane production in a 12-month peat incubation*. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 19, 997–1010.

Bolin, Bert. (1970). *The Carbon Cycle*. Scientific American, 223, 125-132.

Borrel, G., Jézéquel, D., Biderre-Petit, C., Morel-Desrosiers, N., et al (2011). *Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems*. Research in Microbiology, 162(9), 832–847.

Bridgham S.D., Cadillo-Quiroz H., Keller J.K. & Zhuang Q. (2013). *Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales*. *Global Change Biology*, 19, 1325-1346.

Casper, P., Maberly, S.C., Hall, G.H. et al (2000). *Fluxes of methane and carbon dioxide from a small productive lake to the atmosphere*. *Biogeochemistry* 49, 1–19

Cavicchioli R. (2006). *Cold-adapted archaea*. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4(5),331-343.

Cohen, G.N. (2014). *Microbial Biochemistry*. 3rd Edition. Springer Dordrecht Heidelberg, New York, London.

Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.-L. , et al (2013). *Long-term Climate Change: Projections, Commitments and Irreversibility*. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Conrad R. (2009). *The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved*. *Environ. Microbiol. Reports*, 1, 285–292

Conrad, R., Bak, F., Seitz, H. J., Thebrath, B., et al (1989). *Hydrogen turnover by psychrotrophic homoacetogenic and mesophilic methanogenic bacteria in anoxic paddy soil and lake sediment*. *FEMS Microbiology Letters*, 62(5), 285–293.

Conrad, R., Klose, M. and Noll, M. (2009). *Functional and structural response of the methanogenic microbial community in rice field soil to temperature change*. *Environmental Microbiology*, 11, 1844-1853.

Coolen, M. J. L., and Orsi, W. D. (2015) *The transcriptional response of microbial communities in thawing Alaskan permafrost soils*. Front Microbiol 6, 1-14.

Crevecoeur, S., Vincent, W.F., Lovejoy, C. (2016) *Environmental selection of planktonic methanogens in permafrost thaw ponds*. Sci Rep.; 6 (31312), 1-11

Denman, K.L., Brasseur, G., Chidthaisong, A., Ciais, P., et al (2007). *Couplings Between Changes in the Climate System and Biogeochemistry*. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Duc, N. T., Crill, P., & Bastviken, D. (2010). *Implications of temperature and sediment characteristics on methane formation and oxidation in lake sediments*. Biogeochemistry, 100(1–3), 185–196.

Dunfield, P., Knowles, R., Dumont, R., Moore, T.R. (1993) *Methane production and consumption in temperate and subarctic peat soils: response to temperature and pH*. Soil Biol. Biochem., 25 (3), 321-326.

Elder, C.D., Xu, X., Walker, J. et al. (2018). *Greenhouse gas emissions from diverse Arctic Alaskan lakes are dominated by young carbon*. Nature Clim Change 8, 166–171

Fey, A., & Conrad, R. (2000). *Effect of Temperature on Carbon and Electron Flow and on the Archaeal Community in Methanogenic Rice Field Soil*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4790–4797.

Friberg T., Soegaard H., Christensen T. R., Lloyd C. R. et al (2003). *Siberian wetlands: where a sink is a source*. Geophys. Res. Lett. 30 (21), n/a

Ganzert, L., Jurgens, G., Münster, U., & Wagner, D. (2007). *Methanogenic communities in permafrost-affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian Arctic, characterized by 16S rRNA gene fingerprints*. FEMS Microbiology Ecology, 59(2), 476-488

Grace, J. (2013). Carbon Cycle. *En: Encyclopedia of Biodiversity* (Second Edition). Editor(s): Simon A Levin, Academic Press. Pages 674-684.

Greene, S., Walter Anthony, K. M., Archer, D., Sepulveda-Jauregui, A., and Martinez-Cruz, K. (2014). *Modeling the impediment of methane ebullition bubbles by seasonal lake ice*. Biogeosciences, 11, 6791–6811

Hanson, R.S., Hanson, T.E. (1996) *Methanotrophic Bacteria*. Microbiological reviews, 60(2), 439–471

He, R., Leigh, M.B., Wooller, M.J., Pohlman, et al (2012). *Shifts in identity and activity of methanotrophs in Arctic Lake sediments in response to temperature changes*. Applied and Environmental Microbiology. 78(13), 4715-4723.

