



Evaluación del biocarbón derivado de cascarilla de arroz como potenciador del establecimiento y proliferación de bacterias en suelos no perturbados

Stefanía Belalcázar Serrano

ASESOR DE INVESTIGACIÓN

Dra. Thaura Ghneim Herrera

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
BIOLOGÍA  
SANTIAGO DE CALI

2013

**EVALUACIÓN DEL BIOCARBÓN DERIVADO DE CASCARILLA DE ARROZ  
COMO POTENCIADOR DEL ESTABLECIMIENTO Y PROLIFERACIÓN DE  
BACTERIAS EN SUELOS NO PERTURBADOS**

**STEFANÍA BELALCÁZAR SERRANO**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
BIOLOGÍA  
CALI  
2013**

**EVALUACIÓN DEL BIOCARBÓN DERIVADO DE CASCARILLA DE ARROZ  
COMO POTENCIADOR DEL ESTABLECIMIENTO Y PROLIFERACIÓN DE  
BACTERIAS EN SUELOS**

**STEFANÍA BELALCÁZAR SERRANO**

**Trabajo de Grado**

**Dra. Thaura Ghneim Herrera.  
Laboratorio de Fisiología Vegetal  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias Naturales  
Universidad Icesi**

**MSc. Andrés Dávalos Velez  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias Naturales  
Universidad Icesi**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
BIOLOGÍA  
CALI  
2013**

## Tabla de contenido

1.	Resumen del proyecto.....	8
2.	Introducción.....	9
3.	Planteamiento del problema.....	10
4.	Marco teórico y estado del arte.....	11
4.1.	Agricultura en Colombia y uso de biofertilizantes.....	11
4.2.	El biocarbón (biochar) como enmienda orgánica.....	11
4.3.	Las bacterias como componentes fundamentales del suelo.....	13
5.4.	Calidad del DNA, metagenómica y construcción de librerías genéticas..	14
4.5.	Abundancia y diversidad de comunidades bacterianas en suelo.....	16
4.6.	El uso de fluorocromos para la enumeración directa de bacterias en muestras ambientales.....	18
5.	Objetivo general.....	19
5.1.	Objetivos específicos.....	19
6.	Metodología.....	20
6.1.	Obtención de biocarbón derivado de cascarilla de arroz.....	20
6.2.	Tratamientos Experimentales.....	20
6.3.	Recolección de muestras de suelo en campo y tratamiento del suelo.....	21
6.4.	Aislamiento de la fracción cultivable de microorganismos del suelo para validación de esterilidad.....	22
6.5.	Diseño Experimental.....	22
6.6.	Extracción de ADN bacteriano.....	22
6.7.	Análisis de la abundancia de bacterias.....	23
6.8.	Análisis de diversidad de microorganismos mediante DGGE.....	24
6.9.	Análisis fisicoquímicos del suelo.....	25
7.	Cronograma de actividades.....	27
8.	Resultados.....	28
8.1.	Montaje experimental y monitoreo de temperatura.....	28
8.2.	Manejo de muestras y análisis de laboratorio.....	29
8.3.	Confirmación de presencia de bacterias en el suelo y validación del proceso de esterilización.....	29
8.4.	Extracción de ADN bacteriano.....	30
8.5.	Amplificación del gen 16S rARN mediante PCR.....	32

8.6.	Abundancia de bacterias mediante técnica de fluorescencia (DAPI).....	35
8.7.	Determinación de biomasa microbiana mediante la técnica de extracción mediante la fumigación con cloroformo.....	37
8.8.	Análisis de diversidad bacteriana mediante la técnica de DGGE .....	39
8.9.	Características físico-químicas del suelo y del biocarbón derivado de la cascarilla de arroz .....	42
9.	Discusión .....	45
10.	Potenciales beneficiarios .....	50
11.	Impacto ambiental.....	51
12.	Conclusiones.....	52
13.	Recomendaciones .....	53
14.	Referencias.....	54
15.	ANEXOS.....	59

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos experimentales escogidos para evaluar el efecto del biocarbón derivado de cascarilla de arroz sobre la abundancia y diversidad de comunidades bacterianas establecidos para cada uno de los tiempos de muestreo.....	19
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S rARN (región hipervariable V3) a partir de muestras de suelo.....	24
<b>Tabla 3.</b> Matriz de marco lógico.....	25
<b>Tabla 4.</b> Bacterias totales cuantificadas mediante tinción no fluorescente no específica con DAPI.....	34
<b>Tabla 5.</b> Biomasa microbiana en suelo no estéril incubado en presencia o ausencia de biocarbón.....	37
<b>Tabla 6.</b> Caracterización fisicoquímica de suelo no estéril en ausencia y presencia de biocarbón.....	41
<b>Tabla 7.</b> Caracterización fisicoquímica del biocarbón derivado de cascarilla de arroz.....	42
<b>Tabla 8.</b> Rendimiento de tres bio-productos derivados de diferentes tipos de biomasa bajo condiciones limitadas de oxígeno por 60 minutos a 400°C.....	58

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Temperaturas registradas durante los meses de septiembre, octubre y noviembre de 2013 bajo condiciones de laboratorio.....	27
<b>Figura 2.</b> Fotografías representativas de bacterias cultivables presentes a los 0 días.....	28
<b>Figura 3.</b> ADN extraído del suelo bajo los distintos tratamientos experimental....	30
<b>Figura 4.</b> ADN total en las distintas muestras antes de la amplificación de la región V3 del gen 16S rARN.....	31
<b>Figura 5.</b> Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos luego de la amplificación del gen 16S rARN con los iniciadores 518F y 800R.....	32
<b>Figura 6.</b> Amplificación del gen 16S rARN con lo iniciadores 518F y 800R.....	33
<b>Figura 7.</b> PCR anidado con los iniciadores 518F-GC y 800R.....	34
<b>Figura 8.</b> Fotografías de bacterias teñidas con DAPI.....	35
<b>Figura 9.</b> DGGE para muestras de suelo estéril.....	38
<b>Figura 10.</b> DGGE en muestras de suelo no estéril.....	40

## 1. Resumen del proyecto

La producción y aplicación de biomasa pirolizada (biocarbón) al suelo, ha sido una herramienta utilizada para el almacenamiento de carbono en ecosistemas terrestres (Khodadad et al., 2011). El biocarbón puede incrementar la fertilidad del suelo mientras reduce el uso de agua y de fertilizantes químicos. El aumento en la fertilidad del suelo está relacionado con la capacidad del biocarbón para absorber e intercambiar nutrientes y materia orgánica, pero también con su efecto positivo sobre la abundancia y diversidad de microorganismos (Khodadad et al., 2011).

El procesamiento industrial del arroz genera, como material de desecho, toneladas de cascarilla de arroz. Tradicionalmente, la cascarilla se ha empleado en la producción de alimentos animales y como componente de mezclas de suelo utilizadas en jardinería. Recientemente ha surgido interés en explotarla como materia prima para la producción de biocarbón, para ello se debe evaluar su potencial para generar los efectos benéficos observados con otros tipos de biocarbones.

El presente proyecto evaluó los cambios en la abundancia y diversidad de comunidades bacterianas presentes en un suelo no perturbado procedente de un parche de bosque primario, en respuesta a la aplicación de biocarbón derivado de cascarilla de arroz pirolizada a 500°C.

La abundancia de bacterias se determinó a partir de dos metodologías: 1) Estimación de biomasa microbiana a partir de la técnica fumigación con cloroformo-extracción 2) Estimación de número de microorganismos mediante tinción fluorescente no específica con el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI)

El análisis de diversidad bacteriana se realizó mediante la técnica de electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), utilizando fragmentos amplificados de la región V3 del gen 16S rARN. Tanto los análisis de abundancia bacteriana como de diversidad se realizaron a los 0, 30 y 60 días de incubación del suelo en presencia y ausencia de biocarbón.

Nuestros resultados indican que el biocarbón derivado de cascarilla de arroz promueve la abundancia y diversidad de bacterias en suelos no perturbados.

## 2. Introducción

El biocarbón es un material sólido obtenido a partir de la carbonización de biomasa. Este producto se encuentra alrededor del mundo como consecuencia de incendios de vegetación que ocurren de forma espontánea. Reportado por muchos estudios y fundamentado en observaciones de prácticas agrícolas ancestrales (*Terra Preta*), la adición de este carbón al suelo mejora condiciones edáficas como la fertilidad, disponibilidad de nutrientes, productividad, intercambio catiónico, abundancia y diversidad de microbiota (Augustenborg et al., 2012).

Recientemente la producción de biocarbón a nivel industrial se ha llevado a cabo mediante el proceso de pirólisis (Jahirul et al., 2012). Sin embargo las características y propiedades del biocarbón se ven afectadas por la temperatura y el tiempo de pirólisis así mismo como por el tipo de biomasa a partir de la cual el biocarbón es obtenido (Ippolito et al., 2012).

La creciente necesidad por sustituir los fertilizantes químicos por los de origen orgánico ha puesto al biocarbón como una estrategia efectiva a corto plazo en el campo de la agricultura y el manejo de suelos, además de utilizar algunos desechos vegetales producidos por la industria de alimentos y hacer uso de algunos desechos vegetales de la producción de alimentos.

El presente trabajo evaluó mediante métodos moleculares y microbiológicos la abundancia y diversidad de bacterias en respuesta a la adición de biocarbón. De manera complementaria se obtuvieron resultados sobre los análisis fisicoquímicos del suelo no perturbado. Todo esto con el fin de tener una primera aproximación al entendimiento de la acción del biocarbón sobre suelos no intervenidos, con miras a implementar el uso del biocarbón como una enmienda orgánica para la recuperación de las características físicas, químicas y biológicas en suelos de sistemas intervenidos por prácticas agrícolas.

### 3. Planteamiento del problema

#### **¿El biocarbón derivado de cascarilla de arroz favorece el establecimiento y proliferación de microorganismos en suelos sometidos a explotación agrícola?**

La producción agrícola a nivel nacional, es uno de los principales canales a través de los cuales actúa la geografía sobre el crecimiento y desarrollo económico del país (Galvis, 2001). Sin embargo, aunque la agricultura intensiva ha aumentado el rendimiento de las cosechas, al mismo tiempo ha causado graves problemas ambientales (Galvis, 2001). Uno de los problemas directamente relacionados a la producción agrícola es la degradación de suelos en zonas cultivadas, debido a las prácticas de manejo de suelo inherentes a cada cultivo. Tal degradación incluye cambios en las propiedades físicas (estructura) y químicas (fertilidad, salinidad, etc.) del suelo y en la composición y abundancia de la microbiota. Estudios realizados en las últimas décadas indican que la aplicación de biocarbón generado a partir de material vegetal contribuye a la recuperación de las propiedades físicas y químicas de los suelos agrícolas y aumenta el rendimiento de los cultivos (Zimmerman et al., 2011). Investigaciones recientes sugieren que el biocarbón promueve el establecimiento de microorganismos del suelo, especialmente de hongos y bacterias, los cuales contribuyen a la fertilidad y a la promoción del crecimiento vegetal (Knicker, 2011). No obstante, aunque la aplicación de biocarbón esta dirigida a sistemas agrícolas, es importante observar el efecto del biocarbón sobre un suelo sano, como una primera aproximación, a fin de evitar limitaciones a nivel metodológico al momento de analizar suelos agrícolas.

Este proyecto contribuirá con la generación de conocimiento acerca de las propiedades del biocarbón, como una alternativa para el establecimiento de comunidades bacterianas importantes para el desarrollo y crecimiento de las plantas de cultivo. La investigación representa un aporte para el planteamiento de estrategias dirigidas a incrementar el rendimiento de los cultivos en suelos degradados. La información generada por este proyecto será importante para el sector agrícola, contribuyente importante al desarrollo económico en Colombia.

## **4. Marco teórico y estado del arte**

### **4.1. Agricultura en Colombia y uso de biofertilizantes**

La creciente demanda de productos agrícolas para la alimentación y transformación de bienes de consumo por parte de la sociedad moderna, ha suscitado un inmenso desarrollo del sector agrícola en las últimas décadas (Carvajal & Mera, 2010). Como resultado de ello se ha percibido la necesidad de emplear métodos que permitan mejorar la eficiencia de los cultivos y mitigar los efectos adversos sobre el suelo y el ambiente.

Una de las alternativas más exploradas y promisorias en este campo, pues ha mostrado buenos resultados, es la utilización de biofertilizantes en suelos afectados por la agricultura (Parr & Hornick, 1992). Estos fertilizantes son insumos naturales como abonos, restos de materia orgánica en descomposición, excesos de cosechas que ayudan a restablecer la composición y estructura de los suelos degradados mediando procesos como la regulación del pH, la incorporación de nutrientes necesarios para las plantas, retención de la humedad del suelo y mejoría de su textura. Así mismo, los microorganismos se han convertido en uno de los biofertilizantes más utilizados debido a que tienen la capacidad de transformar muchos compuestos químicos en compuestos disponibles para la plantas (Ettwig, et al., 2010)

### **4.2. El biocarbón (biochar) como enmienda orgánica**

La palabra inglesa “biochar” significa biocarbón. Este término relativamente nuevo, hace referencia a un producto de grano fino y poroso similar en apariencia al carbón vegetal. Se produce a partir de un proceso denominado pirólisis, que consiste en la descomposición química de sustancias orgánicas a altas temperaturas y en ausencia de oxígeno (Verheijen et al., 2010). Sin embargo, en términos prácticos realizar un proceso de pirólisis en ausencia total de oxígeno no es posible, por lo que siempre ocurre una oxidación mínima de materia orgánica (Verheijen et al., 2010)

Hay varios factores en el proceso de producción del biocarbón que determinan sus características y por ende los efectos que pueda tener sobre el suelo y la microbiota. Uno de los factores determinantes en la estructura y función del biocarbón es el tipo de biomasa utilizada. Para la producción de biocarbón se utiliza comúnmente restos de materia orgánica en descomposición, desechos de cultivos, mazorcas ó cáscaras de nueces, entre muchos otros. El efecto del tipo de biomasa utilizada va a depender del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, ya que la descomposición de estos compuestos depende de ciertos rangos de temperatura y por ende el rendimiento del biocarbón se ve influenciado (Zheng et al., 2010) (ANEXOS, Tabla 8).

La temperatura de pirólisis y el tiempo de residencia también van a ser factores determinantes sobre la estructura y función del biocarbón. Actualmente se conocen tres tipos de pirólisis: la pirólisis rápida, pirólisis lenta y gasificación. Para la producción de biocarbón se utiliza la pirólisis lenta debido a que hay un mayor rendimiento de subproducto sólido (biocarbón) que de subproducto líquido (bioóleo) y gaseoso (syngas) (Sohi et al., 2009). La pirólisis lenta consiste en utilizar una temperatura baja-moderada entre 400°C y 650°C, un reactor operando a presión atmosférica y un tiempo de residencia largo (Sohi et al., 2009).

El bajo contenido de nutrientes y la acelerada mineralización (transformación de nitrógeno orgánico en amonio) de la materia orgánica presente en el suelo son dos de las mayores problemáticas a las cuales se enfrenta la agricultura (Zheng et al., 2010). Como consecuencia, el biocarbón, como producto de origen natural, ha entrado a jugar un rol importante dentro de la agricultura como enmienda orgánica, debido a sus potenciales efectos beneficiosos en el secuestro de carbono en el suelo, el rendimiento de los cultivos y la lixiviación de nutrientes (Koide et al., 2011). El biocarbón guarda una similitud con el carbón activado, el cual reacciona con moléculas orgánicas tóxicas adsorbiéndolas y disminuyendo su disponibilidad en el suelo (Hilber et al., 2009) por lo que se le puede atribuir que también este involucrado en este proceso de adsorción, sin ser elementos idénticos (Bailey et al., 2010). Adicionalmente debido a la textura y estructura del biocarbón, la humedad en el suelo aumenta, permitiendo que se genere un ambiente propicio para el establecimiento de la microbiota (Abenza, 2012)

La aplicación de este biocarbón en suelos, se debe al descubrimiento de partículas similares al carbón en suelos muy fértiles con un alto contenido de carbono en el Amazonas de Brasil, denominados localmente como *Terra Preta* (Abenza, 2012). El origen de la denominada *Terra Preta*, se remonta a prácticas ancestrales como el carboneo de leña, llevadas a cabo por culturas indígenas, dando origen a una alta calidad y productividad de los cultivos (Abenza, 2012).

### **4.3. Las bacterias como componentes fundamentales del suelo**

Con el acelerado crecimiento de la población mundial, la demanda por alimentos y la presión sobre las áreas cultivables se hace cada vez mayor (Lili & Ma, 2009). Para poder suplir esta demanda, los agricultores han aumentado el uso de fertilizantes químicos con el fin de incrementar el rendimiento de los cultivos (Lili & Ma, 2009). Sin embargo, el uso excesivo de este tipo de fertilizantes, impacta negativamente la estructura y composición del suelo debido a que afectan procesos como el intercambio catiónico, producen abruptos cambios de pH en el suelo, resultando eventualmente en una reducción en el rendimiento de los cultivos debido a la limitación de las plantas de absorber los nutrientes del suelo (Lili & Ma, 2009). Cada vez se hace más urgente la implementación de prácticas agrícolas más amigables con el ambiente, que aprovechen los microorganismos del suelo en vehículos (sustratos, biofertilizantes) que aceleren el proceso de recuperación de suelos degradados.

La microbiota del suelo es de gran importancia, pues interviene en una variedad de procesos, entre ellos la descomposición y mineralización de la materia orgánica, formación y estabilización de los agregados de suelo, participación en los ciclos biogeoquímicos, además de constituir un reservorio lábil de elementos nutritivos. Debido a esto, la microbiota del suelo es considerada como un agente decisivo tanto en la fertilidad del suelo como en la alimentación de las plantas (Sivila & Hervé, 1999).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno, por ejemplo, son los microorganismos que más intervienen en el mantenimiento de la fertilidad del suelo. El nitrógeno es un componente esencial para el crecimiento vegetal, además de ser un compuesto involucrado en procesos metabólicos (Lili & Ma, 2009). En los ecosistemas agrícolas, la disponibilidad de nitrógeno presente en el suelo es una limitante en la producción de los cultivos. Aunque la atmósfera está compuesta por aproximadamente 80% de  $N_2$ , este nitrógeno no está disponible para las plantas y debe ser “fijado” a otras formas del compuesto, como amonio ( $NH_4$ ) o nitrato ( $NO_3$ ), para poder ser absorbido y utilizado por las plantas (Lili & Ma, 2009). En este proceso de conversión de una forma química a otra, es donde las bacterias fijadoras de nitrógeno cumplen un rol biológico fundamental, suministrando el nitrógeno necesario que las plantas necesitan.

Hay varios estudios que evidencian que la biomasa microbiana ha incrementado en suelos tratados con biocarbones (Elad et al., 2011). El biocarbón, también causa cambios significativos en la composición de las comunidades microbianas y la actividad enzimática tanto en suelos como en la rizósfera (Elad et al., 2011). Esto se debe a la generación de nicho en el suelo a causa de los cambios físicos que son generados por el biocarbón, de igual forma las comunidades bacterianas se ven favorecidas por el aumento en la disponibilidad de nutrientes, como se mencionó anteriormente. Igualmente el secuestro de carbono atmosférico por parte del biocarbón influye positivamente sobre la microbiota del suelo.

Hasta el momento, se ha demostrado que el biocarbón incrementa la abundancia de los filos Actinobacteria y Bacteroidetes (Elad et al., 2011). Aunque aún se explora como el biocarbón afecta la abundancia microbiana y la estructura de comunidades, es bien conocido el hecho de que los microorganismos del suelo tienen un alto impacto en la productividad de la planta.

La estructura molecular del biocarbón, aparenta tener un alto grado de estabilidad química y microbiana. Una de las características físicas de los biocarbones obtenidos a partir de diferentes tipos de biomasa, es la alta estructura porosa y una gran área de superficie (Atkinson et al., 2010). Esta estructura provee refugio para otros microorganismos beneficiosos como las micorrizas (Atkinson et al., 2010), las cuales promueven la disponibilidad de macronutrientes esenciales para la planta como nitrógeno y fósforo (Atkinson et al., 2010). Adicionalmente se ha observado que microorganismos filamentosos, dentro de los cuales se encuentran los hongos, son capaces de infiltrar las partículas del biocarbón, facilitando su degradación (Khodadad et al., 2011).

En el caso del biocarbon derivado de cascarilla de arroz, se han reportado estudios sobre su efecto positivo como enmienda sobre el aumento de la porosidad del suelo, el contenido de agua del suelo, el pH, el carbono orgánico, el fósforo y el calcio disponible (Masulili et al., 2010) y su efecto indirecto sobre la productividad de cultivos de arroz en suelos ácidos. Estas propiedades representarían el uso de toneladas de cascarilla de arroz, producto final de desecho de la cadena de producción de arroz como enmienda orgánica

#### **5.4. Calidad del DNA, metagenómica y construcción de librerías genéticas**

El suelo es uno de los ambientes más complejos de estudiar, conteniendo una alta diversidad de microorganismos (involucrados en procesos fundamentales) que aún no ha sido posible describir mediante métodos tradicionales (Mocali & Benedetti, 2010). Las aproximaciones microbiológicas tradicionales presentan muchas

limitaciones debido a que sólo una pequeña fracción de microorganismos del suelo es cultivable utilizando métodos estándares (Daniel, 2005). Recientemente nuevas aproximaciones se han desarrollado para el cultivo de diferentes tipos de bacterias como es el caso de la denominada *culturomics* (Dubourg et al., 2012).

Para contrarrestar las limitaciones de las técnicas estándares de cultivo se han desarrollado métodos moleculares que permiten analizar la composición de las comunidades sin necesidad del aislamiento directo de las bacterias, basados en la extracción de ácidos nucleicos (principalmente ADN) de la matriz del suelo (Daniel, 2005) dando lugar a la metagenómica. La metagenómica permite describir la funcionalidad de los genomas microbianos contenidos en una muestra ambiental mediante análisis basados en secuenciación (Riesenfeld et al., 2004) al mismo tiempo que permite establecer la estructura de las comunidades microbianas.

En general, todas las técnicas moleculares basadas en ADN/ARN dependen de la calidad de ADN y la representatividad de la muestra analizada (Daniel, 2004). Acá se tienen limitaciones a dos niveles: 1) Problemas técnicos, ya sea para la amplificación y/o construcción de librerías genómicas debido a la presencia de sustancias que interfieren con la acción de enzimas como la ADN-polimerasa (Tebbe & Vahjen, 1993), 2) Problemas técnicos para aislar ADN de todos los organismos presentes en el suelo, particularmente para las especies raras que se encuentran en baja abundancia y que en consecuencia no son detectadas en los análisis metagenómicos. Adicionalmente a la limitación técnica que suponen las sustancias de interferencia, también se ha evidenciado un sesgo en estudios metagenómicos asociados a la relación entre la abundancia de un microorganismo en particular y el límite de detección de la metodología, problema principalmente asociado con la extracción de ADN del sustrato (Tebbe & Vahjen, 1993).

En la última década se ha presentado a la metagenómica como la metodología con mayor alcance para estudiar las comunidades microbianas, plantendose que con ella es posible evaluar la totalidad de los componentes de la comunidad. No obstante, aunque robusta, estudios recientes han demostrado que la resolución metagenómica depende del éxito de extraer ADN representativo del suelo, a partir del cual se puedan detectar todos los microorganismos presentes.

La importancia de la calidad del ADN del suelo esta documentada por diversos protocolos de extracción que se realizan de forma directa o indirecta (Tebbe & Vahjen, 1993). La extracción directa de ADN del suelo se realiza mayoritariamente utilizando kits de extracción. La extracción indirecta hace referencia al aislamiento de células bacterianas de los demás componentes de la matriz del suelo previo a la lisis celular y purificación del ADN (Bertrand et al., 2005). Sin embargo, ninguna de las dos metodologías es capaz de extraer la totalidad de ADN presente en el

suelo, ya que cada una permite el enriquecimiento de diferentes fracciones microbianas sobrestimando la diversidad microbiana total (Delmont et al., 2011).

Por otra parte, entre los métodos moleculares que permiten acceder al metagenoma del suelo se incluyen la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la clonación directa del ADN del suelo. Posteriormente, el ADN extraído de las muestras de suelo es insertado en vectores, como los plásmidos, cósmidos o cromosomas bacterianos artificiales (BACs), y después propagado en cepas bacterianas como *E. coli* con el fin de construir librerías genómicas las cuales teóricamente contienen el metagenoma completo de la muestra de suelo (Daniel, 2005).

La construcción de complejas librerías genómicas esta estrechamente relacionada con la calidad de DNA extraído, ya que las modificaciones enzimáticas requeridas durante el proceso de clonación son muy sensibles a la contaminación por sustancias húmicas (Daniel, 2005). El alto contenido de ácidos y otras sustancias húmicas provenientes de la descomposición de la materia orgánica del suelo, interfieren con la acción de la enzima *Taq* polimerasa, dificultando la amplificación del gen de interés.

#### **4.5. Abundancia y diversidad de comunidades bacterianas en suelo**

En la actualidad se emplean diversas técnicas moleculares para evaluar la composición y diversidad de las comunidades bacterianas. La metagenómica, como se mencionó anteriormente, es considerada la más robusta y permite identificar a nivel de especie los diferentes componentes de la comunidad mediante la secuenciación de los genomas de los organismos presentes en la muestra. Esta metodología continúa siendo costosa, lo que limita su utilización.

Existen metodologías alternas que permiten explorar la composición y diversidad de las comunidades, entre ellas, la PCR-DGGE. Esta técnica está basada en la desnaturalización de cadenas de doble hélice del ADN (amplicones obtenidos mediante PCR) a cadenas sencillas empleando un gradiente químico y de temperatura (Muyzer & Smalla, 1998). La utilidad de la técnica en el análisis de comunidades bacterianas se basa en la existencia de variación en las secuencias que migran a diferentes posiciones en los geles de acrilamida/bisacrilamida, separando las secuencias con base en su comportamiento de fusión. Se demuestra que el 95% de las diferencias individuales de las secuencias se detectan por este método (Jackson, 2000).

Las secuencias ARN, especialmente el gen 16S rARN, representan los objetivos más importantes en estudios de evolución y ecología bacteriana, relaciones

filogenéticas, análisis de diversidad bacteriana y de abundancia relativa de especies (Tomas & Petr, 2013) permitiendo estudiar la estructura y composición de las comunidades bacterianas en determinado ambiente. Este gen contiene regiones hipervariables que proveen suficiente información sobre la diversidad bacteriana (Tomas & Petr, 2013), al mismo tiempo que la presencia de regiones altamente conservadas (Janda, 2007) permite discriminar comunidades bacterianas de otros organismos como hongos o plantas mediante el uso de primers específicos.

La molécula está conformada de 9 regiones hipervariables, de 1.520 nucleótidos, aproximadamente; codificado por el gen *rrs*. El análisis de la secuencia del gen 16S rARN reveló que existen algunos fragmentos, conocidos como oligonucleótidos firma, los cuales, se tratan de secuencias cortas que están presentes, únicamente en un grupo característico de especie (Rodicio, 2004).

La técnica PCR-DGGE permite conocer la estructura de las comunidades microbianas, pues arroja perfiles moleculares que indican el número de especies diferentes presentes en la muestra analizada. El principio de esta técnica consiste en separar fragmentos de DNA del mismo tamaño pero con diferente secuencia (Gerard & Smalla, 1998). La técnica de DGGE fue propuesta por Muyzer et al., 1993 e inicialmente utilizada en la ecología de microorganismos. Originalmente la técnica se basó en la amplificación de la región V3 del gen 16S rARN pero posteriormente se demostró que la región V6 del mismo gen tenía una mayor variabilidad, permitiendo una mayor disertación entre las comunidades bacterianas (Brons & Elsas, 2008).

Además de factores biológicos inherentes a la técnica, el poder de resolución del PCR-DGGE depende de diversos factores como la calidad de ADN, la abundancia relativa de especies, el tamaño del fragmento amplificado y su grado de polimorfismo (Wang & He, 2012). Teóricamente la electroforesis en gel en gradiente denaturante permite la separación de fragmentos que difieren en una sola base nitrogenada (Heuer et al., 1999), siendo mejor en fragmentos de tamaños menores a las 400 pb. (Wang & He, 2012).

La escogencia del gradiente de desnaturalización es crucial para la separación de los fragmentos, para ello debe conocerse la temperatura de fusión y propiedades de desnaturalización del fragmento (Sigler et al., 2004), así mismo como el tiempo y la velocidad de corrida.