Hedderich, R., Whitman, W. (2006). Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea. *En: Prokaryotes*. Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Dworkin, M. (Eds.), 1050-1079.

Høj, L., Olsen, R. A., & Torsvik, V. L. (2008). *Effects of temperature on the diversity and community structure of known methanogenic groups and other archaea in high Arctic peat*. ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 2(1), 37–48.

Howard, D., Agnan, Y., Helmig, D., Yang, Y., Obrist, D. (2020) *Environmental controls on ecosystem-scale cold-season methane and carbon dioxide fluxes in an Arctic tundra ecosystem*. Biogeosciences. 2020;17(15), 4025-4042

IPCC (2013). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change .Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, et al (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1029-1136

Jones, D.L. & Willett, V.B. (2006). *Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil*. Soil Biology and Biochemistry, vol. 38, no. 5, pp. 991–999

Jong, A.E.E., Zandt, M.H., Meisel, O.H., Jetten, M.S.M., et al (2018) *Increases in temperature and nutrient availability positively affect methane-cycling microorganisms in Arctic thermokarst lake sediments*. Environ Microbiol. Dec;20(12), 4314-4327.

Juutinen, S., Rantakari, M., Kortelainen, P., Huttunen, J. T., et al (2009). *Methane dynamics in different boreal lake types*. Biogeosciences, 6(2), 209–223.

Kallistova, A. Yu., Savvichev, A.S., Rusanov, I.I., Pimenov, N.V. (2019) *Thermokarst Lakes, Ecosystems with Intense Microbial Processes of the Methane Cycle*. Microbiology, 88(6), 649–661.

Kapur, D. (2019) *Radiative forcing* [online] Salem Press Encyclopedia of Science. Disponible desde: <<http://search.ebscohost.com>> [Acceso: 23 July 2019].

Karl, T. R. & Trenberth, K.E., (2003). *Modern Global Climate Change*. Science, 302, 1719-1723.

Knoblauch, C., Beer, Ch., Liebner, S., Grigoriev, M.N., Pfeiffer, E-M. (2018) *Methane production as key to the greenhouse gas budget of thawing permafrost*. Nat. Clim. Chang. 8, 309–312.

Le Mer, J. & Roger, P. (2001). *Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review*. Eur. J. Soil Biol. 37, 25–50.

Liu, P., Klose, M., Conrad, R. (2018) *Temperature effects on structure and function of the methanogenic microbial communities in two paddy soils and one desert soil*. Soil Biology and Biochemistry, 124, 236-244

Lofton, D.D., Whalen, S.C. & Hershey, A.E. (2014) *Effect of temperature on methane dynamics and evaluation of methane oxidation kinetics in shallow Arctic Alaskan lakes*. Hydrobiology 721, 209–222

Malyan, S.K., Bhatia, A., Kumar, A, Gupta, D.K., et al (2016). *Methane production, oxidation and mitigation: A mechanistic understanding and comprehensive evaluation of influencing factors*. Sci. Total Environ., 572, 874-896.

Margesin, R., Collins, T. (2019). *Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge*. Appl Microbiol Biotechnol 103, 2537–2549.

Marotta, H., Pinho, L., Gudas, C., Bastviken, D., et al (2014). *Greenhouse gas production in low-latitude lake sediments responds strongly to warming*. Nature Climate Change. 4(6), 467-470.

Martinez-Cruz, K., Leewis M-C., Herriott, I. Ch., Sepulveda-Jauregui, A., Walter, K., Thalasso, F., Leigh, M. B. (2017). *Anaerobic oxidation of methane by aerobic methanotrophs in sub-Arctic lake sediments*. Science of the Total Environment 607–608, 23–31.