Aunque no permite identificar a nivel específico los componentes de la muestra, la DGGE representa una herramienta muy útil para apoyar estudios de

metagenómica, pues permite la selección de muestras de mayor interés, por aquellas con perfiles moleculares contrastantes.

#### **4.6. El uso de fluorocromos para la enumeración directa de bacterias en muestras ambientales**

La cuantificación de la biomasa microbiana es muy importante para el entendimiento del rol ecológico que juegan las bacterias en cualquier tipo de ambiente ( Kawaharasakia et al., 1999). Estudios han demostrado que el conteo directo por epifluorescencia es el método mas acertado para la enumeración de bacterias totales presentes en una muestra. Los dos fluorocromos más utilizados en los métodos de conteo directo son el naranja de acridina (3,6-bis[*dimethylamino*]acridinium chloride) y el 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Los dos tipos de tinciones no son específicos, por lo que es necesario diferenciar las bacterias de otros microorganismos, con base en el color, el tamaño y la morfología (Kepner & Pratt, 1994)

El naranja de acridina se une tanto al ADN como al ARN con un máximo de excitación a 470nm. La tinción con este fluorocromo emite un color rojo-naranja cuando se trata de ácidos nucleicos de cadena sencilla, y para los de doble cadena el color observado tiende a verde. El DAPI es un fluorocromo no intercalante que se une preferentemente al ADN en regiones ricas en uniones A-T. La fluorescencia que emite este compuesto es de color azul y es excitado con la luz a una longitud de onda de 365nm (Yu et al., 1995)

Para que el conteo directo de bacterias sea acertado, previo a la tinción con el DAPI la muestra se debe tratar con un agente fijador para evitar cambios en los números, tamaños y morfologías bacterianas. Los aldehídos son los compuestos orgánicos mas utilizados como agentes fijadores, debido a que previenen el daño de las células durante la homogenización o sonicación además de actuar como proteínas de reticulación en las membranas celulares dándole rigidez a las células bacterianas (Kepner y Pratt, 1994)

## 5. Objetivo general

Determinar el efecto de la aplicación de biocarbón derivado de cascarilla de arroz sobre la diversidad y abundancia de comunidades bacterianas en suelo no perturbado.

### 5.1. Objetivos específicos

- Evaluar los cambios en la abundancia y diversidad de comunidades bacterianas en un suelo no perturbado, luego de la aplicación de biocarbón derivado de cascarilla de arroz.  
Indicadores: 1) Biomasa microbiana; 2) Número de especies identificadas mediante técnicas moleculares.
- Evaluar los cambios en las características fisicoquímicas del suelo luego de la aplicación del biocarbón.  
Indicadores: Valores de pH, humedad y composición nutricional

## 6. Metodología

### 6.1. Obtención de biocarbón derivado de cascarilla de arroz

En los ensayos se empleó un biocarbón derivado de cascarilla de arroz obtenido mediante pirólisis controlada durante 3 horas a 500 °C en un horno de combustión ubicado en la Arrocería La Esmeralda (Jamundí-Valle del Cauca-Colombia). Las características físicas y químicas de este biocarbón (Tabla 7) fueron analizadas en Control Laboratories Inc. empleando las metodologías propuestas por la Iniciativa Internacional de Biocarbón (2012).

### 6.2. Tratamientos Experimentales

Con el fin de evaluar el efecto del biocarbón sobre las características físicas y químicas del suelo y sobre la abundancia y diversidad de comunidades bacterianas, se compararon cuatro tratamientos en tres tiempos de incubación 0 días, 30 días y 60 días; las fechas de muestreo fueron Sep 18/2013, Oct 18/2013 y Nov 18/2013 respectivamente.

**Tabla 1. Tratamientos experimentales escogidos para evaluar el efecto del biocarbón derivado de cascarilla de arroz sobre la abundancia y diversidad de comunidades bacterianas establecidas para cada uno de los tiempos de muestreo.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Replicas</b>
Suelo no estéril	4
Suelo no estéril con biocarbón	4
Suelo estéril	4
Suelo estéril con biocarbón	4

La aplicación de biocarbón se realizó de forma homogénea, a una dosis de 50 g de biocarbón por cada 1000 g de suelo (5%). Para cada unidad experimental se

pesaron 200 g de suelo y se colocaron en vasos de poliestireno expandido (icopor) de 12 oz.

El experimento se realizó bajo condiciones de laboratorio, para ello se construyó un dispositivo que supliera las funciones de incubadora. Éste se fabricó utilizando una caja de cartón forrada al interior con plástico negro, creando condiciones de oscuridad para impedir el crecimiento de organismos autótrofos. La temperatura se registró periódicamente con la ayuda de dos termómetros (VWR, Intl) ubicados en cada extremo de la incubadora. La humedad del suelo se determinó semanalmente por gravimetría y el agua pérdida por evaporación se remplazó hasta alcanzar el peso inicial de capacidad de campo.

Para los análisis de abundancia y diversidad bacteriana, las muestras para cada tiempo de incubación se colectaron en bolsas plásticas y se almacenaron a 4°C hasta la realización de los análisis correspondientes. Los análisis de las características físicas y químicas del suelo se realizaron a los 0 y 60 días de incubación.

### **6.3. Recolección de muestras de suelo en campo y tratamiento del suelo**

Las muestras de suelo fueron colectadas en la localidad de Chicoral- Valle, Colombia (3° 34' 44,9" Lat. N, 76° 35' 9.3" Long. O.) a quince centímetros de profundidad. Este tipo de suelo provino de un bosque secundario de clima templado y fue colectado durante la época de verano. El suelo agrícola utilizado fue suministrado por el programa de arroz del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), extraído de los campos de siembra de arroz. El suelo fue molido mediante un martillo con punta de goma y después pasado a través de un tamiz de 0.2 mm para extraer todo el material vegetal como raíces, hojarasca y rocas. La esterilización del suelo se realizó en bolsas resistentes al calor en dos ocasiones sucesivas, empleando un autoclave (Sterilof, 60/1PGRS) a 121°C durante 1 hora utilizando ciclos húmedos. El suelo fue irrigado hasta alcanzar su capacidad de campo, permitiendo que el suelo se saturara de agua y después drenara durante 24-72 horas (Petillo et al., 2012).

En el montaje de los tratamientos experimentales se empleó ambos tipos de suelo. Sin embargo, el suelo agrícola fue descartado debido a problemas enfrentados en la extracción de ADN para los análisis moleculares y de abundancia. Estos problemas no pudieron solventarse con ninguna de las metodologías de extracción ensayadas (directas o indirectas). Una causa limitante a la extracción de ADN

puede deberse a sustancias de interferencia que enmascaran el ADN, provenientes de practicas agrícolas como fumigación o fertilización química.

#### **6.4. Aislamiento de la fracción cultivable de microorganismos del suelo para validación de esterilidad.**

Para aislar la fracción cultivable de bacterias se realizó una extracción inicial a partir de 1g de suelo y posteriormente se hicieron diluciones seriadas base 10. Para ello se utilizó una solución de NaCl al 0.85% suplementada con peptona al 1%. En la primera dilución ( $10^{-1}$ ), se usaron 9 ml de la solución y 1g de suelo. Para la siguiente dilución ( $10^{-2}$ ) se tomó una alícuota de 1ml de la dilución anterior y se añadieron 9 ml de NaCl. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar una dilución de  $10^{-5}$ .

Para siembra en agar nutritivo sólido se tomó un alícuota de 200  $\mu$ l de cada dilución y se inoculó de manera superficial sobre el agar con ayuda de un asa de vidrio. Las muestras se incubaron a 30°C durante 24-48 horas hasta observar crecimiento de colonias bacterianas con el objetivo de verificar la presencia de bacterias al inicio del experimento.

#### **6.5. Diseño Experimental**

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, con cuatro réplicas para cada uno de los tratamientos (4: estéril con y sin biocarbón, no estéril con y sin biocarbón) para cada uno de los tiempos de muestreo (0,30 y 60 días).

#### **6.6. Extracción de ADN bacteriano**

Se siguieron dos protocolos complementarios para la extracción de ADN, ya que cada uno enriquece diferentes fracciones bacterianas presentes en la muestra. Para la extracción directa se utilizó el kit UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, inc, USA). Para la extracción indirecta se empleó un protocolo de centrifugación diferencial utilizando un gradiente de Nycodenz al 1.3%. Para ello

se homogenizaron 15 g de suelo en 15 ml de NaCl al 0.9%, se centrifugó a 700 g por 15 minutos a 10°C, el sobrenadante fue colectado y filtrado a través de una gasa (previamente saturada con NaCl). El filtrado se centrifugó por 20 minutos a 7500 g a 10°C, el precipitado resultante se resuspendió en 10 ml de NaCl al 0.9%. Posteriormente 10 ml se transfirieron cuidadosamente al tubo que contenía la solución de Nycodenz; se realizó una centrifugación a 2000 rpm durante 40 minutos y posteriormente a 5000 rpm durante 60 minutos. Finalmente el anillo bacteriano se extrajo y se centrifugó por 30 minutos a 10000 g. El precipitado se resuspendió en 1 ml de agua destilada. Para realizar la extracción de ADN presente en la fracción bacteriana obtenida a partir de la centrifugación diferencial con gradiente de Nycodenz, se utilizó el kit UltraClean Microbial DNA isolation kit (MoBio Laboratories, inc, USA) a partir de 800 µl de resuspensión bacteriana

### 6.7. Análisis de la abundancia de bacterias

La abundancia de bacterias se determinó por medio del conteo directo de células utilizando tinción fluorescente con el colorante 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI). Se partió de 15 g de suelo. Para la tinción de las bacterias se tomó una alícuota de 250 µl de suspensión bacteriana obtenida a partir de la centrifugación diferencial con gradiente de Nycodenz, se mezcló con 800 µl de formaldehído-PBS 20% como agente fijador y se incubó por 2 horas a 37°C. Posterior a la incubación se añadieron 20 µl de solución DAPI (1.25 µl/ml) y se dejó teñir durante 15 minutos. La muestra teñida se filtró al vacío utilizando una membrana de celulosa de 47 mm de diámetro y 0.22 µm de tamaño de poro (MS Mix Cellulose Ester, USA). La membrana se colocó sobre un portaobjetos y se observó al microscopio de fluorescencia. El conteo de los microorganismos se realizó manualmente utilizando el programa computacional ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012), el cual permite contar con un apuntador cada una de las células. Para determinar el número total de células (presentes en la muestra se utilizó la siguiente ecuación:

$$TCC = \frac{(MTCC)(CM)(FD)}{V_m}$$

Siendo:

TCC: Total de células contadas (células. g<sup>-1</sup> suelo)

MTCC: Promedio de células contadas

CM: Campos microscópicos

FD: Factor de dilución

V<sub>m</sub>: Volumen o gramos de muestra analizados

El análisis de abundancia bacteriana se complementó con la determinación de carbono en la biomasa microbiana a partir del método de fumigación-extracción con cloroformo. Para ello, el cloroformo se lavó con una solución de ácido sulfúrico al 5% seguido de tres lavados sucesivos con agua deionizada. Las muestras se dividieron en dos fracciones: fumigadas y no fumigadas. Las muestras no fumigadas fueron extraídas inmediatamente con 40 ml de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, colocadas en agitación durante 30 minutos y después filtradas a través de un papel filtro Whatman # 42. Las muestras fumigadas se dispusieron dentro de una incubadora cerrada a ~28°C en presencia de un recipiente que contenía cloroformo durante 24 horas, permitiendo que el aire dentro de la incubadora se saturara de cloroformo y erradicara todos los organismos presentes debido a la alta toxicidad del ambiente. Después de la incubación, el cloroformo restante en las muestras se dejó evaporar en una campana de extracción por 30 minutos antes de la extracción con 40 ml de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Este método permite estimar el carbono producido por la biomasa microbiana teniendo en cuenta la diferencia entre el carbono total de la muestra y el carbono residual una vez los microorganismos están ausentes.

## 6.8. Análisis de diversidad de microorganismos mediante DGGE

La diversidad de microorganismos presentes en el suelo se evaluó mediante la amplificación de un fragmento específico en la región hipervariable V3 del gen 16S rARN, ya que esta región al igual que la V2 permite observar diferencias en las secuencias de tan solo unos pocos nucleótidos (Heuer et al., 1999). Los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis en gel de acrilamida empleando un gradiente de desnaturalización (DGGE). Para la amplificación se utilizaron los cebadores 518F-GC (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG - 3') y 800R (5'-CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC - 3'). Al primer 518F se le adicionó una cola de GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3') con el fin de aumentar la resolución de la separación mediante DGGE. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 2. Como controles positivos se utilizó *E. coli*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Bacillus amilolicuefaciens*, *Waupersia* y se utilizó un control negativo de reacción. La separación de los fragmentos se realizó en un gel de acrilamida (AMRESCO, Chile) con gradiente denaturante de

30 – 70%, con voltaje constante de 100 V y temperatura de 64°C. La electroforesis se corrió durante 18 h, empleando buffer TAE 1X.

Debido a que la DGGE es una técnica molecular que permite la separación de moléculas de ADN con una alta resolución, se requiere un método sensible para la visualización de los fragmentos. Para ello, el revelado de los geles de acrilamida se realizó mediante la tinción con plata. Se siguió el protocolo de tinción detallado por Bassam & Gresshoff, 2007

El análisis de las bandas observadas se realizó cualitativamente debido a que la resolución de los fragmentos se vió afectada por un barrido oscuro que aparece como consecuencia de la cantidad de materia orgánica presente en la muestra.

**Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S rARN (región hipervariable V3) a partir de muestras de suelo.**

No.	Temperatura	Tiempo	Actividad realizada
1	95°C	5 minutos	Desnaturalización Inicial
2*	94°C	1 minuto	Desnaturalización
3	63°C	1 minuto	Alineamiento
4	72°C	45 segundos	Extensión
5	72°C	10 minutos	Extensión Final
*Se realizan 15 ciclos del paso 2 al paso 4			

### **6.9. Análisis fisicoquímicos del suelo**

Los análisis de las características fisicoquímicas se realizaron para 6 muestras, correspondientes a los tratamientos en ausencia y presencia de biocarbón para los tres tiempos de incubación. Estos análisis se realizaron con la colaboración del

Laboratorio de Servicios Analíticos del CIAT. Se utilizó el método de espectrometría de absorción atómica para la determinación de los elementos químicos como el P-bray II, Ca, Mg y K, el CICE se determinó mediante métodos volumétricos. Para la determinación del pH del suelo, se añadió agua a la muestra en una proporción 1:1.

**Tabla 3. Matriz de marco lógico**

<b>Objetivo general:</b> Determinar el efecto de la aplicación de biocarbón sobre la diversidad y abundancia de comunidades bacterianas en suelo no perturbado.			
<b>Objetivos específicos</b>	<b>Actividad</b>	<b>Indicador</b>	<b>Supuestos</b>
Evaluar los cambios en la abundancia y diversidad de comunidades bacterianas en suelos no perturbado luego de la aplicación de biocarbón derivado de cascarilla de arroz.	Amplificación del gen rARN 16S	Binario: si amplificó el gen o no	El termociclador funciona correctamente. Los reactivos necesarios para la PCR y electroforesis están en buen estado.
	Determinación de biomasa microbiana	Biomasa microbiana determinada	El equipo funciona correctamente.
Evaluar los cambios en las características fisicoquímicas del suelo no perturbado luego de la aplicación del biocarbón.	Caracterización de las propiedades fisicoquímicas del biocarbón	Propiedades fisicoquímicas caracterizadas	
	Caracterización de las propiedades fisicoquímicas del suelo	Propiedades fisicoquímicas caracterizadas	

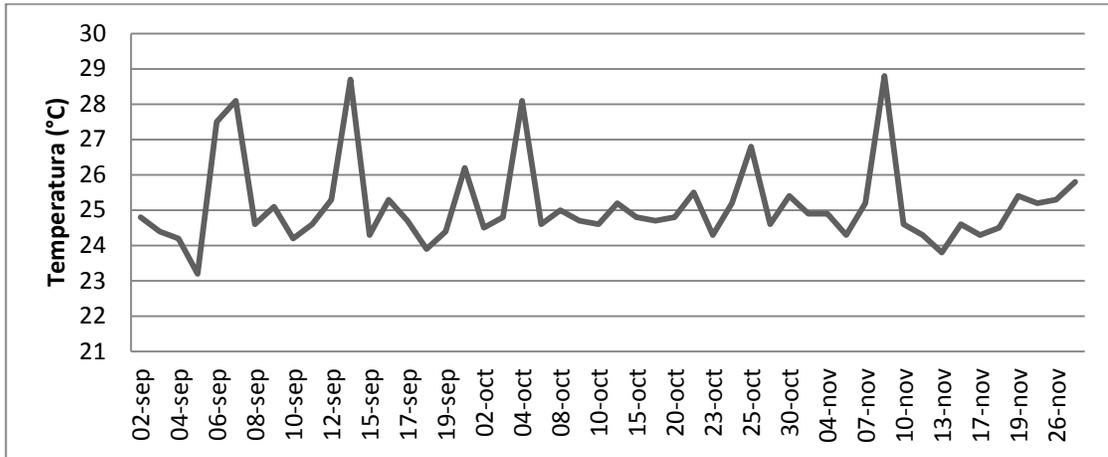
## 7. Cronograma de actividades

<b>Actividad</b>	<b>May o</b>	<b>Junio</b>	<b>Julio</b>	<b>Agosto</b>	<b>Septiembre</b>	<b>Octubre</b>	<b>Noviembre</b>	<b>Diciembre</b>
<b>Revisión bibliográfica</b>	X	X	X				X	X
<b>Recolección de muestras en campo</b>				X				
<b>Pedido de reactivos</b>		X						
<b>Periodo de incubación de muestras</b>				X	X	X	X	
<b>Medidas de abundancia</b>				X	X	X	X	
<b>Medidas de diversidad</b>				X	X	X	X	
<b>Caracterización fisicoquímica del biochar</b>				X			X	
<b>Caracterización fisicoquímica del suelo</b>				X			X	
<b>Escritura del informe final</b>								X

## 8. Resultados

### 8.1. Montaje experimental y monitoreo de temperatura

El montaje experimental implementado permitió comparar el efecto del biocarbón sobre la abundancia de microorganismos en suelo no perturbado. Durante todo el curso del experimento se realizó un monitoreo de la temperatura y la humedad de las muestras.



**Figura 1. Temperaturas registradas durante los meses de septiembre, octubre y noviembre de 2013 bajo condiciones de laboratorio.**

La temperatura se mantuvo relativamente constante durante el período experimental (aprox. 60 días) aunque con algunas fluctuaciones de alrededor  $\sim 3^{\circ}\text{C}$ . Los picos de aproximadamente  $28^{\circ}\text{C}$  y  $29^{\circ}\text{C}$  corresponden a los días de fin de semana en los cuales el sistema de aire acondicionado en las instalaciones queda suspendido.

El control de humedad de las muestras se realizó por gravimetría con una periodicidad semanal. La tasa promedio de pérdida de agua fue alrededor del 5% entre dos lecturas consecutivas. Ésta pérdida se compensó con la adición de agua hasta alcanzar la humedad inicial (capacidad de campo) de cada muestra.

## 8.2. Manejo de muestras y análisis de laboratorio

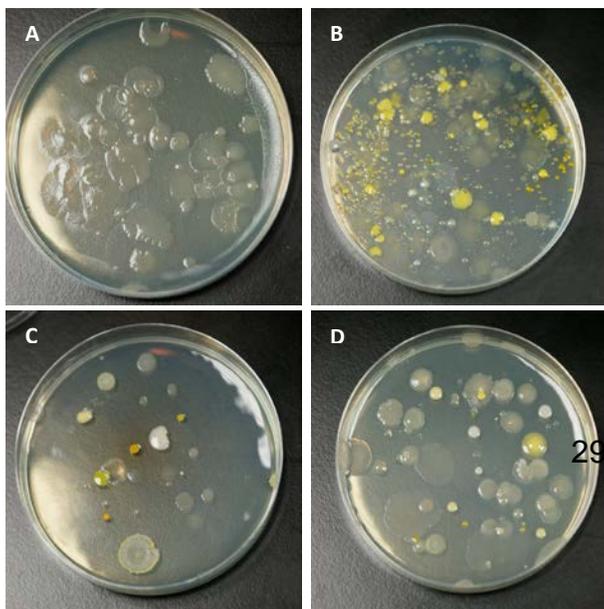
Debido al costo de los análisis de biomasa microbiana, caracterización de propiedades fisicoquímicas del suelo, DGGE, tinción con DAPI y el reducido de tiempo del curso del experimento, se decidió hacer muestras compuestas para cada uno de los tratamientos evaluados, mezclando las 4 réplicas.

Si bien esto sugiere una limitación en el diseño de experimental y más aún en el análisis estadístico, la decisión de realizar muestras compuestas permitió tener una aproximación en el corto plazo a los objetivos del estudio. Sin embargo las réplicas se mantienen separadas para análisis posteriores.

## 8.3. Confirmación de presencia de bacterias en el suelo y validación del proceso de esterilización

Al inicio de los experimentos, se procedió a aislar la fracción cultivable de bacterias a fin de establecer la presencia de microorganismos en el suelo previa a la incubación con el biocarbón. Este ensayo adicionalmente permitiría evaluar la efectividad del proceso de esterilización del suelo y la validez de la comparación entre los tratamientos de suelo estéril y no estéril.

La siembra de la fracción cultivable en placas de medio nutritivo demostró la presencia de diferentes morfotipos bacterianos en los suelos evaluados, aún en aquellos sometidos a doble proceso de esterilización, lo cual indica que el protocolo empleado no eliminó los microorganismos presentes y por lo tanto los tratamientos experimentales basados en este suelo no representan un control de esterilidad.



**Figura 2. Fotografías representativas de bacterias cultivables presentes a los 0 días.**

A y B corresponden al suelo no perturbado en ausencia y presencia de biocarbón, respectivamente. C y D corresponden al suelo agrícola en ausencia y presencia de biocarbón, respectivamente.

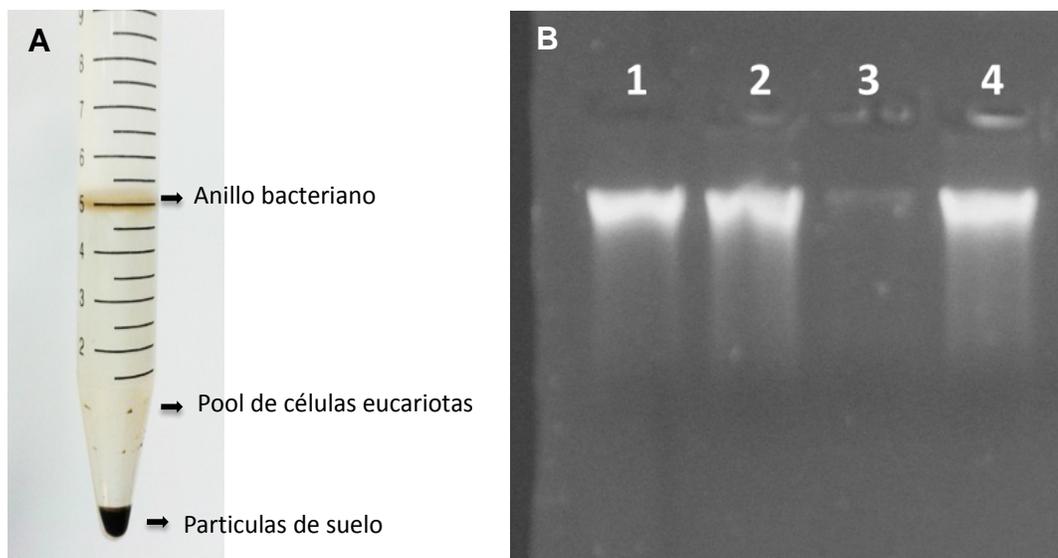
#### **8.4. Extracción de ADN bacteriano**

La extracción del ADN bacteriano mediante el método directo, basado en la utilización del kit comercial “UltraClean Soil DNA Isolation” se realizó a partir de 200 mg y 1000 mg de suelo, a fin de determinar con que cantidad de suelo el rendimiento del ADN extraído era mayor.

Paralelamente se realizó la extracción de ADN mediante el método indirecto de separación de la fracción bacteriana con centrifugación diferencial en gradiente de Nycodenz, el cual permite el enriquecimiento de la fracción bacteriana y disminuye la contaminación debido a la presencia de sustancias del suelo o ADN de otros organismos. El anillo bacteriano obtenido fue separado en dos fracciones y éstas se sometieron a diferentes procesos de extracción: 1) Extracción directa con el kit “UltraClean Microbial DNA isolation” y 2) Extracción de ADN mediante lisis celular controlada en bloques o “plugs” de agarosa. Estos métodos se diferencian en la fragmentación del ADN obtenido, pues es posible aislar cadenas de ADN más largas sometiendo el ADN a lisis celular controlada y lenta en bloques de agarosa.

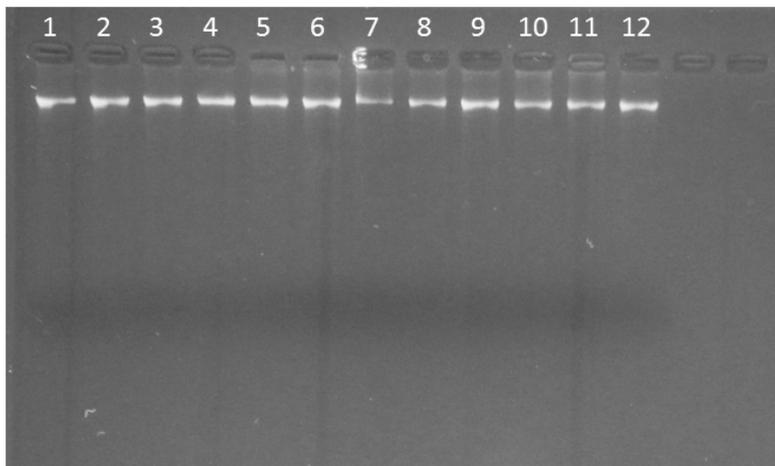
El rendimiento de ADN obtenido con extracción directa de 200 y 1000 mg de suelo fue similar (Figura 3B, 1-2), lo cual indica que a 200 mg el sistema de extracción alcanza su máxima eficiencia. La electroforesis en gel de agarosa mostró que el ADN obtenido es de alta calidad con baja contaminación (Figura 3B, 1-2).

El enriquecimiento bacteriano mediante centrifugación en gradiente de Nycodenz permitió obtener un claro anillo de células, fácilmente extraíble (Figura 3A). La extracción de ADN de esta fracción empleando el kit fue exitosa, obteniéndose un buen rendimiento (Figura 3B, 4). En contraposición, no fue posible extraer una cantidad suficiente de ADN empleando los bloques de agarosa (Figura 3B, 3) por lo que esta última metodología de extracción se descartó en los análisis posteriores.



**Figura 3. ADN extraído del suelo bajo los distintos tratamientos experimentales.** A) Anillo bacteriano obtenido por centrifugación diferencial con gradiente de Nycodenz. B) Electroforesis en gel de agarosa del ADN total obtenido con los diferentes protocolos de extracción. Carril 1: ADN obtenido mediante extracción directa a partir 200mg de suelo. Carril 2: ADN obtenido mediante extracción directa a partir de 1000mg de suelo. Carril 3: ADN extraído a partir de bloques de agarosa. Carril 4: ADN obtenido mediante extracción con el kit “UltraClean Microbial DNA isolation”

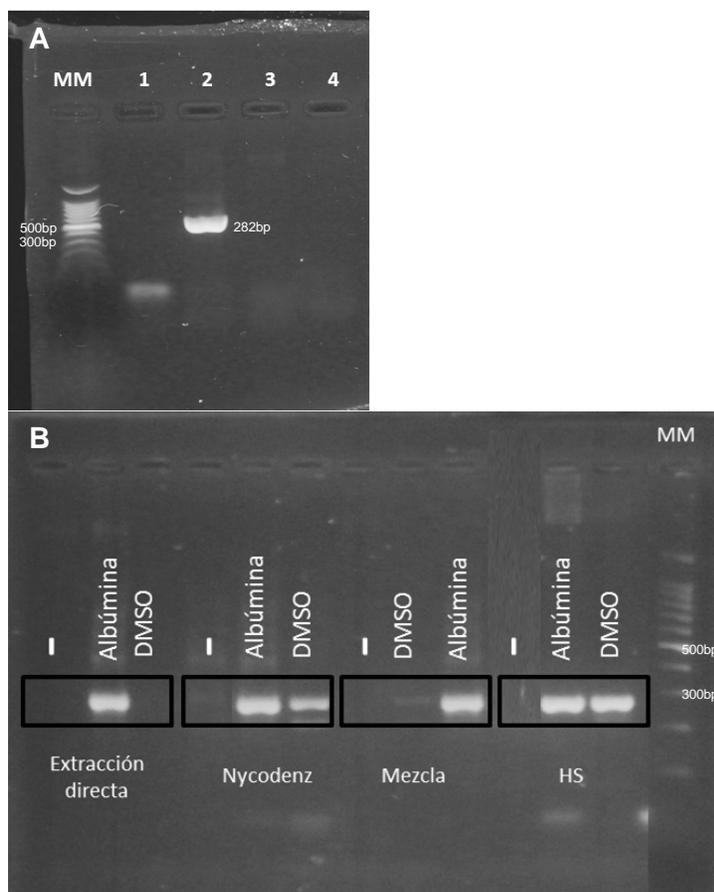
Debido a que el método directo e indirecto enriquecen diferentes fracciones del total de bacterias presentes en la muestra, el ADN extraído con cada método se combinó para formar una muestra compuesta. Se determinó la concentración de ADN de manera cualitativa utilizando una escalera de concentraciones del bacteriófago lambda. Finalmente se aplicaron factores de corrección a todas las muestras de ADN a fin de emplear concentraciones similares en las amplificaciones mediante PCR (Figura 4).