Martinez-Cruz, K., Sepulveda-Jauregui, A., Anthony, K.W., Thalasso, F., (2015). *Geographic and seasonal variation of dissolved methane and aerobic methane oxidation in Alaskan lakes*. Biogeosciences 12, 4595–4606.

Martinez-Cruz, K., Sepulveda-Jauregui, A., Escobar-Orozco, N., Thalasso, F. (2012) *Methanogenic activity tests by Infrared Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy*. Journal of Microbiological Methods, 91(1), 89-92

Matheus Carnevali, P. B., Rohrsen, M., Williams, M. R., Michaud, A. B., et al (2015). *Methane sources in arctic thermokarst lake sediments on the North Slope of Alaska*. Geobiology 13, 181–197.

Matheus Carnevali, P.B., Herbold, C.W., Hand, K.P., Priscu, J.C. and Murray A.E. (2018) *Distinct Microbial Assemblage Structure and Archaeal Diversity in Sediments of Arctic Thermokarst Lakes Differing in Methane Sources*. Front. Microbiol. 9(1192), n/a

McCalley, C. K., Wehr, R. A., Saleska, S. R., Woodcroft, B. J., et al (2014) *Methane dynamics regulated by microbial community response to permafrost thaw*. Nature 514, 478–481.

Megonigal, J.P., Mines, M.E. and Visscher, P.T. (2005). Anaerobic Metabolism: Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes. En: *Treatise on Geochemistry*, Elsevier Ltd., 317-424

Meredith, M., Sommerkorn, M., Cassotta, S., Derksen, C., et al (2019) Polar Regions. En: *IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate*. H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, V. Masson-Delmotte, P. Zhai, M. Tignor, E. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Nicolai, A. Okem, J. Petzold, B. Rama, N.M. Weyer (eds.). In press, 203-320

Moraes, B.S., Zaiat, M & Bonomi, A. (2015). *Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 44, 888-903.

Northington, R. M., & Saros, J. E. (2016). Factors Controlling Methane in Arctic Lakes of Southwest Greenland. En: *Advancing knowledge of Earth's frozen regions*. . PLoS ONE, 11(7), 1–17.

NSIDC (2017). *SOTC: Permafrost and Frozen Ground* [Internet], National Snow and Ice Data Center. Disponible desde: <<https://nsidc.org/cryosphere/sotc/permafrost.html>> [Acceso: Julio 2019]

Paytan, A., Lecher, A. L., Dimova, N., Sparrow, K. J., et al (2015). *Methane transport from the active layer to lakes in the Arctic using Toolik Lake, Alaska, as a case study*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(12), 3636-3640

Pearce, J. M., DeGange, T., Flint, P., Fondell, T., et al (2012) *Changing arctic ecosystems : measuring and forecasting the response of Alaska's terrestrial ecosystem to a warming climate*. U.S. Geological Survey Fact Sheet 2012-3144, 4 p.

Rasilo, T., Prairie, Y. T., and Del Giorgio, P. A. (2014) *Large-scale patterns in summer diffusive CH₄ fluxes across boreal lakes, and contribution to diffusive C emissions*, Glob. Change Biol., 21, 1124–1139.

- Reay, D. S., Nedwell, D. B., McNamara, N., and Ineson, P. (2005). *Effect of tree species on methane and ammonium oxidation capacity in forest soils*. Soil Biol. Biochem. 37, 719–730
- Saunois, M., Bousquet, P., Poulter, B., Peregon, A., et al (2016). *The global methane budget 2000–2012*, Earth Syst. Sci. Data, 8, 697–751
- Schulz, S., Matsuyama, H., and Conrad, R. (1997). *Temperature dependence of methane production from different precursors in a profundal sediment (Lake Constance)*, Fems Microb Ecol, 22, 207–213.
- Schuur, E., McGuire, A., Schädel, C., Grosse, G., et al (2015). *Climate change and the permafrost carbon feedback*. Nature 520, 171–179
- Semiletov, I.P., Pipko, I.I., Pivovarov, N. Ya., Popov, V.V., et al (1996). *Atmospheric carbon emission from North Asian Lakes: a factor of global significance*. Atmospheric Environment, 30(10/11), 1657-1671.
- Semrau, J.D., DiSpirito, A.A., Yoon, S. (2010). *Methanotrophs and copper*. FEMS Microbiology Reviews, 34(4), 496–531
- Sepulveda-Jauregui, A., Walter Anthony, K.M. , Martinez-Cruz, K., Greene, S., and Thalasso, F. (2015). *Methane and carbon dioxide emissions from 40 lakes along a north–south latitudinal transect in Alaska*. Biogeosciences, 12, 3197–3223.
- Shelton, D. R., & Tiedje, J. M. (1984). *General method for determining anaerobic biodegradation potential*. Applied and environmental microbiology, 47(4), 850-857.
- Singh, B.K., Bardgett, R.D., Smith, P., Reay, D.S (2010) *Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options*. Nature Reviews Microbiology, 8, Nov. 779-790