**Figura 4. ADN total en las distintas muestras antes de la amplificación de la región V3 del gen 16S rARN.** Las muestras se llevaron a concentraciones similares de ADN mediante dilución. Carriles 1-4: los diferentes tratamientos en el tiempo de incubación 0 días. Carriles 5-8: los diferentes tratamientos en el tiempo de incubación 30 días. Carriles 9-12: los diferentes tratamientos en el tiempo de incubación 60 días. 1) Suelo sin biocarbón 2) Suelo con biocarbón 3) Suelo estéril sin biocarbón 4) Suelo estéril con biocarbón. Para las muestras 5-8 y 9-12 los tratamientos siguen el mismo orden que 1-4.

### 8.5. Amplificación del gen 16S rARN mediante PCR

La interferencia de las sustancias húmicas fueron un factor limitante en la amplificación del fragmento de interés del gen 16S rARN (Figura 5A). Para contrarrestar esta limitación se realizaron las amplificaciones mediante PCR en presencia de albúmina de suero fetal bovino o DMSO con el fin de extender las cadenas de ADN e impedir la inhibición de la *Taq* polimerasa (Figura 5B).

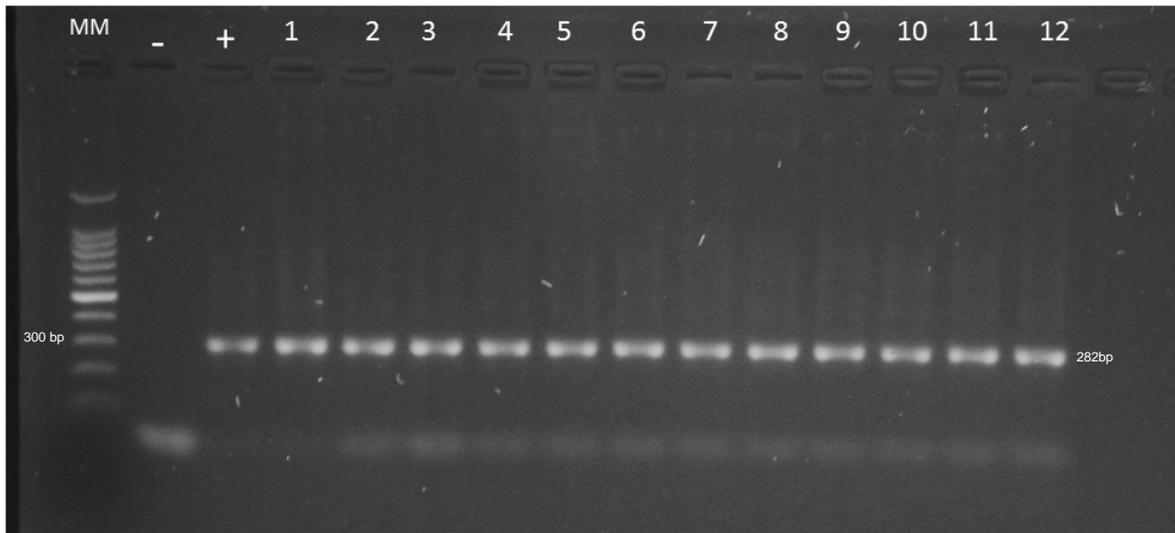


**Figura 5. A) Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos luego de la amplificación del gen 16S rARN con los iniciadores 518F y 800R.** MM) Marcador molecular (100 pb, PROMEGA) 1) Control negativo (sin ADN molde) 2) Amplificación a partir de ADN puro de la bacteria *Herbaspirillum seropedicae* (HS) 3) Amplificación a partir del ADN obtenido mediante extracción directa con kit 4) Amplificación a partir del ADN obtenido mediante extracción a partir de gradiente con Nycodenz. B) Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de gen 16S rARN utilizando albúmina de suero fetal bovino o DMSO. Se presentan cuatro bloques de muestras, correspondientes a las amplificaciones a partir del ADN obtenido utilizando extracción directa con kit, gradiente de nycodenz, mezcla de ADN de estas dos metodologías y ADN puro de *Herbaspirillum seropedicae*. En cada bloque, se muestran tres carriles correspondientes al control negativo de reacción (-), amplificación con adición de albúmina y con adición de DMSO.

En presencia de la albúmina de suero fetal bovino, el gen 16S rARN amplificó en todos los ADN extraídos, tanto por método directo como indirecto (Figura 5B). Por

consiguiente, todos los PCR posteriores se realizaron con la adición de este reactivo.

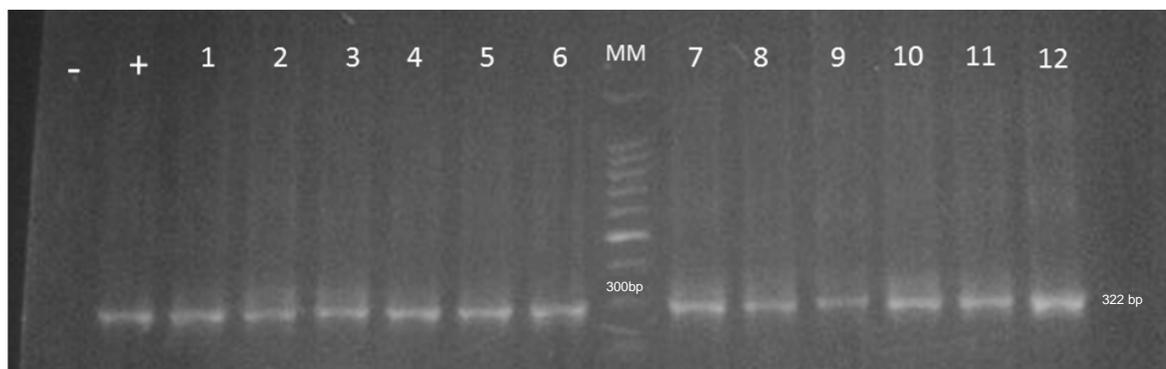
Para la amplificación del gen 16S rARN se implementó una PCR anidada. Se corrió una primera reacción utilizando como ADN molde la mezcla de ADNs obtenidos mediante los métodos de extracción directo e indirecto. En ésta, se utilizaron los iniciadores 518F y 800R cuyo producto es un fragmento con una longitud de 282 pb (Figura 6)



**Figura 6. Amplificación del gen 16S rARN con los iniciadores 518F y 800R.** MM) marcador molecular; -) Control negativo de reacción; +) HS. 1-4 tiempo de incubación a los 0 días. 5-8 tiempo de incubación a los 30 días. 9-12 tiempo de incubación a los 60 días. 1) Suelo sin biocarbón 2) Suelo con biocarbón 3) Suelo estéril sin biocarbón 4) Suelo estéril con biocarbón. Para las muestras 5-8 y 9-12 los tratamientos siguen el mismo orden que 1-4.

En la segunda reacción de PCR se empleó como ADN molde el producto del primer PCR. En este caso, los iniciadores utilizados fueron el 518F con una cola de GC y el 800R. El tamaño del fragmento esperado es de 322 pb (Figura 7).

La amplificación del fragmento de interés fue exitosa en todas las muestras ensayadas (Figura 7).



**Figura 7. PCR anidado con los iniciadores 518F-GC y 800R.** - ) Control negativo; +) HS; 1-4 tiempo de incubación a los 0 días; 5-8 tiempo de incubación de 30 días; 9-12 tiempo de incubación de 60 días. 1) Suelo sin biocarbón; 2) Suelo con biocarbón; 3) Suelo estéril sin biocarbón; 4) Suelo estéril con biocarbón. Para las muestras 5-8 y 9-12 los tratamientos siguen el mismo orden que 1-4. MM) Marcador molecular

### 8.6. Abundancia de bacterias mediante técnica de fluorescencia (DAPI)

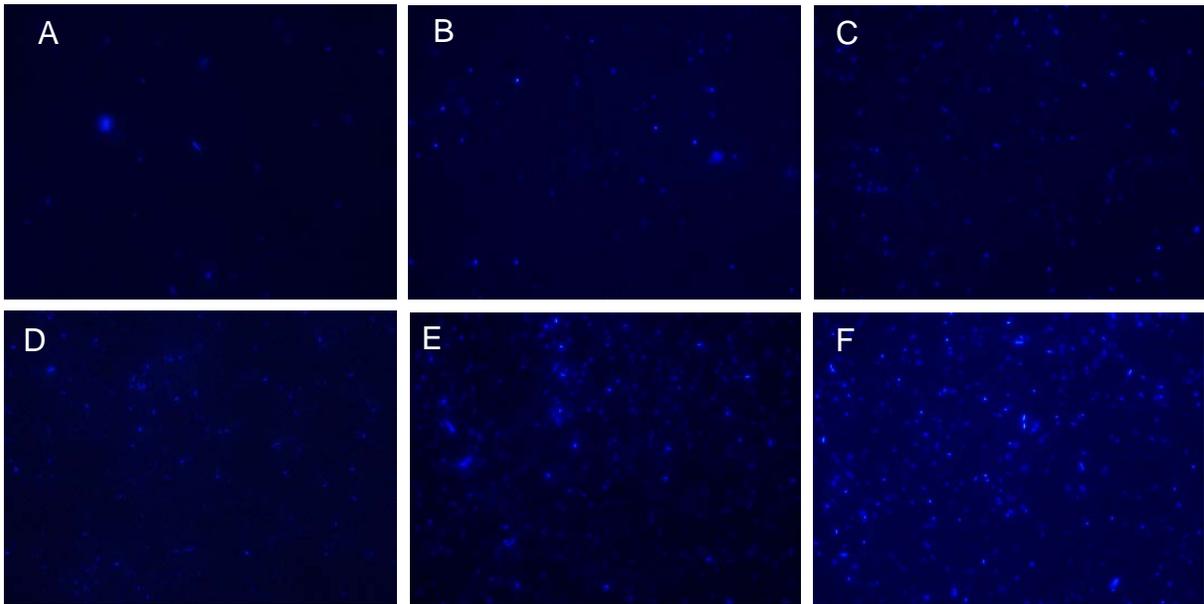
El conteo del número de bacterias se realizó sobre fotografías digitales de las muestras teñidas con DAPI, empleando el programa ImageJ (Figura 8). Para el tiempo de incubación 0 días no se evaluó la abundancia de bacterias en los tratamientos que contenían biocarbón (+Biocarbón) pues biológicamente no habría diferencia entre éstos y los tratamientos sin biocarbón.

**Tabla 4. Bacterias totales cuantificadas mediante tinción fluorescente no específica con DAPI.**

Días de incubación	BACTERIAS TOTALES (células. g <sup>-1</sup> suelo)			
	Suelo no estéril		Suelo estéril	
	- Biocarbón	+ Biocarbón	- Biocarbón	+ Biocarbón
0	201.206	-	1.077.495	-
30	761.118	986.141	983.351	2.339.428
60	521.242	1.039.013	2.766.165	2.337.779

\*El símbolo (-) en los tratamientos con biocarbón a los 0 días de incubación hace referencia a la no realización del conteo debido a que no es representativo a nivel biológico, ya que se parte la misma muestra a los 0 días.

Hay un gran número de bacterias en el suelo estéril en comparación con el suelo no estéril. Este fenómeno puede estar causado por el tiempo transcurrido entre la esterilización del suelo y el montaje experimental.



**Figura 8. Fotografías de bacterias teñidas con DAPI.** A-C, suelo no estéril. D-F, suelo estéril. Se muestra la abundancia de bacterias al inicio del experimento en suelos no estériles (A-C) y estériles (D-F) y los cambios debidos a la aplicación del biocarbón en cada uno de ellos a los 30 (B y E) y 60 (C y F) días de incubación.

Los resultados obtenidos muestran un aumento en la abundancia de bacterias a través del tiempo, más notables en los suelos tratados con biocarbón (Tabla 4). Los cambios temporales en respuesta al biocarbón difirieron entre los suelos estériles y no estériles. Si bien en ambos tratamientos el mayor cambio se observó a los 30 días de incubación, en el suelo no-estéril pudo observarse un aumento sostenido aunque de menor magnitud hasta los 60 días de incubación. En contraposición, la abundancia de bacterias no mostró cambios en los suelos estériles tratados con biocarbón e incubados por 60 días (Tabla 4, Figura 8).

La magnitud del efecto del biocarbón también varió entre los suelos estériles y no-estériles. En los suelos estériles, la abundancia de bacterias se duplicó a los 30 días en respuesta al biocarbón, mientras que durante este período el cambio en los suelos no-estériles fue de aproximadamente 4X. Otra diferencia importante entre los suelos en respuesta a la aplicación del biocarbón fue que en los suelos no-estériles el efecto positivo del biocarbón se observó hasta el final del experimento, mientras que en los suelos estériles la abundancia de bacterias a los 60 días fue similar entre los tratamientos con y sin biocarbón (Tabla 4).