Söllinger A. & Urich, T (2019) *Methylophilic methanogens everywhere — physiology and ecology of novel players in global methane cycling*. Biochemical Society Transactions (2019), 47, 1895–1907

Thauer, R. K. (1998). *Biochemistry of methanogenesis: A tribute to Marjory Stephenson*. Microbiology 144, 2377–2406.

van der Linden P. & Mitchell, J.F.B. (2009). ENSEMBLES: Climate Change and its Impacts: *Summary of research and results from the ENSEMBLES project*. Met Office Hadley Centre, UK. 1-160.

Vigneron, A., Cruaud, P., Bhiry, N., Lovejoy, C., Vincent, W.F. (2019) *Microbial Community Structure and Methane Cycling Potential along a Thermokarst Pond-Peatland Continuum*. Microorganisms 2019, 7(486), 1-15.

Walter Anthony, K., Daanen, R., Anthony, P., Schneider von Deimling, T., et al (2016). *Methane emissions proportional to permafrost carbon thawed in Arctic lakes since the 1950s*. Nature Geosci 9, 679–682

Whitman W.B., Bowen T.L., Boone D.R. (2014). The Methanogenic Bacteria. En: *The Prokaryotes*. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds). Springer, Berlin, Heidelberg, 123-163

Wik, M., Varner, R., Anthony, K., MacIntyre, S., Bastviken, D. (2016). *Climate-sensitive northern lakes and ponds are critical components of methane release*. Nature Geosci 9, 99–105

Winterstein, F., Tanalski, F., Jöckel, P., Dameris, M. and Ponater, M. (2019). *Implication of strongly increased atmospheric methane concentrations for chemistry–climate connections*. Atmospheric Chemistry and Physics, 19, 7151–7163.

Woo M. (2012) Introduction. En: *Permafrost Hydrology*. Springer, Berlin, Heidelberg. 1-34

Zandt, M. H., Liebner, S. and Welte, C. U. (2020) *Roles of Thermokarst Lakes in a Warming World*, Trends in Microbiology, 28(9), 769–779.

Zhang, L., Liu, X., Duddleston, K., Hines, M.E. (2020) *The Effects of pH, Temperature, and Humic-Like Substances on Anaerobic Carbon Degradation and Methanogenesis in Ombrotrophic and Minerotrophic Alaskan Peatlands*. Aquat Geochem. 26(3), 221–244

ANEXO 1

PROTOCOLOS ERANET

Actividad metanogénica acetoclástica potencial

C. Lavergne, P. Aguilar y L. Cabrol (2016)

Material:

- Viales de vidrio de 10 mL (16 por muestra) + 1 gradilla
- Tapones de tabique (ref: 2048-11800)
- Sellos de crimpado de aluminio + crimpadora
- Agujas verdes (21G 1 ")
- Espátula + tijeras inox
- Placa de Petri

Equipo:

- Cámara anaeróbica: "Glove box"
- Balanzas
- Incubadora 5 ° C
- Incubadora 10 ° C
- Incubadora 15 ° C
- Incubadora 20 ° C
- Manómetro (rango: 0-300 mbar)
- Manómetro (rango > 300 mbar)

- GC con TCD (ver detalles del método)
- Tanque de N₂

Nota 1: es necesario conocer la cantidad de sólidos volátiles (SV) contenidos en cada muestra antes de iniciar cualquier experimento

Nota 2: La incubación se realiza a pH variable en función del pH de la muestra. Por lo tanto, se deberá conocer el pH *in situ* de la muestra y determinar algún grupo de pH similar para preparar la solución de sustrato. Por ejemplo, si tiene 5 muestras con pH: 4.5, 4.7, 5.5, 6, 5.8. Puede optar por hacer grupos y preparar una solución a pH 4,5 y otra a pH 5,8.

Cómo proceder:

1. Para hacer con anticipación:

Calcule la cantidad de muestra para agregar en cada vial. Por defecto, agregue 8 g SV L-1, es decir 0.08 g SV por 10 mL.

Limpiar todo el material. Los viales (16 por muestra) se pueden limpiar una noche en baño ácido y enjuagar al menos 3 veces con agua destilada y dejar secar (idealmente en una cámara caliente a 45 ° C). Cerrar los viales con papel de aluminio y cinta adhesiva. Los tapones de tabique se pueden limpiar con jabón y enjuagar con agua destilada. Luego, autoclave todo el material, 20 min a 120 ° C.

2. Preparación del sustrato

	Modificado de Shelton & Tiedje (g L ⁻¹)	CAS
KH₂PO₄	0,27	7778-77-0
K₂HPO₄	0,35	7758-11-4
MgCl₂, 6 H₂O	0,1	7791-18-6
NH₄Cl	0,53	12125-02-9
CaCl₂, 2 H₂O	0,075	10035-04-8
NaCl	0,6	7647-14-5
<i>Solución mineral</i>	20 mL	

Agregar 930 mL de agua destilada

Autoclave

Acetato	30 mM (1,7 mL)	64-19-7
Cisteína, HCl	0,5	7048-04-6
Na₂S, 9H₂O	0,1	27610-45-3
NaHCO₃	1,5	144-55-8

Ajustar pH

<i>Solución mineral</i>	Concentración en solución concentrada (mg/L)	Concentración final (g/L)	CAS
FeCl ₃ *4H ₂ O	1000	0,02	10025-77-1
CoCl ₂ *6H ₂ O	1000	0,02	7791-13-1
MnCl ₂ *4H ₂ O	250	0,005	13446-34-9
CuCl ₂ *H ₂ O	15	0,0003	10125-13-0

ZnCl ₂	25	0,0005	7646-85-7
H ₃ BO ₃	25	0,0005	10043-35-3
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	50	0,001	12054-85-2
Na ₂ SeO ₃ *H ₂ O	50	0,001	10102-18-8
NiCl ₂ *6H ₂ O	25	0,0005	7791-20-0
EDTA	500	0,01	60-00-4
HCl (36%)	0,5	0,00001	7647-01-0
Resazurina	250	0,005	62758-13-8

- En un matraz aforado, poner 930 mL de agua destilada
- Pese cada producto en un vaso de plástico y transfíralo en una botella estéril de 1L.
- Luego enjuague con el agua destilada preparada.
- Renueve este procedimiento para cada producto que tenga que agregar.
- Autoclave

Tenga en cuenta que esta primera parte podría prepararse con anticipación. Después del paso de autoclave, se puede almacenar a temperatura ambiente. La solución debe ser violeta / azul. Una vez que agregas el acetato, la cisteína, el Na₂S y el NaHCO₃, la solución se vuelve naranja / rosa (según el pH y el estado de oxidación), y puede usarse dentro de los 2 días.

- Agregue los componentes restantes, gasear 2 minutos con N₂
- Ajustar el pH según el pH de la muestra (o del grupo, ver Nota 2). Deberá preparar una solución de NaOH y HCl para ajustar el pH.

- Gasear 2 minutos con N₂

3. Preparación de los viales

Deberá llenar los frascos con muestras sólidas y agregar sustrato hasta 10 mL. Tendrás que preparar con antelación un modelo de vial con 10 mL de agua para poder saber cómo llenar tus viales.

- Poner número a los viales y los tapones.