Desde el inicio del experimento se observó una mayor abundancia de bacterias en los suelos sometidos al proceso de esterilización, lo cual no sólo indica que éste proceso fue ineficaz sino que adicionalmente generó condiciones propicias para la proliferación de bacterias posiblemente mediante cambios en la estructura física del suelo y la eliminación de organismos competidores.

Es importante destacar que las muestras empleadas para la tinción con DAPI representan fracciones del anillo bacteriano aislado mediante centrifugación diferencial en el gradiente de nycodenz, lo cual disminuye la interferencia que podría causar la presencia de otros organismos.

#### **8.7. Determinación de biomasa microbiana mediante la técnica de extracción mediante la fumigación con cloroformo**

La biomasa microbiana fue determinada mediante el método de extracción de la fumigación con cloroformo. La biomasa microbiana se estableció por la diferencia entre la cantidad de carbono presente en el suelo fumigado y el suelo no fumigado.

Para calcular la biomasa microbiana solo se analizaron 6 muestras, correspondientes a los tratamientos sin y con biocarbón para los tres tiempos de incubación. En la tabla 5 se presentan los valores de biomasa microbiana obtenidos.

**Tabla 5. Biomasa microbiana en suelo no estéril incubado en presencia o ausencia de biocarbón.**

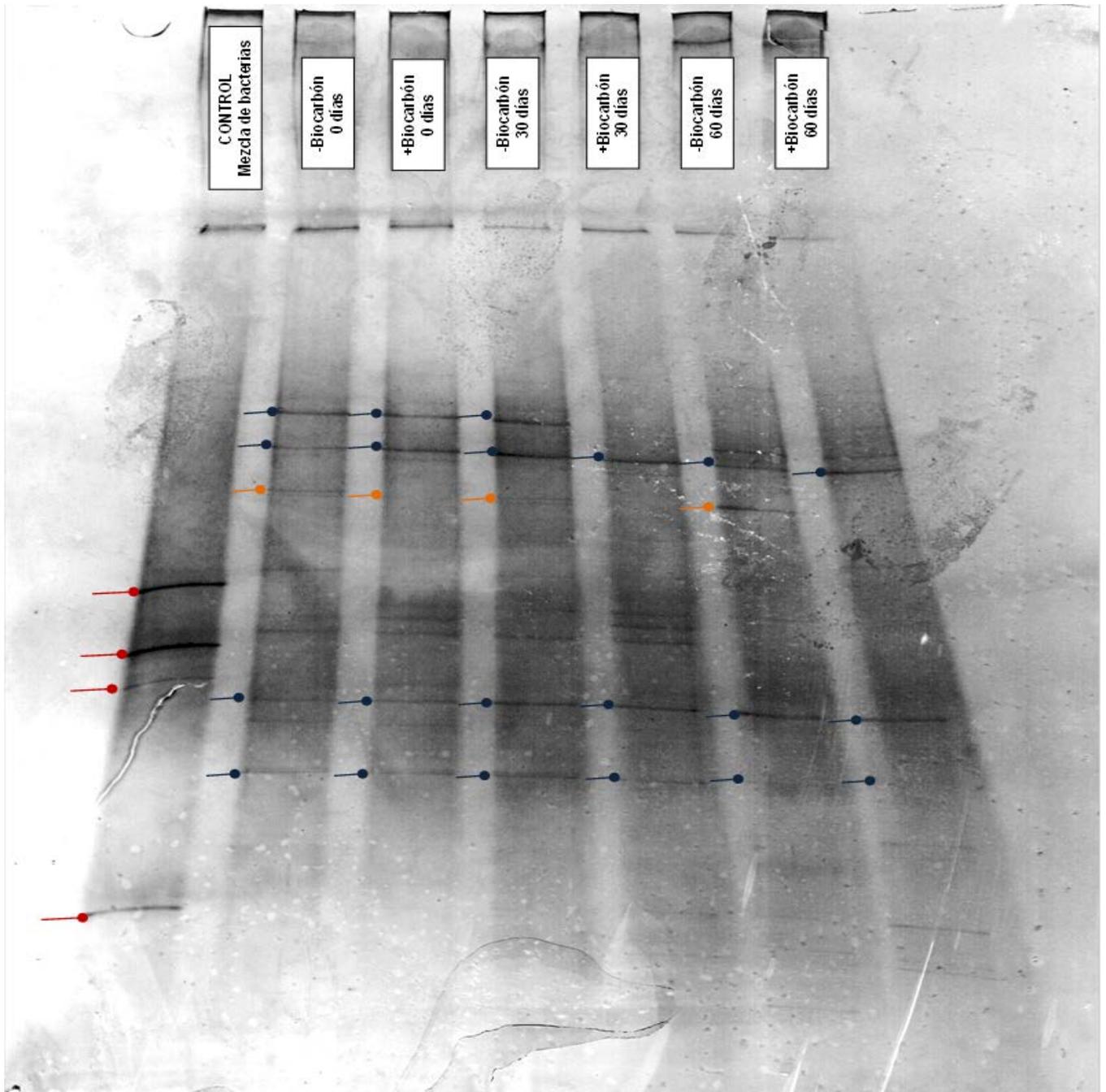
Días de incubación	Biomasa microbiana (g. C. g <sup>-1</sup> suelo)	
	- Biocarbón	+ Biocarbón
0	256.43	353.49
30	292.68	292.68
60	596.23	280.41

En los tratamientos sin biocarbón, se observó un aumento en la biomasa microbiana durante el periodo experimental (30 y 60 días), lo cual indica una mayor abundancia de microorganismos. En presencia de biocarbón la situación fue inversa, observándose una disminución de la biomasa microbiana a través del tiempo, acentuada a los 60 días. A los 0 días de incubación la biomasa microbiana es mayor en el tratamiento en presencia de biocarbón que en el tratamiento en ausencia, debiéndose al tiempo transcurrido entre la colección de las muestras y el análisis de las mismas.

Los resultados obtenidos por el método de fumigación-extracción no guardan una correlación directa con el número de organismos cuantificados mediante tinción con DAPI, proponiendo que bajo las condiciones experimentales evaluadas estas dos metodologías no son complementarias.

Este comportamiento sugiere, que si bien diversos estudios demuestran que el biocarbón interviene en el establecimiento de comunidades bacterianas, la detección del carbono presente en muestras que contienen la biomasa pirolizada podría ser limitada por la técnica implementada.

## 8.8. Análisis de diversidad bacteriana mediante la técnica de DGGE

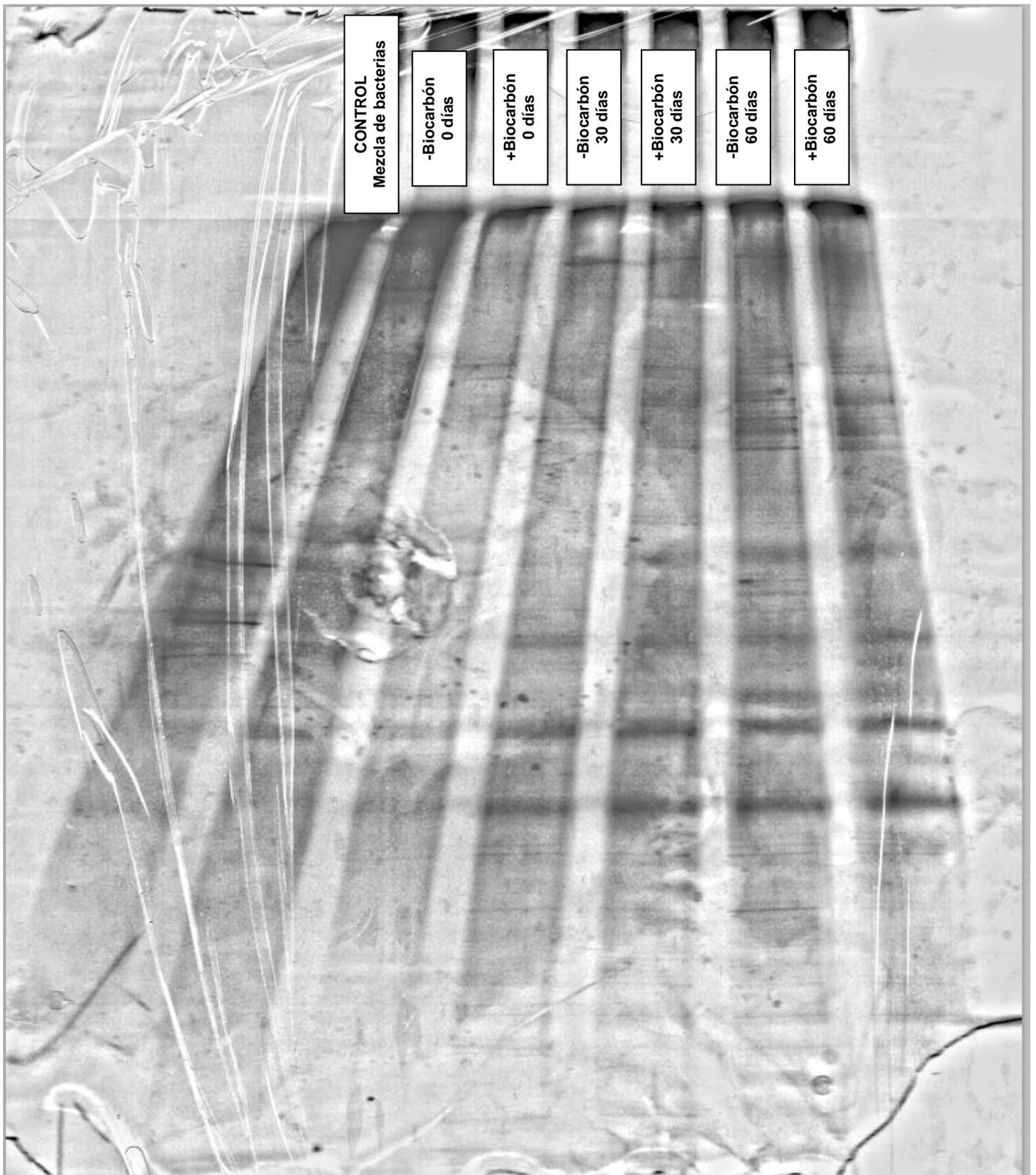


**Figura 9. DGGE para muestras de suelo estéril.** Se muestra el patrón de bandas correspondiente a cada una de las muestras en ausencia/presencia de biocarbón.

La electroforesis en gradiente denaturante (DGGE) permitió evaluar la diversidad de bacterias presentes en el suelo, y detectar diferencias entre los tratamientos aplicados (Figuras 9 y 10). En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos para las muestras de suelo sometidos a proceso de esterilización. La separación electroforética permitió la detección de múltiples bandas en todos los tratamientos evaluados. Como control de la eficiencia de separación se empleó una mezcla de 4 bacterias conocidas (*Herbaspirillum seropedicae*, *E. coli*, *Waupersia* y *Bacillus amilolicuefaciens*) las cuales fueron claramente resueltas en el gel. Debido a la baja calidad del revelado con nitrato de plata, cuyo manchado de arrastre o ruido es importante, el análisis de los geles solo puede realizarse cualitativamente, comparando el patrón de bandas. Este patrón de bandas difiere según el tratamiento con biocarbón y cambia a través del tiempo (Figura 9). Si bien fue posible detectar bandas comunes a todos los tratamientos (señaladas con la barra azul), también se detectaron bandas presentes exclusivamente en algunos tratamientos (barras naranjas). El número de bandas fue mayor a los 30 y 60 días de incubación, indicando un efecto del período de incubación sobre el número/crecimiento de especies de bacterias. También pudo observarse un mayor número de bandas en las muestras extraídas de suelos tratados con biocarbón (Figura 9, inferior).

En los suelos no-estériles (Figura 10), se detectó un mayor número de bandas que en el suelo estéril y se observó el mismo efecto de la aplicación de biocarbón y período de incubación, lo cual sugiere que el número de especies bacterianas aumentó a lo largo del experimento en respuesta a la aplicación de biocarbón.

Sin omitir la limitación que representa la baja calidad del revelado en el análisis de los geles, estos resultados son interesantes. En primer lugar, la comparación entre estas muestras sugiere que hay perfiles moleculares contrastantes que podrían analizarse en detalle empleando secuenciación completa de la muestra (metagenómica). Esto confirma la utilidad de la técnica de DGGE como herramienta exploratoria antes de análisis metagenómicos. En segundo lugar, la comparación del número de bandas entre suelos estériles y no estériles mostró un menor número de bandas (y potencialmente de especies bacterianas) en los primeros. En consecuencia, la mayor abundancia de bacterias detectada mediante tinción con DAPI podría ser la consecuencia de la proliferación de un menor número de microorganismos en la ausencia o reducción de competidores.



**Figura 10. DGGE en muestras de suelo no estéril.** Se muestra el patrón bandas correspondientes a cada una de las muestras en ausencia/presencia de biocarbón

## 8.9. Características físico-químicas del suelo y del biocarbón derivado de la cascarilla de arroz

Dentro de las propiedades del biocarbón se encuentran la capacidad para aumentar la fertilidad del suelo y la disponibilidad de nutrientes. En la Tabla 6 se presentan los análisis físicoquímicos realizados al inicio y al final del experimento a fin de observar el efecto del biocarbón sobre la composición nutricional del suelo empleado en nuestros experimentos.

Para la realización de esta caracterización se seleccionaron seis muestras compuestas, correspondientes al tratamiento del suelo no estéril en ausencia y presencia de biocarbón. Los análisis físicoquímicos del suelo mostraron un aumento importante en la disponibilidad de elementos como el fósforo disponible (P-Bray II), magnesio (Mg), potasio (K) y el azufre (S). Este efecto se detectó a partir de los 30 días de incubación con el biocarbón. El pH del suelo se mantuvo estable durante el período experimental, alrededor de 5.5.

El aumento de nutrientes y microelementos observados se relaciona directamente con la composición del biocarbón aplicado (Tabla 7). El biocarbón derivado de cascarilla de arroz contiene altos niveles de fósforo disponible y microelementos, especialmente K. Es interesante resaltar que el pH del biocarbón es 8.72, sin embargo, la aplicación del biocarbón no modificó el pH del suelo durante el período de experimentación.