- En la cámara anaeróbica: Limpiar la cámara con etanol; coloque papel, espátulas limpias, tijeras limpias, una placa de Petri limpia (podría reutilizarse algunas veces si se limpia cada vez con etanol) y una muestra dentro de la cámara. Retire el aire, cierre la cámara y llénela con N₂ (la presión no debe exceder 1 bar para la presión aplicada). Luego, homogeneice la muestra mezclándola a mano y cortándola si es necesario. Llenar la placa de Petri con la muestra homogeneizada. Cerrar bien la bolsa de la muestra y abrir la cámara.

- Pesar vial vacía con tapón. Registre el peso (W1)

- Tarar la balanza con el vial vacío sin tapón.

- Agregue la cantidad de muestra necesaria. Ej: si necesitas 1.4256, pesa entre 1.42 y 1.43. Registra el peso (W2).

- Coloca los tapones en los viales (sin cerrarlo de verdad porque tendrás que abrirlo para agregar el sustrato)

- Una vez listos los 16 viales, volver a la cámara anaeróbica, poner los viales (en una rejilla, + el vial modelo), el frasco de sustrato, una Erlenmeyer limpia, una pipeta plástica estéril (para agregar el sustrato) y papel. Abre los viales.

- Sacar el aire de la cámara, cerrar la cámara, llenar con N₂.

- Mezclar bien el sustrato, transferirlo al Erlenmeyer
- Gasear de nuevo el sustrato brevemente
- Con la pipeta de plástico, llene los frascos utilizando el “vial modelo” como guía.
- Cerrar los viales con los tapones correspondientes.
- Pesar los viales, anotar el peso (W3)
- Sellar el tapón con precintos engarzados de aluminio. Etiquete los viales (nombre de la muestra, temperatura, fecha y réplica: P1, P2, P3 o GC)
- Incubar cada botella a la temperatura correspondiente.
- Entre las 5h y las 24h, proceder al T0 evacuando el gas contenido en el vial. Para hacerlo, simplemente pinche con una aguja durante 5 segundos. Anote la fecha y la hora.

4. Medidas de presión

Procedimiento

- Tome los viales P1, P2 y P3 (la réplica de GC es solo para mediciones de GC). Para las incubaciones a 5°C y 10 ° C, piense en mantener refrigerados los viales. Colóquelos en una caja de plástico ubicada en una bolsa de hielo, por ejemplo.
- Fijar una aguja al manómetro.
- Compruebe si el manómetro muestra un valor cercano a 0 (entre - 0,5 y 0,5 mbar)
- Pinche en el tapón de goma sin tocar el agua.
- Espere un valor estable, anote el valor

- Si el valor de la presión es positivo, es necesario evacuar el aire. Para hacer eso, pinche el vial con una aguja 5 segundos.

5. Mediciones de GC

Características de GC

Columna de 1/8 "de diámetro * 1 mm de largo. Tamiz mol 5A (60/80), temperatura de la columna = 80 ° C, inyector y detección = 120 ° C.

Procedimiento:

- Haga una medida de su estándar por duplicado (250 µL). Registre el área del pico.

- Agitar fuertemente el frasco con la mano durante 5 segundos.

- Pinche con cuidado con la jeringa específica. Inyectar 250 µL. Si el pico es demasiado alto, hago una dilución de la siguiente manera: tomar 100 µL de la muestra y tomar aire hasta 250 µL. Generalmente es suficiente para las medidas que tenemos que hacer. Registre el área del pico

- Luego, puede calcular el % de metano en su vial

6. El final de la incubación

La incubación ha terminado, cuando la curva acumulativa alcanza una meseta.

- Al final de las incubaciones, agite vigorosamente el frasco y transfíralo a un tubo de centrifuga de 15 mL.

- Centrifugar 20 min a 4500 rpm.

- Si el vial aún contiene muestra, use el sobrenadante (o hasta 10 mL de agua esterilizada) para enjuagar la botella y centrifugar nuevamente.

- Deseche el sobrenadante y almacene en un Falcon a -20 ° C para la extracción de ADN.