**Tabla 6. Caracterización Físicoquímica del suelo no estéril en ausencia y presencia de biocarbón.**

	Tiempo Incubación (días)	pH (Un)	P-bray II (mg/kg)	Ca (cmol/kg)	Mg (cmol/kg)	K (cmol/kg)	Al (cmol/kg)	CIC (cmol/kg)	CICE (cmol/kg)	S (mg/kg)
<b>- Biocarbón</b>	0	5.47	3.233	6.6498	0.9062	0.3675	0.6	0	8.5235	53.7345
	30	5.3	2.6175	8.4983	1.0711	0.2997	0.25	0	10.119	50.91
	60	5.08	2.4584	6.7229	0.9343	0.3859	1	0	9.0431	45.088
<b>+ Biocarbón</b>	0	5.6	11.0081	8.9946	1.4377	0	1	45.9	0	88.25
	30	5.33	9.2927	6.2209	1.0412	1.6371	0.25	0	9.1492	82.084
	60	4.91	7.9294	7.5132	1.1624	1.4516	0.95	0	11.077	53.246

No obstante, aunque los datos obtenidos a partir de los análisis físicoquímicos dan un indicio del efecto del biocarbón sobre el suelo, el tamaño muestral es reducido, lo que limita tener conclusiones contundentes acerca de esta interacción.

**Tabla 7. Caracterización fisicoquímica del biocarbón derivado de cascarilla de arroz.**

<b>International BioChar Initiative (IBI) Nivel I</b>			
	<b>Húmedo</b>	<b>Seco</b>	
Humedad	3.3	0	Porcentaje
Cenizas totales	69.7	72	Porcentaje
Cenizas no ácidas solubles	0.48	0.5	% de ceniza total
Cenizas ácidas solubles	96.2	99.5	% de ceniza total
Carbón orgánico	17	17.6	Porcentaje
Carbón inorgánico	0.31	0.32	Porcentaje
Hidrógeno/carbono	1.11	1.11	Tasa molar
Hidrógeno	1.6	1.6	Porcentaje
Nitrógeno total	0.41	0.43	Porcentaje
Oxígeno total	7.8	8	Porcentaje
pH	8.72	NA	Unidades
Abono con cal(valor neutro)	0.64	0.66	%CaCO <sub>3</sub>
Abono con cal (valor carbonato)	2.6	2.7	%CaCO <sub>4</sub>
Calcio (Ca)	0.053	0.055	Porcentaje
Magnesio (Mg)	0.019	0.019	Porcentaje
Actividad (Butano)	1.1	1.1	g/100g
Área superficial (correlación con butano)	168	169	m <sup>2</sup> /g
Densidad de masa	11.28	10.9	lb/cu ft
Azufre (S)	1.7	1.7	Porcentaje
Hierro (Fe)	0.035	0.036	Porcentaje
Manganeso (Mn)	0.019	0.019	Porcentaje

<b>International BioChar Initiative (IBI) Nivel II</b>				
	<b>Húmedo</b>	<b>Seco</b>	<b>Máximo permitido</b>	<b>Unidades</b>
Arsénico (As)	0.16	0.16	13	mg/Kg
Cadmio (Cd)	0.034	0.035	1.4	mg/Kg
Cobalto (Co)	0.34	0.35	93	mg/Kg

Cromo (Cr)	0.19	0.2	34	mg/Kg
Cobre (Cu)	6.3	6.6	143	mg/Kg
Plomo (Pb)	0.42	0.4	121	mg/Kg
Molibdeno (Mo)	0.01	0.01	5	mg/Kg
Mercurio (Hg)	0.01	0.01	1	mg/Kg
Níquel (Ni)	0.36	0.38	47	mg/Kg
Selenio (Se)	0.048	0.05	2	mg/Kg
Zinc (Zn)	6.8	7.1	416	mg/Kg
Boro (B)	3.9	4	Declaración	mg/Kg
Cloro (Cl)	491	508	Declaración	mg/Kg
Sodio (Na)	1327	1372	Declaración	mg/Kg

**Propiedades básicas de mejora del suelo**

Potasio (K)	0.56	0.58	Declaración	Porcentaje
Fósforo (P)	0.2	0.2	Declaración	Porcentaje
Amonio (NH <sub>4</sub> -N)	0.1	0.1	Declaración	mg/Kg
Nitrato (NO <sub>3</sub> -N)	2.5	2.6	Declaración	mg/Kg
Fósforo (P) disponible	1387	1434	Declaración	mg/Kg
Conductividad eléctrica	0.75	NA	Declaración	dS/m
Humedad	3.3	0	Declaración	Porcentaje
pH	8.72	NA	Declaración	Unidades

## 9. Discusión

En los últimos años se ha impulsado la investigación sobre los efectos de los biocarbones de origen vegetal sobre el crecimiento de las plantas y las propiedades del suelo, pues el uso de biocarbón se considera una estrategia promisoría en el campo de la agricultura (Ippolito, Laird, & Busscher, 2012). En relación a la microbiota del suelo, se ha reportado que el biocarbón, debido a su estructura y propiedades fisicoquímicas, permite que se generen en el suelo una serie de modificaciones a nivel de estructura y composición, dando lugar a nichos ecológicos propicios para la colonización y establecimiento de microorganismos. No obstante, la evidencia a este respecto no es concluyente pues también existen estudios que han demostrado que la adición de biocarbón al suelo puede causar efectos negativos sobre las comunidades microbianas que habitan el suelo, inhibiendo su actividad biológica. Estas respuestas contrastantes parecen estar relacionadas tanto con las características propias del biocarbón evaluado, así como con las propiedades del suelo al cual éste es agregado. El tiempo de incubación del suelo también es un factor importante, reportándose diferencias en los efectos detectados a corto y largo plazo.

Para acceder a las diferentes propiedades del biocarbón actuando sobre diversos procesos en el suelo, se han realizado experimentos en laboratorio a corto plazo que permiten realizar aproximaciones sobre la interacción suelo-biocarbón-microbiota. La presente investigación se planteó con el objetivo de determinar el efecto del biocarbón derivado de la cascarilla de arroz sobre la abundancia y diversidad de bacterias del suelo. Para acceder a este objetivo, el análisis de comunidades bacterianas se evaluó enmarcado en dos enfoques complementarios: técnicas moleculares y técnicas microbiológicas. Mediante las técnicas moleculares se pretendió acceder a la mayor cantidad de información posible acerca de la diversidad de organismos presentes en el suelo en ausencia y presencia de biocarbón. Por otro lado, las técnicas microbiológicas permitieron evidenciar la presencia de bacterias en el suelo al principio del experimento y estimar la abundancia de microorganismos mediante tinción fluorescente no específica y cuantificación de la biomasa microbiana. A fin de observar los efectos netos del biocarbón sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo, y no estos efectos sumados con las modificaciones que generan los microorganismos en el suelo, se estableció un control de esterilidad (suelo estéril).

Los análisis realizados empleando diferentes metodologías (siembra superficial en placa, Fumigación-extracción, DAPI, DGGE) mostraron que la remoción completa de los organismos vivos en las muestras de suelo no se alcanzó satisfactoriamente. Una de las razones posibles para explicar este fenómeno esta

relacionada con que los organismos difieren en términos de resistencia a diferentes tipos de agentes esterilizantes o procedimientos de esterilización. Dentro de los factores que impiden la esterilización efectiva de una muestra se encuentra la concentración y edad de las células, el tamaño del recipiente, el tiempo de exposición al calor, la materia orgánica o los compuestos grasos que protegen a las células de la esterilización ( Frankland et al., 1995).

La esterilización del suelo utilizado en el experimento se realizó utilizando un procedimiento estándar de doble autoclavado a 121 °C, conocido como esterilización con calor húmedo. Sin embargo, las diferentes metodologías empleadas en este trabajo revelaron la presencia de bacterias en el suelo “esterilizado”. Esto podría relacionarse con el hecho de que el agua hirviendo mata casi por completo todos los organismos vegetales más no las esporas bacterianas (Frankland et al., 1995). Adicionalmente, algunos estudios han reportado que la esterilización de matrices edáficas mediante autoclavado promueve un cambio en la estructura del suelo, aumentando la permeabilidad y generando ambientes propicios para el establecimiento de cepas bacterianas después de la esterilización (Jenneman et al., 1986). Otra causa por la cual la abundancia aumentó podría ser la remoción de algunas bacterias presentes en la muestra, eliminando la competencia interespecífica y permitiendo que cierto tipo de microorganismos se establecieran y aumentaran su tasa de crecimiento y proliferación ( Hibbing, Fuqua, Parsek, & Peterson, 2010). Por otra parte, las muestras experimentales con suelo estéril se incubaron bajo las mismas condiciones que el suelo no estéril, por lo que no se mantuvieron bajo condiciones de esterilidad durante todo el curso del experimento. Otro factor importante a tener en cuenta es el tiempo transcurrido entre el proceso de esterilización del suelo y el montaje experimental (~ 1 semana), debido a que el suelo tuvo que ser sometido a irrigación para poder alcanzar la capacidad de campo. Esto pudo haber sido un factor determinante en la contaminación de la muestras. Estos sucesos en conjunto podrían explicar no sólo la presencia de microorganismos luego de la esterilización sino la mayor abundancia de bacterias en los suelos sometidos a esterilización.

Al ser el suelo una matriz tan compleja a nivel de estructura y composición, enfrentamos diversas limitaciones de nivel técnico que impidieron realizar los análisis del suelo agrícola. Por ejemplo, aunque las mismas metodologías fueron empleadas para extraer ADN del suelo agrícola y el suelo no perturbado, la obtención de ADN en el suelo agrícola no fue exitosa. En consecuencia, los tratamientos basados en este tipo de suelo fueron omitidos en los análisis posteriores. Es posible que el suelo agrícola haya sido afectado por fungicidas, herbicidas u otro tipo de compuestos que limitan la extracción del ADN.

La estrategia experimental implementada en este trabajo permitió realizar una aproximación en el corto plazo, al efecto que ejerce el biocarbón derivado de cascarilla de arroz sobre la abundancia y diversidad de bacterias, así como sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo. El conteo de bacterias con la técnica de fluorescencia mostró un efecto positivo del biocarbón sobre la abundancia de microorganismos, efecto dependiente del tiempo de incubación. Este efecto no pudo ser corroborado mediante la técnica de la extracción de carbono microbiano empleando fumigación con cloroformo. Aunque esta técnica ha sido reportada como uno de los métodos más confiables y rápidos para la cuantificación directa de la biomasa microbiana (Witt et al., 2000), presenta limitaciones para ser aplicada en el análisis de suelos tratados con biocarbón. Se ha reportado que el alto contenido de carbono de los biocarbones puede enmascarar el carbono presente en la muestra, impidiendo que sea detectado por este método (Sohi et al., 2009). Adicionalmente, estudios han reportado la dificultad y la no correlación encontrada en la determinación de abundancia de microorganismos mediante técnicas de microscopía vs técnicas de determinación de biomasa como la de fumigación-extracción. Las limitaciones de los métodos de microscopía radican en factores determinantes como la experticia del microscopista y la resolución de la técnica para distinguir entre organismos vivos o muertos (Martens, 1995). Por otro lado, las relaciones matemáticas utilizadas para determinar la biomasa microbiana incluyen un factor de corrección (constante) que depende de cada tipo de suelo y de su composición, siendo este otro factor influyente en la sobreestimación del C microbiano.

En este trabajo se optimizaron las metodologías de extracción de ácidos nucleicos en muestras de suelo y de amplificación mediante PCR. La combinación de métodos directos e indirectos para la extracción de ADN permitió obtener suficiente ADN para realizar los análisis moleculares. Adicionalmente, en teoría, las metodologías empleadas permiten aislar fracciones más ricas en número de especies, aunque esto no fue verificado en este trabajo. La amplificación mediante PCR fue inicialmente afectada por la presencia de compuestos del suelo, los cuales actúan como inhibidores de la PCR a dos niveles: 1) Inhiben la acción de la *Taq* polimerasa, la enzima clave de la PCR y 2) Impide la hibridación entre dos cadenas sencillas de ADN (Tebbe y Vahjen, 1993). Este problema fue resuelto realizando las amplificaciones en presencia de albúmina de suero fetal bovino como reconstituyente del ADN. La albúmina, al igual que el DMSO, ayuda a que las cadenas de ADN se extiendan y se pueda unir la *Taq* polimerasa al sitio de acción.

Los suelos están compuestos por comunidades microbianas muy complejas. La técnica de DGGE se presenta como una opción para acceder a la información sobre la diversidad bacteriana en este ambiente. La técnica de DGGE permite la separación de fragmentos de ADN con base en la secuencia nucleotídica

(Nakatsu, 2007). La migración diferencial de los fragmentos, obedece a la disminución de la movilidad en respuesta a un gradiente de desnaturalización (Muyzer & Smalla, 1998). En este trabajo se seleccionó la región hipervariable V3 del gen 16S rARN para evaluar la diversidad de especies en el suelo, pues ésta muestra suficiente variabilidad a nivel de secuencia. Las condiciones de corrida mediante DGGE fueron optimizadas para la separación de los fragmentos amplificados en esta región, seleccionándose un gradiente denaturante de 30 – 70%, con voltaje constante de 100 V y temperatura de 64°C. Estas condiciones permitieron la detección de numerosas bandas en las muestras analizadas. No obstante, problemas con el revelado de los geles con nitrato de plata no permitieron el análisis cuantitativo de los geles y éste tuvo que hacerse cualitativamente.

El análisis cualitativo de los geles se basó en la comparación de los patrones de bandas en las distintas muestras, considerando la presencia/ausencia de bandas e intensidad de las mismas. Según este análisis, el biocarbón aumenta el número de especies bacterianas en el suelo pues se detecta un mayor número de bandas en las muestras tratadas con biocarbón. Este efecto es dependiente del tiempo de incubación, aumentando la riqueza con el tiempo.

Este resultado es promisorio con respecto a la aplicación de biocarbón derivado de cascarilla de arroz para promover el aumento de la abundancia y diversidad de bacterias en el suelo. El aumento de la abundancia y número de especies podría estar relacionado con el aumento en la disponibilidad de fósforo y micronutrientes detectado mediante el análisis fisicoquímico de las muestras de suelo. El análisis del biocarbón derivado de cascarilla de arroz pirolizada a 500 °C, utilizado en este estudio, mostró que éste contiene altos niveles de estos elementos. Adicionalmente, el biocarbón pudo generar cambios en las propiedades físicas del suelo.

A pesar de estos resultados promisorios, es importante destacar las limitaciones de la técnica de DGGE y particularmente las limitaciones enfrentadas en este trabajo. En primer lugar, siendo el suelo un habitat con comunidades microbianas complejas, la riqueza de poblaciones excede millones de filotipos. En contraste, apenas de 20 a 40 bandas se pueden observar con claridad en un gel de DGGE (Nakatsu, 2007), por lo que se hace casi imposible detectar mediante este método la diversidad entera de una muestra de suelo (Nakatsu, 2007). Otra de las limitaciones que presenta la técnica, es que una comunidad microbiana compleja puede estar compuesta por numerosas poblaciones que se encuentra relativamente en las mismas proporciones, lo cual ocasiona un barrido oscuro en el gel que imposibilita identificar poblaciones individuales (Nakatsu, 2007). En este trabajo, ambos problemas fueron acentuados por la baja resolución del revelado de los geles con nitrato de plata. Para solventar este problema, puede emplearse

la tinción con SYBR-Gold, que tiene una mayor sensibilidad que el nitrato de plata con menor interferencia o ruido en el revelado.

Generalmente cuando la resolución que da la tinción del gel es alta, se puede realizar un conteo de las bandas como un estimativo de la riqueza de especies, pero en muchos casos esto respresenta unicamente poblaciones dominantes y no la riqueza total de organismos (Nakatsu, 2007). Indirectamente la técnica tambien provee información acerca de la abundancia (por intensidad de las bandas). Por estas razones, la técnica de DGGE es empleada actualmente como una herramienta exploratoria que apoya la selección de muestras para análisis metagenómico. En este trabajo, por ejemplo, los resultados apoyarían la selección de las muestras incubadas por 60 días para realizar un análisis metagenómico comparativo que permita dilucidar el efecto del biocarbón sobre la diversidad de especies de bacterias.

En lo referente a la caracterización fisicoquímica del suelo, los resultados obtenidos a partir de los análisis no son un soporte contundente acerca del efecto beneficioso del suelo. Teniendo en cuenta que los análisis se realizaron con un número reducido de muestras, los resultados obtenidos son una aproximación que permite ver a grandes razgos algunos cambios en la disponibilidad de ciertos nutrientes en el suelo. Probablemente el efecto del biocarbón sobre el suelo no es tan evidente debido al poco tiempo de incubación de las muestras, requiriendose mayor tiempo de incubación para ver diferencias significativas en cuanto a pH y composición nutricional entre los tratamientos en ausencia y presencia de biocarbón.

Aunque los resultados obtenidos en esta investigación no tienen validez a nivel estadístico debido al análisis de muestras compuestas, el presente trabajo estableció diferencias cualitativas sobre el efecto positivo del biocarbón sobre las comunidades presentes en suelo no perturbado, demostrando que hay un aumento en la abundancia y diversidad bacteriana en respuesta a la aplicación de biocarbón generado a partir de la pirólisis de cascarilla de arroz.

## 10. **Potenciales beneficiarios**

Este trabajo aportó información relevante a la investigación de las propiedades del biocarbón como restaurador de suelos, utilizando la diversidad y abundancia bacteriana como indicador.

Los resultados de este proyecto serán de utilidad tanto en la generación de nuevos conocimientos como a nivel aplicado, en especial para las empresas relacionadas al sector agrícola.

## 11. Impacto ambiental

La gestión y uso sostenible del biocarbón representa una estrategia para reducir el impacto ambiental de las prácticas agrícolas pues permitiría disminuir el uso de fertilizantes químicos y recuperar suelos degradados por la explotación agrícola.

En este proyecto se utilizaron reactivos de carácter tóxico, a los cuales se les dio un manejo adecuado bajo las normas estipuladas por la Universidad Icesi a fin de disminuir el riesgo de contaminación de aguas y otros ambientes.

La recolección de las muestras de suelo en campo no causó ningún disturbio ecológico, tampoco hacen parte de ningún ecosistema amenazado.

## 12. Conclusiones

1. La adición de biocarbón derivado de cascarilla de arroz pirolizada al suelo, promovió un aumento de la abundancia de bacterias según los análisis de conteo de células teñidas con DAPI.
2. La mayor abundancia bacteriana no pudo ser corroborada con los análisis de C en la biomasa microbiana. Esto puede deberse a problemas inherentes a la técnica que limitan su utilización en suelos tratados con biocarbón.
3. El análisis de la diversidad de especies bacterianas empleando DGGE basada en la separación de fragmentos de la región hipervariable V3 del gen 16S rARN mostró un efecto positivo del biocarbón derivado de la cascarilla de arroz, el cual es dependiente del tiempo de incubación.
4. Un número de características fisicoquímicas del suelo se vieron favorecidas por la aplicación del biocarbón derivado de la cascarilla de arroz, siendo particularmente notable el aumento en la disponibilidad de fósforo.
5. La mayor disponibilidad de fósforo y micronutrientes promovida por el biocarbón podría estar relacionada con el aumento en la abundancia y diversidad observado en las muestras tratadas con biocarbón.

### 13. Recomendaciones

1. Para futuros experimentos es recomendable utilizar otro método de esterilización del suelo, a fin de garantizar la esterilización efectiva y poder cumplir con los objetivos propuestos para ese tratamiento
2. Es necesario evaluar la interacción suelo-biocarbón-planta con el objetivo de determinar el efecto sobre plantas de cultivo.
3. Para realizar un conteo mas preciso de bacterias mediante la tinción con DAPI se recomienda hacer diluciones de la muestra para obtener imágenes mas claras y con menor numero de células por cada campo.
4. Sustituir la tinción con plata de los geles de DGGE por la tinción con SYBR Gold para obtener una mejor resolución de las bandas.
5. Para realizar las mediciones de biomasa microbiana en presencia de biocabón se debe utilizar una metodología diferente, con mayor sensibilidad que permita detectar la biomasa microbiana presente en la muestra. Dos de los métodos a utilizar podrían ser el de respiración sustrato-inducida o el método de extracción de ATP.
6. Realizar un montaje experimental que permita asemejar las condiciones naturales de la estratificación del suelo a fin de evitar efectos provocados por cambios de temperatura.

## 14. Referencias

- Abenza, D. (2012). *Evaluación de efectos de varios tipos de biochar en suelo y planta*. Barcelona: Bellaterra.
- Atkinson, C., Fitzgerald, J., & Hipps, N. (2010). Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. *Plant Soil*, 1-18.
- Bassam, B., & Gresshoff, P. (2007). Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 2649-2654.
- Bailey, V., Fansler, S., Smith, J., & Bolton, H. (2010). Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization. *ELSEVIER*, 296-301.
- Bertrand, H., Poly, F., Tran Van, V., Lombard, N., Nalin, R., Vogel, T., & Simonet, P. (2005). High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. *ELSEVIER*, 1-11.
- Brons, J., & Elsas, J. (2008). Analysis of Bacterial Communities in Soil by Use of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Libraries, as Influenced by Different Reverse Primers. *Applied Environmental Microbiology*, 2717–2727.
- Carvajal, J., & Mera, A. (2010). Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción más amplia*, 1-20.
- Daniel, R. (2004). The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *ELSEVIER*, 199-204.
- Daniel, R. (2005). THE METAGENOMICS OF THE SOIL. *Nature*, 470-478.
- Delmont, T., Robe, P., Cecillon, S., Clarck, I., Constancias, F., Simonet, P., . . . Vogel, T. (2011). Accesing the Soil Metagenome For Studies of Microbial Diversity . *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 1315-1324.
- Dempster, D., Gleeson, D., Solaiman, Z., Jones, D., & Murphy, D. (2012). Decreased soil microbial biomass and nitrogen mineralisation with Eucalyptus biochar addition to a coarse textured soil. *Plant Soil*, 311–324.

- Dubourg, G., Lagier, C., Armougom, F., Robert, J., Hamad, I., Brouqui, P., & Raoult, D. (2012). The gut microbiota of a patient with resistant tuberculosis is more comprehensively studied by culturomics than by metagenomics. *Springer*, 637–645.
- Elad, Y., Cytryn, E., Harel, Y., Lew, B., & Graber, E. (2011). The Biochar Effect: plant resistance to biotic stresses. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(3), 335-349.
- Ettwig, K., Butler, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Le Paslier, D., Kuypers, M., . . . Strous, M. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 543-550.
- Frankland, J., Latter, P., & Poskitt, J. (1995). *A laboratory guide to soil microbiology*. Cumbria : Medewood Research and Development.
- Galvis, L. A. (Marzo de 2001). ¿Qué determina la productividad agrícola departamental en Colombia? *Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional*(19), 2-34.
- Gerard, M., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 127–141.
- Heuer, H., Hartung, K., Wieland, G., Kramer, I., & Smalla, K. (1999). Polynucleotide Probes That Target a Hypervariable Region of 16S rRNA Genes To Identify Bacterial Isolates Corresponding to Bands of Community Fingerprints. *Applied Environmental Microbiology*, 1045–1049.
- Ippolito, J., Laird, D., & Busscher, W. (2012). Environmental Benefits of Biochar. *Journal of Environmental Quality*, 967-972.
- Jahirul, M., Rasul, M., Chowdhury, A., & Ashwath, N. (2012). Biofuels Production through Biomass Pyrolysis —A Technological Review. *Energies*, 4952-5001.
- Jenneman, G., McInerney, M., Crocker, M., & Knapp, R. (1986). Effect of Sterilization by Dry Heat or Autoclaving on Bacterial Penetration through Berea Sandstone. *Applied and Environmental Microbiology*, 39-43.
- Kawaharasakia, M., Tanaka, H., Kanagawa, T., & Nakamura, K. (1999). In situ identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4',6-diamidino-

- 2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration. *ELSEVIER*, 257–265.
- Kepner, R., & Pratt, J. R. (1994). Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental Samples: Past and Present. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 603-615.
- Khodadad, C., Zimmerman, A., Green, S., Uthandi, S., & Foste, J. (2011). Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. *ELSEVIER*, 385-392.
- Knicker, H. (2011). Soil organic N - An under-rated player for C sequestration in soils? *ELSEVIER*, 1118-1129.
- Koide, R., Petprakob, K., & Peoples, M. (2011). Quantitative analysis of biochar in field soil. *ELSEVIER*, 1563-1568.
- Lili, L., & Ma, S. (2009). SOIL FERTILITY ENHANCING MICROORGANISMS AND THEIR APPLICATION AS BIOFERTILIZERS. En L. Derek, & J. Boggs, *Soil Fertility* (págs. 1-12). Nova Science Publishers, Inc.
- Masulili, A., Utomo, W., & MS, S. (2010). Rice Husk Biochar for Rice Based Cropping System in Acid Soil 1. The Characteristics of Rice Husk Biochar and Its Influence on the Properties of Acid Sulfate Soils and Rice Growth in West Kalimantan, Indonesia. *Journal of Agricultural Science*, 2, 39-47.
- Mocali, S., & Benedetti, A. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *ELSEVIER*, 497-505.
- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 127-141.
- Nakatsu, C. (2007). Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Science Society American Journal*, 562-571.
- Parr, J., & Hornick, S. (1992). Agricultural use of organic amendments: A historical perspective. *American Journal of Alternative Agriculture*, 181-189.
- Petillo, G., Puppo, M., Hayashi, L., & Morales, R. (2012). *Metodología para determinar los parámetros hídricos de un suelo a campo*. Montevideo: Facultad de Agronomía, Departamento de Suelos y Aguas.

- Riesenfeld, C., Schloss, P., & Handelsman, J. (2004). METAGENOMICS: Genomic Analysis of Microbial Communities . *Annu. Rev. Genet*, 525-552.
- Sigler, W., Miniaci, C., & Zeyer, J. (2004). Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *ELSEVIER*, 17– 22.
- Sinegani , A., & Hosseinpour, A. (2010). Evaluation of Effect of Different Sterilization Methods on Soil Biomass Phosphorus Extracted with NaHCO<sub>3</sub>. *PLANT SOIL ENVIRON.*, 156-162.
- Sivila, R., & Hervé, D. (1999). *Analisis de la microbiota en suelos cultivados dei Altiplano Central*. La Paz: Memorias Primer Congreso Boliviano de la Ciencia dei Suelo.
- Sohi, S., Lopez-Capel, E., Krull, E., & Bol, R. (2009). Biochar, climate change and soil: A review to guide future research. *CSIRO*, 1-46.
- Tebbe, C., & Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 2657-2665.
- Tomas, V., & Petr, B. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLOS one*, 8, 1-10.
- Verheijen, F., Jeffery, S., Bastos , A., van der Velde, M., & Dias, I. (2010). Biochar Application to Soils . *Scientific and Technical Reports*, 1-165.
- Wang, S., & He, J. (2012). Two-step denaturing gradient gel electrophoresis (2S-DGGE), a gel-based strategy to capture full-length 16S rRNA gene sequences. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1305–1312.
- Witt, C., Gaunt, J., Galicia, C., Ottow, J., & Neue, H.-U. (2000). A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. *Springer*, 510–519.
- Yu, W., Dodds, W., Banks, M., Skalsky, J., & Strauss, E. (1995). Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total and active bacteria in soil with two fluorescent dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 3367–3372.

- Zheng, W., Sharma, B., & Rajagopalan, N. (2010). *Using Biochar as a Soil Amendment for Sustainable Agriculture*. Illinois: Illinois Department of Agriculture Sustainable Agriculture Grant's Research Report Series.
- Zimmerman, A., Gao, B., & Ahn, M.-Y. (2011). Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. *ELSEVIER*, 1169-1179.

## 15. ANEXOS

**Tabla 8. Rendimiento de tres bioproductos derivados de diferentes tipos de biomasa bajo condiciones limitadas de oxígeno por 60 min a 400°C**

<b>Biochar</b>	<b>Feedstock</b>	<b>Biochar (%)</b>	<b>Bio-oil (%)</b>	<b>Syngas (%)</b>
ZW-1	Corn cob	32.2 %	45.6 %	22.2%
ZW-2	Corn stover	39.0 %	42.8 %	18.2 %
ZW-3	Defatted DDG	45.8 %	40.3 %	14.9 %
ZW-4	Pine cone	38.0 %	44.4 %	17.6 %
ZW-5	America chestnut shell	42.2 %	45.6 %	12.2 %
ZW-6-1*	Wood chip	35.0 %	42.0 %	23.0 %
ZW-6-2*	Wood chip	35.0 %	42.1 %	22.9 %
ZW-6-3*	Wood chip	35.1 %	42.1 %	22.8 %

(Zheng et al., 2010)